

Perfil fitoquímico y actividad biológica *in vitro* del extracto crudo etanólico y fracciones de las raíces de *Eryngium horridum* Malme, del departamento de Cordillera, Paraguay

Phytochemical profile and *in vitro* biological activity of the crude ethanol extract and root fractions of *Eryngium horridum* Malme, from the department of Cordillera, Paraguay

Elsa Beatriz Cárdenas^{1,*}, Cristina Mayumi Sasaki Miyazaki² & Francisco Paulo Ferreira³.

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Efluentes. San Lorenzo, Paraguay.

²Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Laboratório de Doenças Parasitárias, Curitiba, Brasil.

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Química Orgánica de Productos Naturales. San Lorenzo, Paraguay.

*Autor correspondiente: elsacardenas74@gmail.com.

Resumen: *Eryngium horridum*, es una especie vegetal que ha tenido estudios como maleza, pero con escasa información dentro del contexto de investigaciones fitoquímicas o actividades biológicas de la misma, pero sí del género *Eryngium*. Esta especie es utilizada en la medicina popular como antiinflamatoria en infusión, especialmente las raíces y hojas. El objetivo de este trabajo fue trazar el perfil fitoquímico del extracto de raíces de la especie *Eryngium horridum* Malme, que se encuentra en el departamento de Cordillera, Paraguay, evaluando además su eficacia frente a bioensayos específicos buscando su potencial farmacológico. Para ello, se secaron las raíces, se trituraron y sometieron a maceración con etanol al 96%. Luego se llevó a cabo el perfil fitoquímico del extracto crudo y de las fracciones solubles en diferentes solventes (éter de petróleo, diclorometano, acetona y metanol), se realizó el perfil cromatográfico en GC-MS, los fenoles totales y actividad biológica como actividad antimicrobiana, antioxidante y hemolítica. Según resultados obtenidos, se verificó la presencia de compuestos como aldehídos, fenoles, lactonas, entre otros. La fracción soluble en acetona (E3) mostró un valor de 160,6 mg GAE.g⁻¹ de fenoles totales. En cuanto a las actividades biológicas, se mostró capacidad inhibitoria ante 9 de las 10 cepas utilizadas, cuyo mayor porcentaje de actividad fue de 70,10% con la *Pseudomonas aeruginosas*, un poder antioxidante de 20,49% con el método de DPPH, y una actividad hemolítica de 97,8% en la fracción soluble en acetona (E3). Podemos concluir que la especie estudiada presenta metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana, antioxidante y hemolítica.

Palabras clave: *Eryngium horridum*, extracto etanólico, actividad antioxidante, fenoles totales, hemólisis.

Abstract: *Eryngium horridum*, is a plant species that has had studies as a weed, but with little information within the context of phytochemical investigations or biological activities of the same, but the genus *Eryngium*. This species is used in popular medicine as an anti-inflammatory infusion, especially the roots and leaves. The objective of this work was to trace the phytochemical profile of the root extract of the species *Eryngium horridum* Malme, which is found in the department of Cordillera, Paraguay, also evaluating its efficacy against specific bioassays looking for its pharmacological potential. For this, the roots were dried, crushed and subjected to maceration with 96% ethanol. Then the phytochemical profile of the crude extract and the soluble fractions in different solvents (petroleum ether, dichloromethane, acetone and methanol) was carried out, the chromatographic profile was carried out in GC-MS, the total phenols and biological activity as antimicrobial activity, antioxidant and hemolytic. According to the results obtained, the presence of compounds such as aldehydes, phenols, lactones, among others, was verified. The fraction soluble in acetone (E3) showed a value of 160.6 mg GAE.g⁻¹ of total phenols. Regarding the biological activities, inhibitory capacity was shown against 9 of the 10 strains used, whose highest percentage of activity was 70.10% with *Pseudomonas aeruginosas*, an antioxidant power of 20.49% with the DPPH method, and a hemolytic activity of 97.8% in the acetone-soluble fraction (E3). We can conclude that the species studied presents secondary metabolites, antimicrobial, antioxidant and hemolytic activity.

Keywords: *Eryngium horridum*, ethanolic extract, antioxidant activity, total phenols, hemolysis.

Introducción

Las bases científicas para el uso eficiente y seguro

de las plantas medicinales están relacionadas a los resultados de las investigaciones realizadas con las

Editor responsable: Nery López Acosta*

Recibido: 04/04/2023

Aceptado: 07/02/2024

*Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.



2078-399X/2024 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.
Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>).

mismas, en estudios preclínico y/o clínico. Considerando que las plantas son organismos que poseen un complejo fitoquímico constituido por las más diversas clases de activos vegetales y que son utilizados en medicina popular, medicina tradicional china (MTC), medicina ayurveda y muchas otras terapias, es importante señalar que su origen natural no los hace inofensivos. Su composición química puede actuar sobre el mecanismo fisiológico o patológico del organismo, para corregirlo o alterarlo, por lo tanto, podría ocasionar un efecto farmacológico que resulte terapéutico o por el contrario cause una reacción adversa (Soria, 2018).

