



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

“Actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas de dos especies endémicas del Perú: *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis*”

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica

AUTOR

Miluzka Rocio LUNA APAZA

ASESORES

Mg. Julio Reynaldo RUIZ QUIROZ

Dr. César Máximo FUERTES RUITÓN (Coasesor)

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

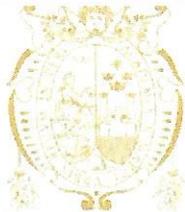
Referencia bibliográfica

Luna M. Actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas de dos especies endémicas del Perú: *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis* [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2020.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

INFORMACIÓN GENERAL	
Título del Proyecto	Actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas de dos especies endémicas del Perú: <i>Lomanthus tovari</i> y <i>Lomanthus yauyensis</i>
Área de investigación (*)	Ciencias de la Salud
Líneas de Investigación (*)	Plantas medicinales con potencial antioxidante y antibacteriano: (análisis fitoquímico preliminar, determinación de la actividad antioxidante, determinación de la actividad antibacteriana)
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación (incluir localidades y/o coordenadas geográficas)	En la facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, en el laboratorio del instituto de investigación de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo" y en el laboratorio del instituto de investigación de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara"
Institución que financia si corresponde	No corresponde
Año o rango de años que abarcó	2018 - 2019
DATOS DEL TESISISTA	
Apellidos y Nombres	Luna Apaza Miluzka Rocio
Número de matrícula	12040070
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresada
Código ORCID (opcional)	-
DATOS DEL ASESOR I	
Apellidos y nombres	Ruiz Quiroz Julio Reynaldo
Código docente: 0A1064	Categoría: Asociado Clase: tiempo completo
Máximo grado alcanzado	Magister
Código ORCID (obligatorio)	0000-0003-4176-1618
Título profesional	Químico Farmacéutico
Departamento Académico al que pertenece	Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada
Instituto de Investigación al que pertenece	Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo"
Grupo de investigación al que pertenece indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Biofilms bacterianos en el Perú / Miembro
DATOS DEL ASESOR II	
Apellidos y nombres	Fuertes Ruitón César Máximo

Código docente: 027154	Categoría: Principal	Clase: D.E.
Máximo grado obtenido	Doctor	
Título profesional	Químico Farmacéutico	
Código ORCID (obligatorio)	0000-0002-6170-3549	
Centro laboral (si es que fuera externo a la UNMSM)	-	
Departamento Académico al que pertenece	Química Básica y Aplicada	
Instituto de Investigación al que pertenece	Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara"	
Grupo de investigación al que pertenece	Nature / Natural Resources Research	
Indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Coordinador	



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas de dos especies endémicas del Perú: *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis*"

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

MILUZKA ROCIO LUNA APAZA

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

DIECISIETE (17) SOBRESALIENTE

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 13 de febrero de 2020.


Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Presidente


Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Miembro


Mg. Francisco Javier María Ramírez Cruz
Miembro


Mg. Gloria Clotilde Gordillo Rocha
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"



*A mi mamá Nelly y mi papá Luis que fueron mis
ejemplos a seguir.*

*A mi tía Inés por hacer posible mi desarrollo
profesional.*

A mi hermano por su apoyo incondicional.

*A mis mascotas Poli y Doki que me brindaron una
niñez con alegrías.*

AGRADECIMIENTOS

Al Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz por su guía en el desarrollo del presente trabajo.

A mi co-asesor, Dr. César Máximo Fuertes Ruitón por sus enseñanzas y apoyo.

A la facultad de pregrado de farmacia y a todos sus docentes.

Al personal administrativo por su eficacia en los trámites.