Las principales causas de decesos en el mundo, con arreglo al número total de vidas perdidas, se atribuyen a tres grandes cuestiones: las enfermedades cardiovasculares (cardiopatías isquémicas, accidentes cerebrovasculares), las enfermedades respiratorias (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infecciones de las vías respiratorias inferiores) y las afecciones neonatales, que abarcan la asfixia y el traumatismo en el nacimiento, la septicemia e infecciones neonatales y las complicaciones del parto prematuro (OMS, 2020).

El consumo de plantas medicinales y aromáticas en el Paraguay es tradicional y generalizado. Es una costumbre que viene de los guaraníes, que con su gran convivencia y experiencia tuvieron una noción extensa del uso y de las propiedades de las plantas nativas y así hicieron de ello una aplicación apropiada para la prevención y el tratamiento de diferentes enfermedades que afectan al hombre (Fretes, 2010).

Existe un progresivo interés terapéutico en la búsqueda de antioxidantes de origen natural, especialmente procedentes de plantas medicinales y/o alimenticias. En la mayoría de los casos, la actividad antioxidante de estas plantas es debida principalmente a la presencia de compuestos fenólicos (Hernández Villarreal, 2020).

Se estima que el 25% de los fármacos de uso frecuente contienen compuestos aislados de plantas, cifra que acrecienta si se incluyen fármacos modificados a partir de prototipos naturales. Además, se estima entre 300.000 y 500.000 especies de plantas

que existen en todo el mundo y solo el 15% de estas han sido estudiadas por el campo de la Fitoquímica y el 6% por la Farmacología, por tanto, es factible creer que muchos fármacos derivados de plantas todavía faltan por descubrirse, incluidos los destinados al tratamiento de enfermedades tumorales (Foresto *et al.*, 2021).

La Familia Apiaceae es muy conocida entre las plantas superiores (angiospermas), pero la especie *Eryngium horridum* Malme, que es una planta herbácea, perenne, nativa, perteneciente a ésta familia, de los cuales aún no existen publicaciones sobre la identificación y descripción de compuestos activos en la especie ni sobre su uso en terapia, es por ello que este trabajo tiene como objetivo a evaluar la actividad biológica y el perfil fitoquímico de las



Figura 1. Aspecto de la planta de *Eryngium horridum*. Inflorescencia (arriba) y hojas (abajo).

raíces de ésta especie y establecer su posible uso terapéutico.

Eryngium es probablemente el género más grande (200-250 especies) y más distintivo de la familia, con su aspecto comúnmente parecido a un cardo. El género es esencialmente cosmopolita, aunque tiende a evitar el este de Asia, la zona tropical y Sudáfrica (Flora Panamá, 1980). Entre las especies de éste género en estudio se encuentra el *Eryngium horridum* (Figura 1).

Materiales y métodos

Muestreo: Las raíces de la especie *Eryngium horridum* Malme, de la familia Apiaceae, fueron recolectadas en plena inflorescencia en el mes de setiembre del año 2021, en el Departamento de Cordillera de la ciudad de Arroyos y Esteros, Compañía Isla Guazú, Barrio Iturbe cuyas coordenadas fueron 25.07480556S 57.05655556W, en una zona árida con sotobosques de malva y Solanaceae (ñoati pytã).

Identificación Taxonómica y Caracterización

Vegetal: La identificación taxonómica del material vegetal fue realizada en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), por la Lic. Fátima Piris da Motta en conjunto con el Lic. Medes Mendoza. Para la determinación del género *Eryngium* (colecta N°01), se utilizó claves de identificación taxonómica mencionadas en el tomo IV de la Flora de la Provincia de Buenos Aires (1965) el espécimen fue comparado con exiccatas de herbarios del Catálogo de Plantas Vasculares del Conosur en su versión on-line (2022), de donde también se obtuvo información de la distribución de la especie y el nombre actualmente aceptado. Esta especie colectada fue depositada en el Herbario de la FACEN para referencia adicional bajo la identificación FACEN N°4979.

Elaboración del extracto: La preparación del extracto crudo etanólico de *Eryngium horridum* Malme, fue realizada con las raíces secas, libres de hojas, (incluyó a toda la raíz: principal, secundaria etc.), las mismas fueron lavadas y extendidas en bandejas de plástico para secarlas a la sombra bajo un flujo de aire natural y una temperatura ambiente

promedio de aproximadamente 30°C durante 5 días, para completar el secado total se utilizó una estufa de secado a 40°C. Se efectuó la maceración exhaustiva de 477 g de material triturado homogéneo con etanol al 96% en frío y agitación manual diaria.

Fraccionamiento y Ensayos de Compuestos

Presentes: Se realizó la extracción fraccionada de compuestos del extracto bruto con los siguientes solventes: éter de petróleo, diclorometano, acetona y metanol. El extracto crudo (5,8610 g) se trató con 4 porciones de 50 mL del solvente Éter de petróleo. Se sonicó por 15 minutos, luego 15 minutos de agitación manual. Se transfirió el sobrenadante a otro recipiente limpio y seco, en el cual se unificaron las 4 porciones de 50 mL, haciendo un total de 200 mL, posteriormente se llevó a sequedad. El residuo se trató de la misma manera con el diclorometano, y de la misma manera con la acetona y metanol.

Pruebas Cualitativas: Las pruebas han sido realizadas con el extracto crudo (Ec) etanólico y con cada una de las fracciones obtenidas (E1, E2, E3 y E4). Fueron ensayados algunos metabolitos como Triterpenos y Esteroles (Prueba de Libermann-Buchard según Ramya *et al.*, 2019). Saponinas siguiendo el ensayo de espuma desarrollada en Castro *et al.*, (2011). Identificación de Flavonoides (prueba de Shinoda según Valencia *et al.*, (2017), prueba de ácido sulfúrico concentrado según Rodríguez *et al.*, (2011), prueba de clorhidrato de zinc según Ramya *et al.*, (2019). Sesquiterpenlactonas - Cumarinas la prueba de Baljet, según Castro *et al.*, (2011). Para Taninos se siguió las metodologías de Gelatina/sal y del Cloruro férrico desarrolladas por Ramya *et al.*, (2019). Alcaloides (Ensayo de Mayer, Castro *et al.*, (2011), Método de Dragendorff, Valencia *et al.*, (2017), Prueba de Wagner, Ramya *et al.*, (2019)).

Cuantificación de compuestos fenólico totales: El ensayo de fenoles totales se realizó por el método Folin-Ciocalteu, siguiendo el de García Martínez *et al.*, (2015), con algunas adaptaciones. Se preparó una curva de calibración con 5 patrones (1,0; 2,0; 4,0; 8,0 y 16,0) mg. L⁻¹ de Ácido Gálico en metanol partiendo de una solución madre de 1.000 mg. L⁻¹. El Extracto crudo (Ec) y las fracciones obtenidas anteriormente (E1, E2, E3 y E4)

se realizaron por triplicado con diluciones acorde a las lecturas arrojadas de la curva de calibrado. La lectura se realizó en un Espectrofotómetro UV-Visible marca Thermo Génesys 20S

Cromatografía en capa fina. Se realizaron eluciones utilizando como fase estacionaria placas de Sílica Gel 60 F254 y como fase móvil Tolueno: Acetato de etilo (7:3) y Tolueno: Acetona (7:3). Se empleó una cámara cromatográfica de vidrio de 21,5 cm de altura, 23 cm x 6 cm en el área de la base y en la cara superior. Se trabajó en campana de gases y a temperatura ambiente (25°C). El tiempo de saturación se estimó de 15-20 minutos. Los métodos de revelado fueron, de manera física con luz UV a 254 nm (lámpara mini UV MG/WM), y de manera química con Dragendorff + calor, cloruro férrico (FeCl₃), ácido sulfúrico al 50 % en metanol + vainillina al 1 % en metanol, Anisaldehído – sulfúrico (Heras et al., 2017).

Análisis de estructuras por cromatografía (GC/MS): Los perfiles de compuestos de las diferentes fracciones se determinaron mediante un equipo de cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masas marca Shimadzu QP 2010 SE PLUS. El análisis se realizó en un sistema equipado, utilizando una columna SLB - 5ms (30 m × 0,25 mm, espesor de película de 0,25 μm). El volumen de inyección utilizado fue de 1 μL y la temperatura del inyector de 270 °C con el modo de inyección Splitless, con una relación de división de 10:1. El helio fue el gas portador con un caudal de 1,0 ml min⁻¹ (modo de flujo constante). Programa de Separación de Columna: Horno inicial a 150 °C por 1 min, luego a razón de 3°C hasta 300°C, a razón de 3°C y 300°C por 14 min. Volumen de inyección 1μL.

Prueba de Actividad Antioxidante: Fue realizada primeramente una curva de calibración utilizando como patrón al ácido Ascórbico. Para los patrones de comparación, se preparó una solución Stock de 1 mg. mL⁻¹ de Ácido Ascórbico. A partir de ésta se preparó matraces de concentración que fueron de 0 a 100 μg. mL⁻¹.

Según el método descrito por Brand-Williams, Cuvelier & Berset, (1995), se preparó la solución

de extracto a ensayar y de las fracciones obtenidas, de 100 mg. L⁻¹ en metanol. Fue adicionado a un tubo de ensayo 100 μL de la solución de muestra y 3,9 mL de solución de radical DPPH• en metanol de concentración 0,02 mg. mL⁻¹. Se homogenizó cuidadosamente y se mantuvo en oscuridad durante 1 hora. Posteriormente las lecturas de absorbancia se realizan a 517 nm en un espectrofotómetro UV/VIS marca Thermo Genesys 20S. Los resultados se expresaron como mg de Ácido Ascórbico.g⁻¹ de cada extracto; los valores se presentaron como la media de los análisis realizados por triplicado ± desviación estándar (SD).

Actividad Hemolítica: Éste ensayo fue llevado acabo se acuerdo a lo establecido en Rocha *et al.*, (2012).