INDICE

Índice de figuras.....	vii
Índice de tablas.....	ix
Índice de abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xii
Summary.....	xiii
I. Introducción.....	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos específicos.....	2
1.3. Hipótesis.....	2
II. Generalidades.....	3
2.1. Antecedentes generales.....	3
2.2. Marco teórico.....	8
2.2.1. Plantas medicinales.....	8
2.2.2. Familia Asteraceae.....	9
2.2.3. Género <i>Lomanthus</i>	10
2.2.4. Plantas medicinales en estudio	10
2.2.4.1. <i>Lomanthus tovari</i>	10
2.2.4.2. <i>Lomanthus yauyensis</i>	10
2.2.5. Extractos naturales.....	10
2.2.6. Metabolitos secundarios.....	11
2.2.6.1 Compuestos fenólicos.....	12
2.2.6.2 Taninos.....	12
2.2.6.3 Flavonoides.....	13
2.2.6.4 Alcaloides.....	14

2.2.7. Radicales libres.....	14
2.2.8. Estrés oxidativo.....	15
2.2.9. Actividad antioxidante.....	15
2.2.10. Métodos para medir la actividad antioxidante.....	15
2.2.11. Actividad antibacteriana.....	18
2.2.12 Microdilución.....	19
2.2.13 Bacillus cereus.....	20
III. Parte experimental.....	21
3.1 Materiales, reactivos y equipos.....	21
3.2 Metodología.....	22
3.2.1 Recolección e identificación de las especies del estudio.....	22
3.2.2 Acondicionamiento de la muestra.....	22
3.2.3 Preparación de los extractos.....	23
3.2.4 Análisis fitoquímico preliminar.....	23
3.2.5 Determinación de la actividad antioxidante.....	24
3.2.5.3 Análisis estadístico de la actividad antioxidante.....	27
3.2.6 Determinación de la actividad antibacteriana.....	28
IV. Resultados.....	31
4.1 Análisis fitoquímico preliminar.....	31
4.2 Actividad antioxidante.....	32
4.3 Análisis estadístico.....	38
4.4 Actividad antibacteriana.....	41
V. Discusión.....	43
VI. Conclusiones.....	47

VII. Referencias bibliográficas.....	49
VIII. Anexos.....	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Compuestos fenólicos simples con grupos hidroxilo en diferentes posiciones	12
Figura 2	Estructura química de la Procianidina B2. Tanino condensado de gran tamaño	13
Figura 3	Estructura básica de un flavonoide	13
Figura 4	Reacción del DPPH con la sustancia reductora o antioxidante	16
Figura 5	Estructura química del radical DPPH	17
Figura 6	Estructura química del ABTS	17
Figura 7	Reacción entre el ABTS y una sustancia antioxidante	18
Figura 8	Métodos para el estudio de la actividad antibacteriana	19
Figura 9	Célula activa causando la reducción de la resazurina	19
Figura 10	Correlación entre % de captación de DPPH del estándar vitamina C vs las concentraciones	33
Figura 11	Correlación entre % de captación de DPPH del extracto etanólico de <i>Lomanthus tovari</i> vs las concentraciones	34
Figura 12	Correlación entre % de captación de DPPH del extracto etanólico de <i>Lomanthus yauyensis</i> vs las concentraciones	35
Figura 13	Correlación entre % de captación de ABTS del estándar Trolox® vs las concentraciones	36