Preparación de la muestra de sangre: Se extrajo 5 mL de sangre humana donado por un voluntario y se mezcló con 5 mL de solución anti-coagulante Alsever (2,05 g Dextrosa + 0,8 g Citrato trisodico + 0,055 g Ácido Cítrico + 0,42 g Cloruro de Sodio para 100 mL). La sangre total heparinizada se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 min en una centrífuga marca HERMLE modelo Z-206 A; se eliminó el sobrenadante con cuidado, luego se lavó los eritrocitos con 1 mL de tampón PBS (0,8 g de cloruro de sodio + 0,002g de cloruro de potasio + 0,144 g de fosfato ácido de sodio (Na₂HPO₄) + 0,024 g de fosfato biácido de potasio (KH₂PO₄) para 80 mL de agua estéril. Se ajustó el pH a 7,4 con ácido clorhídrico y completó el volumen a 100 mL) y se centrifugó a 1500 rpm por 15 minutos, se eliminó de nuevo el sobrenadante. Se repitió la operación otras 3 veces más. Luego se tomó 2 mL de los eritrocitos, se colocó en un matraz de 100 mL con tampón PBS, para ser utilizado posteriormente.

Determinación espectrofotométrica de la actividad hemolítica: Del extracto crudo (Ec) y las fracciones obtenidas (E1, E2, E3 y E4): Se pesó 0,1 gramos del extracto crudo en un matraz volumétrico de 100 mL, se agregó 10 mL de etanol absoluto, se llevó al sonicador por 30 minutos y luego a volumen con tampón PBS pH 7,4 obteniéndose una concentración de 1.000 μg. mL⁻¹.

Se ensayaron diluciones seriadas del extracto

crudo Ec, y las fracciones de Éter de petróleo (E1), Diclorometano (E2), Acetona (E3) y Metanol (E4) disueltos en Buffer PBS a partir de una muestra de 1.000 µg/mL, etiquetadas debidamente para evitar confusiones.

Se transfirió 2 mL de la muestra en el tubo de ensayo, al cual se le añadió 2 mL de la solución de eritrocito. Se homogeneizó suavemente y se dejaron reposar por 1 hora en la estufa a 37°C. Transcurrido el tiempo se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm y se procedió a la medición espectrofotométrica de la absorbancia de la solución sobrenadante de cada uno de los tubos a una longitud de onda de 540 nm. La actividad hemolítica se informó en porcentaje de Hemólisis (% Hem.). Como control positivo se utilizó 2 ml de solución al 2% de carbonato de sodio disuelto en tampón PBS. Como control negativo se empleó 2 mL de solución tampón PBS

Actividad Antimicrobiana. Ensayo de Dilución en Microplaca: El ensayo fue realizado siguiendo la metodología descrita por Andrews (2001) con modificaciones. Las cepas microbianas fueron proveídas por el laboratorio de Micología-LAREV de FACEN, conservadas mediante congelación a -70 °C y mediante el sistema de conservación de cultivos bacterianos Cryobank a 4°C. Para el estudio de la actividad antimicrobiana se utilizó los siguientes microorganismos (Cepas bacterianas): *Escherichia coli* WDCM 00012, *Salmonella enterica* WDCM 00031, *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00026, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705, *Enterococcus faecalis* WDCM 00087, *Staphylococcus epidermidis* WDCM 00036 y *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Micrococcus luteus* ATCC4698, *Bordetella bronchiseptica* ATCC19395.

Las cepas de referencia fueron activadas en medio sólido (Agar Mueller–Hinton) mediante la técnica de estrías cruzadas e incubadas de forma invertida durante 24 h a 37 °C en una estufa. Asimismo, se verificó la viabilidad de cada uno de los microorganismos realizando repiques de 18 a 24 h de cultivo. Para su conservación los microorganismos se mantuvieron refrigerados a 4 °C en placas con medio sólido hasta utilizarlos en las pruebas.

Se utilizó como control positivo: Meropenem

(50 mg. mL⁻¹) para bacterias Gram negativas y Ciprofloxacina (25 mg. mL⁻¹) para bacterias Gram positivas. Como control negativo agua purificada.

Preparación del inóculo microbiano (Figura 2).: De un cultivo bacteriano puro de 18 h de



Figura 2. Ensayo de Actividad Antimicrobiana del extracto de *Eryngium horridum*.

crecimiento en placa de Agar Mueller–Hinton (MHA), se seleccionó 3 a 5 colonias bien aisladas y se resuspendió en un tubo con 5 mL de Caldo Müeller-Hinton (CMH), se agitó y ajustó la turbidez a 0,5 McFarland (108 UFC/mL). Dentro de los 15 minutos al ajuste de turbidez, se realizó diluciones seriadas de 1:10 (1 mL de suspensión en 9 mL de caldo) hasta alcanzar una concentración de 10^6 UFC/mL. La última dilución se utilizó para inocular los pocillos.

Ensayo de efectividad antimicrobiano: El inóculo se adicionó dentro de los 15 minutos posteriores a su ajuste. Cada pocillo con la solución del extracto (1000 µg/mL) se inoculó con 100 µL de la suspensión bacteriana, obteniendo un volumen final por pocillo de 200 µL y una dilución 1:2 de las concentraciones bacterianas (5×10^4 UFC/mL), extracto y dimetilsulfóxido (DMSO) 5%.

Se incluyó en la microplaca los siguientes controles: (1) Control de crecimiento (control negativo): caldo con 5% de DMSO más inóculo; (2) Control de inhibición (control positivo): caldo con antibiótico más inóculo; (3) Control de esterilidad: caldo sin inocular. Luego se tapó para evitar la deshidratación durante la incubación por 16 horas

a 37 °C.

Una vez transcurrido el tiempo de la incubación, se midió la absorbancia con un lector de microplacas (Elisa SPR-960) a 620 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano.

Resultados y discusión

Extracto Bruto: Del total de raíz colectada (477 g) se obtuvo 69,642g de extracto crudo etanólico equivalente a 14,6% p/p a partir de una maceración en frío con etanol al 96%. De la partición con Solventes a partir del extracto crudo se obtuvieron 2,859g de extracto soluble en éter de petróleo (E1), 0,2578g de extracto soluble en diclorometano (E2) y 0,2144g de extracto soluble en acetona (E3) y 1,6694g de extracto soluble en metanol (E4).

Ensayo Cualitativo: En la evaluación cualitativa preliminar se observó la presencia de alcaloides, saponinas, sesquiterpenlactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides y flavonoides como principales metabolitos (Tabla 1). En las reacciones de Wagner, Mayer y Dragendorff, revelaron presencia de Alcaloides tanto en el extracto crudo (Ec) como en las fracciones E1 y E4. La fracción E2 fue parcialmente

Tabla 1. Resumen de resultados de Perfil Fitoquímico.

| METABOLITOS | PRUEBAS | EXTRACTOS | | | | |
|---------------------------|---------------------|------------|-----------------------|--------------------|--------------|--------------|
| | | Crudo (Ec) | Eter de Petróleo (E1) | Diclorometano (E2) | Acetona (E3) | Metanol (E4) |
| ALCALOIDES | Dragendorff | +++ | + | - | - | +++ |
| | Mayer | + | + | - | - | + |
| | Wagner | +++ | ++ | + | - | + |
| CUMARINAS | Baljet | +++ | - | + | + | + |
| SAPONINAS | Espuma | +++ | + | - | - | - |
| FLAVONOIDES | Shinoda | - | - | - | - | - |
| | Zn | - | - | - | - | - |
| | H2SO4 | +++ | + | + | ++ | +++ |
| TRITERPENOS Y/O ESTEROLES | Liebermann-Burchard | +++ | +++ | +++ | ++ | + |
| TANINOS | FeCl3 | + | - | - | - | - |
| | Gelatina sal | - | - | - | - | - |
| SESQUITERPEN LACTONAS | Baljet | +++ | - | + | + | + |

positiva, solo la reacción de Wagner identificó la presencia de alcaloides. Y en la fracción de acetona (E3) no fue posible identificar estos metabolitos. Daneshzadeh *et al.*, (2020), mencionó que habitualmente, la mayoría de los extractos de plantas medicinales y aromáticas contienen alcaloides. Otros investigadores como Erdem *et al.*, (2015) y Wang *et al.*, (2012), confirmaron la existencia de fitoquímicos con actividad farmacológica, específicamente flavonoides y ácidos fenólicos con plantas del género *Eryngium*.

De acuerdo a lo reportado de las partes subterráneas (raíces) de *Eryngium*, evidenció la presencia de saponinas triterpénicas, glucósidos monoterpénicos, compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos, derivados de cumarinas, ésteres de aldehído terpénico, acetilenos, aceite esencial y oligosacáridos (Erden *et al.*, 2015), que está en concordancia con los resultados obtenidos. Además, se detectó la presencia de triterpenlactonas y cumarinas con el método de Baljet, característico para ambos metabolitos, la presencia de ambos compuestos coincidió con lo mencionado por Erden *et al.*, (2015).

Los valores de compuestos fenólicos totales fueron de $20,0 \pm 0,70$ mg de Ac. Gálico. g^{-1} en el extracto crudo (Ec), $13,0 \pm 0,26$ mg de Ac. Gálico. g^{-1} en la fracción de Éter de petróleo (E1), $74,2 \pm 2,92$ mg de Ac. Gálico. g^{-1} en la fracción de Diclorometano (E2), $160,6 \pm 3,95$ en la fracción de Acetona (E3) y $14,0 \pm 0,06$ mg de Ac. Gálico. g^{-1} en la fracción de Metanol (E4). Con éstos resultados se observó que la mayor concentración de compuestos fenólicos se encontró en el extracto E3. Algunos investigadores han encontrado compuestos fenólicos en otras especies de *Eryngium*, por ejemplo, Daneshzadeh, *et al.*, (2020) en los extractos de *Eryngium billardieri* obtuvieron los fenoles totales en los extractos con las diferentes concentraciones que variaron de 10.71 a 33.38 mg GAE. g^{-1} extracto seco. Marčetić *et al.*, (2014), estableció la composición de extractos en metanol y cloroformo de las partes aéreas y raíces de *Eryngium palmatum* y han encontrado que el contenido de fenoles totales en el extracto metanólico de partes aéreas ($29,0 \pm 2,0$ mg AG. g^{-1})

fue mayor que en el extracto metanólico de raíces ($13,9 \pm 1,0$ mg AG. g^{-1}). Ayuso *et al.*, (2020), ha demostrado que los ácidos fenólicos fueron los compuestos preponderantes en ambos órganos de *Eryngium viviparum* con $38,3 \pm 0,8$ mg. g^{-1} y 102 ± 4 mg. g^{-1} de extracto de partes aéreas y radicales, respectivamente.