Figura 14	Correlación entre % de captación de ABTS del extracto etanólico de <i>Lomanthus tovari</i> vs las concentraciones	37
Figura 15	Correlación entre % de captación de ABTS del extracto etanólico de <i>Lomanthus yauyensis</i> vs las concentraciones	38
Figura 16	Placa de 96 pocillos con los extractos de ambas plantas frente a frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853.	41
Figura 17	Placa de 96 pocillos con los extractos de ambas plantas frente a frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	42
Figura 18	Placa de 96 pocillos con los extractos de ambas plantas frente a <i>Bacillus cereus</i> cepa alimentaria.	42
Figura 19	Acondicionado de ambas plantas en el que se seleccionaron las hojas de <i>L.</i> y a la izquierda y de <i>L.t</i> a la derecha.	66
Figura 20	Secado de las plantas en estufa	66
Figura 21	Filtración de los macerados etanólicos	67
Figura 22	Obtención de los extractos etanólicos secos	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Concentraciones finales preparadas de las muestras en estudio.	25
Tabla 2	Concentraciones finales preparadas de estándar vitamina C	25
Tabla 3	Concentraciones finales preparadas de las muestras en estudio.	27
Tabla 4	Concentraciones finales preparadas del estándar Trolox®	27
Tabla 5	Concentraciones finales para ambas muestras en estudio	28
Tabla 6	Posicionamiento de todos los reactivos utilizados en la bandeja de microdilución colorimétrica	29
Tabla 7	Tabla comparativa de análisis fitoquímico de los extractos etanólicos de las hojas de <i>Lomanthus tovari</i> y <i>Lomanthus yauyensis</i>	31
Tabla 8	Capacidad antioxidante del estándar de vitamina C con DPPH	32
Tabla 9	Capacidad antioxidante del extracto de <i>Lomanthus tovari</i> con DPPH	33
Tabla 10	Capacidad antioxidante del extracto de <i>Lomanthus yauyensis</i> con DPPH	34
Tabla 11	Capacidad antioxidante del estándar Trolox® con ABTS	35
Tabla 12	Capacidad antioxidante del extracto de <i>Lomanthus tovari</i> con ABTS.	36
Tabla 13	Capacidad antioxidante de <i>Lomanthus yauyensis</i> con ABTS.	37

Tabla 14	Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados con el método DPPH para el extracto de <i>Lomanthus tovari</i>	39
Tabla 15	Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados con el método DPPH para el extracto de <i>Lomanthus yauyensis</i>	39
Tabla 16	Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados con el método ABTS para el extracto de <i>Lomanthus tovari</i>	40
Tabla 17	Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados con el método ABTS para el extracto de <i>Lomanthus yauyensis</i> .	40
Tabla 18	Prueba de Tukey para el ensayo de DPPH de <i>Lomanthus tovari</i>	58
Tabla 19	Prueba de tukey para el ensayo de DPPH de <i>Lomanthus yauyensis</i>	60
Tabla 20	Prueba de tukey- para el ensayo de ABTS de <i>Lomanthus tovari</i>	62
Tabla 21	Prueba de tukey para el ensayo de ABTS de <i>Lomanthus yauyensis</i> .	64

INDICE DE ABREVIATURAS

L: *Lomanthus*, Género de la familia Asteraceae

L.t.: *Lomanthus tovari*

L. y.: *Lomanthus yauyensis*

DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

CFI: Concentración Mínima Inhibitoria

Trolox: Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

ATCC: Colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection)

R.L: Radicales Libres

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

B. cereus: *Bacillus cereus*

E. coli: *Escherichia coli*

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

CP:

Ciprofloxacino

M: Muestra en estudio

UFC: Unidad formadora de colonias

RESUMEN

La presente tesis ha determinado el efecto antioxidante y antibacteriano de los extractos etanólicos de las hojas de *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis*. El análisis fitoquímico preliminar detectó alcaloides, taninos y esteroides en ambas especies. Por los métodos de ABTS y DPPH se evaluó la actividad antioxidante. Se utilizó la microdilución colorimétrica para determinar la actividad antibacteriana contra las bacterias *Bacillus cereus* cepa alimentaria, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados obtenidos con ABTS fueron un IC₅₀ de 73,44 µg/mL y 126,43 µg/mL para *L. tovari* y *L. yauyensis* respectivamente, mientras que para el estándar de Trolox® se obtuvo un IC₅₀ de 2,54 µg/mL y con DPPH se consiguió un IC₅₀ de 45,9 µg/mL para *Lomanthus tovari* y un IC₅₀ de 85,81 µg/mL para *Lomanthus yauyensis*, la sustancia de referencia vitamina C presentó un IC₅₀ de 1,31 µg/mL. En el ensayo de la actividad antibacteriana solo se obtuvo un resultado significativo con una CMI de 1 000 µg/mL para el extracto de *L. yauyensis* frente a *Bacillus cereus* cepa alimentaria, el extracto de *L. tovari* obtuvo una CMI de 4 000 µg/mL frente a la misma cepa. Se concluye que los extractos etanólicos de ambas especies vegetales presentan actividad antioxidante y antibacteriana frente a *Bacillus cereus* cepa alimentaria.