Se efectuó el análisis de los compuestos mayoritarios en la fracción E1 (solución preparada con Hexano, 1mg E1. mL^{-1}), entre los cuales se encontraron, ácidos carboxílicos, lactona, ésteres y alcoholes. Se evidenció la presencia de 2(3H)-furanona, 5-hexildihidro (97%) o γ -lactona. Landoulsi *et al.* (2020) estudió 8 especies de *Eryngium* de la ciudad de Túnez identificando en el extracto de éter de petróleo de partes aéreas principalmente sesquiterpenos oxigenados analizados por GC/MS que fueron diferentes a las identificadas en este trabajo. Sin embargo, los compuestos como el ácido hexadecanoico y ácido linoleico identificado en la fracción E1 de *E. horridum* también fueron identificados por Marčetić *et al.* (2014) en el extracto de cloroformo de partes aéreas y de las raíces de *Eryngium palmatum*.

En la fracción del Extracto Crudo soluble en Diclorometano (2mg E2. mL^{-1}), se identificó por comparación con la librería de masas del NIST alrededor de 11 compuestos, entre ellos lactona, aldehído, fenol, alcohol, amida, y como compuestos mayoritarios de ésta fracción la 2,5-pirrolidindion y 2(3H)-furanona, 5-hexildihidro ambos con 98% de similitud, seguido del Ftalato de mono(2-etilhexilo) (97 %).

En la fracción E3 soluble en Acetona (1mg. mL^{-1}), se observaron 39 picos identificados por CG/MS, que fueron comparados con la base de datos de la biblioteca del NIST, y los que en su mayoría correspondieron a compuestos como alcoholes, cetonas y ésteres. El compuesto con mayor porcentaje de homología fue el Ácido benzoico, 2-hidroxi-, éster metílico (98%), luego le sigue el Ácido 1,2-bencenodicarboxílico, éster dibutílico, con 97% de similitud.

En la fracción soluble del extracto crudo en Metanol-E4 (1mg. mL^{-1}), se pudieron identificar

Tabla 2. Resultados de actividad antimicrobiana de las raíces de *E. horridum* Malme. El control positivo dio 100 % y el negativo 0 % para todas las cepas. Control negativo: agua purificada. Control positivo Meropenem (50mg/mL) para Gram negativas, y Ciprofloxacina (25mg/mL) para Gram positivas.

| Microorganismos | % inhibición | | | | |
|-----------------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|
| | Ec | E1 | E2 | E3 | E4 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 48,10 ±2,6 | 29,10 ±1,1 | 31,60 ±2,1 | 46,80 ±7,8 | 18,50 ±3,1 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 20,30 ±11 | 21,10 ±5,7 | 14,70 ±0,9 | 20,20 ±2,4 | 26,00 ±0,3 |
| <i>Micrococcus Luteus</i> | 12,20 ±20 | 25,10 ±16 | 20,50 ±1,3 | 27,60 ±1,9 | 25,70 ±1,3 |
| <i>E. coli</i> | 6,64 ±1,3 | 0 | 9,06 ±1,3 | 0,65 ± 0,1 | 5,63 ±1,1 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 3,30 ±0,9 | 6,80 ±7,0 | 16,20 ±4,7 | 0 | 0 |
| <i>Bordetella Bronchiseptica</i> | 11,80 ±19 | 19,60 ±3,0 | 34,20 ±4,6 | 39,90 ±5,1 | 31,30 ±1,1 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 15,40 ±1,3 | 21,10 ±2,6 | 27,40 ±1,3 | 35,10 ±3,1 | 27,90 ±3,9 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2,50 ±0,5 | 11,00 ±0,6 | 17,60 ±0,5 | 24,30 ±3,4 | 24,00 ±0,6 |
| <i>Pseudomonas aeruginosas</i> | 34,40 ±4,2 | 41,30 ±0,7 | 70,10 ±6,5 | 46,40 ±2,6 | 38,30 ±1,4 |
| <i>Salmonella entérica</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

16 compuestos, entre ellos alcoholes y aldehídos. El compuesto con mayor porcentaje de similitud fue el 5-Eicoseno, (E) con 98%, luego le siguen el 7-hexadeceno, (Z), el 5-Octadeceno y el 1-docoseno todos con 97% de similitud.

Actividades Biológicas

Prueba de Actividad Antioxidante: Entre los resultados obtenidos, el mayor porcentaje de actividad antioxidante presentó la fracción soluble en Acetona (E3) 20,49 %, con el cual se encontró en concordancia con los resultados de compuestos fenólicos totales ensayados. Algunos autores también han encontrado actividad antioxidante en diferentes especies de *Eryngium*; como Daneshzadeh *et al.*, (2020) en partes aéreas de *Eryngium billardieri*, Ayuso *et al.*, (2020) en partes aéreas y radicales de *E. viviparum*, Barajas *et al.*, (2016) en aceite de semilla de *Eryngium carlinae* F. Delaroché, y Wojtanowski *et al.*, (2013) en *E. amethystinum* L. y *E. planum* L, como así también en este trabajo para el *E. horridum* se ha encontrado actividad antioxidante en las raíces.

Prueba de Actividad Antimicrobiana: La ac-

tividad antimicrobiana de extractos de *E. horridum* fue investigado contra diez cepas bacterianas. Tanto el Ec (1mg. mL⁻¹) como cada una de las fracciones (1mg. mL⁻¹), no revelaron actividad inhibitoria contra *Salmonella entérica*. Así mismo no inhibió el crecimiento de la *Salmonella typhimurium* las fracciones E3 y E4, pero el Ec, E1 y E2 si mostraron una débil actividad inhibitoria contra la misma cepa. Con todos los demás microorganismos hubo un porcentaje de inhibición. Los que tuvieron mayor sensibilidad contra *Staphylococcus aureus* fueron el Ec (48,10 ±2,6) % y E3 (46,80 ±7,8) %, mientras que con *Pseudomonas aeruginosas* E2 (70,10 ±6,5) % tuvo una gran influencia inhibitoria sobre el crecimiento de la cepa (Tabla 2).

Los Extractos de *Eryngium* spp. expresaron una amplia actividad antimicrobiana hacia una serie de bacterias y hongos (Erdem *et al.*, 2015). Los extractos hidroetanólicos de *E. maritimum*, *E. planum* y *E. campestre* (Thiem *et al.*, 2010) y la fracción apolar de un extracto metanol-cloroformo-acuoso de *E. maritimum* (Meot-Duros *et al.*, 2008) mostraron actividad antibacteriana contra *B. cereus* y *S. aureus* y actividad antifúngica contra *A. niger*. Los extractos metanólicos y de cloroformo de hojas y raíces

de *E. palmatum* también demostraron actividad contra *S. aureus* y *E. coli* (Marčetić *et al.*, 2014). Así también se observó la actividad antimicrobiana de *E. horridum* contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Actividad Hemolítica: Se obtuvieron porcentajes de actividad hemolítica para el extracto crudo Ec, que fueron desde 21,3 % hasta 99 %, y también se observó que a medida que se incrementó la concentración del extracto también aumentó el porcentaje de actividad. La fracción soluble en Éter de petróleo (E1) presentaron porcentajes de actividad hemolítica similares entre las diferentes concentraciones ensayadas, que fueron desde 19,0 % (30 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) a 22,1% (60 $\mu\text{g. mL}^{-1}$).

Las diferentes concentraciones de extractos y fracciones utilizadas mostraron actividad hemolítica (AH) contra eritrocitos humanos, lo cual se observó con el aumento de la absorbancia de cada concentración. Se evidenció que el extracto crudo (Ec-95 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) y la fracción de acetona (E3-130 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) mostraron una capacidad significativa para lisar glóbulos rojos. La fracción E1 mostró baja acción hemolítica con 22%, pocas variaciones de actividad entre las concentraciones que fueron de 30 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ a 60 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (19,0% AH a 22,1% AH). Fracciones E2 y E4 se ensayaron en las concentraciones de 10,0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ a 60,0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ presentando porcentajes de hemólisis por debajo del 5%. Por lo tanto, se manifestó que la presencia de compuestos citotóxicos como alcaloides, saponinas y compuestos fenólicos (Dewick, 2002) identificados en el ensayo cualitativo debió estar en mayor concentración en el extracto crudo (Ec) y en la fracción acetona (E3).

Conclusiones

La especie estudiada fue identificada como *Eryngium horridum* Malme, de la cual fue realizada sus características, esta especie pertenece a la familia Apiaceae. Este es el primer trabajo donde se demostró sus propiedades antioxidantes, antimicrobianos y hemolíticas.

El ensayo del Perfil Fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, saponinas, sesquiterpenlactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides y flavonoides

como principales metabolitos. Se determinó la concentración de fenoles totales de los cuales el de mayor concentración fue en la fracción soluble en Acetona (E3). El análisis del perfil de compuestos por GC/MS arrojó como resultado la presencia de compuestos como lactonas, fenoles, ésteres, aldehídos, cetonas, amidas, alcoholes, alcanos y alquenos.

La actividad antimicrobiana del extracto crudo y las fracciones mostraron heterogéneas características inhibitorias, siendo E2 la de mayor inhibición del crecimiento (70,1 %) contra *P. aeruginosa*. La actividad antioxidante (expresada en mg Ac. Ascórbico. L^{-1}), presentó mayor porcentaje de actividad la fracción soluble en Acetona (E3) 20,49 %, el cual se encontró en concordancia con los resultados de compuestos fenólicos totales ensayados. La fracción soluble en Éter de petróleo no mostró actividad antioxidante. El extracto crudo y la fracción E3 tuvieron buena acción hemolítica con la mejor actividad a la concentración de 95 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ y 130 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivamente, mientras que los demás extractos no resultaron en actividad expresiva.

Agradecimientos

Al Decano MSc. Constantino Nicolás Guefos, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por el espacio para la realización de este trabajo, al laboratorio de Productos Naturales, laboratorio de Micología, laboratorio de Biotecnología y laboratorio de Instrumental. A la Prof. Dra. Cristina Mayumi Sasaki Miyazaki por aportar su experiencia y conocimientos del tema para la elaboración y ejecución de éste trabajo. Al MSc. Francisco Paulo Ferreira Benítez por su apoyo en la realización e interpretación de los resultados.