Palabras clave: *Lomanthus tovari*, *Lomanthus yauyensis*, actividad antibacteriana, actividad antioxidante.

SUMMARY

This thesis has determined the antioxidant and antibacterial effect of the ethanol extracts of the leaves of *Lomanthus tovari* and *Lomanthus yauyensis*. The preliminary phytochemical analysis detected alkaloids, tannins and steroids in both species. The antioxidant activity was evaluated by ABTS and DPPH methods. Colorimetric microdilution was used to determine antibacterial activity against the bacteria *Bacillus cereus* food strain, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. The results obtained with ABTS were an IC50 of 73,44 µg/mL and 126,43 µg / mL for *L. tovari* and *L. yauyensis* respectively, while for the Trolox® standard an IC50 of 2,54 µg / mL and with DPPH an IC50 of 45,9 µg/mL was achieved for *Lomanthus tovari* and an IC50 of 85,81 µg / mL for *Lomanthus yauyensis*, the vitamin C reference substance presented an IC50 of 1,31 µg/mL. In the antibacterial activity test, only a significant result was obtained with a MIC of 1 000 µg/mL for the extract of *L. yauyensis* against *Bacillus cereus* food strain, the extract of *L. tovari* obtained a MIC of 4 000 µg/mL against the same strain. It is concluded that the ethanolic extracts of both plant species have antioxidant and antibacterial activity against *Bacillus cereus* food strain.

Key words: *Lomanthus tovari*, *Lomanthus yauyensis*, antibacterial activity, antioxidant activity.

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia que adquieren las bacterias a los antibióticos es uno de los mayores problemas actuales en el campo de la salud y del tratamiento de enfermedades. Infecciones leves como las de alto riesgo van haciéndose más complicadas de tratar tanto en países en desarrollo como en los desarrollados ^{1, 2}. El problema se extiende con el tiempo e informes muestran que fármacos como fluoroquinolonas y cefalosporinas ya no resultan ser efectivos en el tratamiento contra bacterias Gram negativas. De la misma forma el mal manejo de los antibióticos convencionales utilizados en el tratamiento contra bacterias Gram positivas ha hecho que se vuelva obsoleto³.

Por lo antes expuesto es que se ha visto la necesidad de búsqueda de nuevas fuentes antimicrobianas, encontrándose en las plantas un futuro promisorio debido a su contenido de metabolitos secundarios ⁴. Como muestra de ello y derivado de los estudios realizados, se conoce que especies de la familia Asteraceae poseen utilidad industrial ya sea alimentaria, farmacológica, entre otras, que son aprovechables por el hombre.⁵

De este modo se tienen estudios in vitro de extractos y/o aceites esenciales de especies del género *Senecio* (del cual fue segregado el género *Lomanthus*) que muestran actividad bacteriostática y/o bactericida contra cepas patógenas ⁶⁻¹²; por lo que su estudio y determinación de componentes activos resulta importante. Es así que el presente estudio busca determinar la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas de las plantas *Lomanthus tovari* y *Lomanthus*

yauyensis.

1.1. Objetivo general

Determinar la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas de las plantas *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis*.

1.2. Objetivos específicos

1. Realizar el análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de las hojas de *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis*.
2. Determinar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de las hojas de *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis* por el método del radical DPPH y ABTS.
3. Determinar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas de *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis* por el método de microdilución colorimétrica.

1.3. Hipótesis

Los extractos etanólicos de las hojas de las plantas *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis* tienen actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro*.