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron de manera equitativa en la elaboración de este artículo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento

Fuente de financiamiento propia.

Literatura citada

- Ayuso, M., Pinela, J., Dias, M. I., Barros, L., Ivanov, M., Calhella, R.C., Soković, M., Ramil-Rego, P., Barreal, M.E., Gallego, P.P. & Ferreira, I.C.F.R. (2020). Phenolic composition and biological activities of the in vitro cultured endangered *Eryngium viviparum* J. Gay. *Industrial Crops and Products*, 148(112325): 1–7.
- Andrews, J.M. (2001). Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(Suppl. 1): 5–16.
- Castro, R.T., Verdecia, E.A., & Tamayo, I.M. (2011). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. *Multimed*, 15(3): 8 pp.
- Daneshzadeh, M. S., Abbaspour, H., Amjad, L., & Nafchi, A. M. (2020). An investigation on phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of extract from *Eryngium billardieri* F. Delaroché. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2): 708–715.
- Dewick, P.M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Hoboken: John Wiley & Sons. 507 pp.
- Erdem, S.A., Nabavi, S.F., Orhan, I.E., Daglia, M., Izadi, M., & Nabavi, S.M. (2015). Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1) PMC4678568: 1–22.
- Frete, F. (2010). *Plantas medicinales y aromáticas: una alternativa de producción comercial*. Asunción: USAID - Paraguay Vende. 60 pp.
- Foresto, E., Arditi, M. P., Cogno, I. S., & Ibarra, L. E. (2021). Drogas verdes y terapia fotodinámica: una alianza prometedora en la lucha contra el cáncer. *Boletín Biológica*, 45: 4–9.
- García Martínez, E., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. [Folleto Académico]. Valencia: Departamento de Tecnología de Alimentos, ETSIAMN, Universitat Politècnica de València. 9 pp.
- Hernández Villarreal, P.E. (2020). Obtención de extractos etanólicos de *Eryngium foetidum* y determinación de actividad antioxidante *in vitro*. [Tesis de Ingeniería Bioquímica]. Teapa: Instituto Tecnológico Superior de la Región Sierra. viii + 53 pp.
- Landoulsi, A., Hennebelle, T., Bero, J., Rivière, C., Sahpaz, S., Quetin-Leclercq, J., Neut, C., Benhamida, J. & Roumy, V. (2020). Antimicrobial and light-enhanced antimicrobial activities, cytotoxicity and chemical variability of all tunisian *Eryngium* species. *Chemistry & Biodiversity*, 17(4)e1900543.
- Marčetić, M., Petrović, S., Milenković, M. & Niketić, M. (2014). Composition, antimicrobial and antioxidant activity of the extracts of *Eryngium palmatum* Pančić and Vis. (Apiaceae). *Open Life Sciences*, 9(2): 149–155.
- Meot-Duros, L., Le Floch, G. & Magné, C., (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2): 258–262.
- OMS. (1998). *Situación regulatoria de los medicamentos a base de hierbas: una reseña mundial*. Washington: Organización Mundial de la Salud. *World Health Organization Program on Traditional Medicine*, 98.1: viii + 55 pp.
- Ramya, P., Vasanth, P.M., Prasad, P.V. & Babu, S.V. (2019). Qualitative phytochemical screening of *Alpinia galanga* L. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 8(5): 1064–1077.
- Rodríguez, R.G., González, G.M., Verde, M.J., Morales, M.E., Rivas, M. C., Oranday, A., Núñez, M.A. & Treviño, N. J. F. (2011). Bioprospección de la actividad antimicrobica de extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Ariocarpus retusus*. *Polibotánica*, (31): 143–155.
- Rocha, T.D., Vieira, P.B., Gnoatto, S.C.B., Tasca, T. & Gosmann, G. (2012). Anti-*Trichomonas*

- vaginalis* activity of saponins from *Quillaja*, *Passiflora*, and *Ilex* species. *Parasitology Research*, 110(6): 2551–2556.
- Soria, N. (2018). Las Plantas Medicinales y su aplicación en la Salud Pública. *Revista de Salud Pública del Paraguay*, 8(1): 7–8.
- Thiem, B., Goslinska, O., Kikowska, M., & Budzianowski, J. (2010). Antimicrobial activity of three *Eryngium* L. species (Apiaceae). *Herba Polonica*, 56(4): 52–59.
- Wang, P., Su, Z., Yuan, W., Deng, G. & Li, S. (2012). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceutical Crops*, 3: 99–120.
- Valencia, M., Ancona, J., Reyes, J., García, M., & León, F. (2017). Evaluación de los metabolitos del Noni (*Morinda citrifolia*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 4(4): 16–22.
- Wojtanowski, K.K., Skalicka-Woźniak, K., Głowniak, K. & Mroczek, T. (2013). Screening of the antioxidant potentials of polar extracts from fruits of *Eryngium planum* and *Eryngium amethystinum* using the β -carotene-linoleic acid assay. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 26(3): 276–278.