II. GENERALIDADES

2.1. Antecedentes generales

El uso irracional de los fármacos antibacterianos es una de las causas que ha agravado si es que no generado este problema, haciendo mención a que el uso irracional hace referencia a no utilizar el fármaco para la infección a la que se recomienda, o utilizar antibacterianos en casos que no son necesarios como por ejemplo la mala costumbre que se tiene de prescribir o recomendar la administración de fármacos antibacterianos para el tratamiento de una gripe viral; también uso irracional hace referencia a utilizar el fármaco a dosis mayores a las necesarias, o automedicarse, o incluso algo muy común observado en la sociedad es el uso de medicamentos por sugerencia de familiares o amigos que tuvieron una afección parecida o igual y que les resultó efectivo, sin embargo esto no garantiza que el mismo fármaco tenga la misma efectividad, ya que hay otros factores como dosis, sexo, edad, enfermedades concomitantes que determinarán el resultado positivo o negativo en el tratamiento de una enfermedad o infección en particular. Todos estos factores que involucran un desconocimiento en el uso de fármacos contribuyen al uso irracional de los mismos, generando en el caso de los antibacterianos y su mal uso, la resistencia bacteriana, es decir que las bacterias se van haciendo menos sensibles al efecto del fármaco. Esto lo logran desarrollando mecanismos celulares que le permiten inhibir al fármaco, transformarlo o metabolizarlo cuando se encuentra intracelularmente, o desarrollan mecanismos para expulsar a dicho medicamento cuando atraviesa la membrana o pared celular. Por

lo tanto, el uso irracional de antibacterianos y el desarrollo de mecanismos de resistencia como los anteriormente expuestos han hecho que fármacos convencionales utilizados en el tratamiento de infecciones bacterianas ya no sean efectivos como en décadas pasadas para destruir o detener la proliferación bacteriana ya que estas han descubierto vías para evadir la acción de dichos fármacos. Es así que ante esta problemática, es que se requiere de fuentes alternativas para combatir enfermedades de infección bacteriana. Fuentes que no sean familiares o conocidas por las bacterias, para que de este modo no puedan evadir la acción antibacteriana.

Otra de las preocupantes al momento de iniciar una terapia antibacteriana es que los fármacos a utilizarse son de origen sintético, siendo si bien es cierto de acción potente, pero presentando una desventaja muy característica al momento de iniciar la terapia ya que muchos de estos fármacos, si es que no todos, presentan efectos secundarios que muchas veces hace que el paciente pierda la adherencia al tratamiento, es decir que al sentir efectos perjudiciales se rehuse de continuar el tratamiento aduciendo a que el fármaco no es bueno o le causa más daño, lo cual resulta comprensible aún más ante el desconocimiento de la población de que ante una terapia siempre hay un riesgo-beneficio que se debe tomar en consideración.

De allí que lo que se busca hace ya varios años son fuentes antibacterianas capaces de ser efectivos y potentes en el tratamiento pero que a su vez sean inocuos durante el tiempo completo de administración.

Estas fuentes de origen natural y utilizado ancestralmente por las comunidades indígenas o andinas, empiezan a revalorarse por su potencial antibacteriano o de tratamiento para otras enfermedades. Su efecto positivo en la recuperación de la salud de las personas sin presentar o presentando pocos efectos secundarios hacen que sean de interés en el campo farmacéutico.

Estos recursos naturales con actividad antibacteriana una vez identificados por medio de la guía de los pobladores, son extraídos de su hábitat para poder identificar y aislar el principio activo al que se le debe la acción antibacteriana y posteriormente son purificados para iniciar la producción en masa de diversas formas farmacéuticas, ya sean tabletas, cápsulas, jarabes, etc, que previamente superaron los ensayos in vitro como in vivo al que fueron sometidos para demostrar su seguridad y eficacia. Sin embargo, anterior al aislamiento y purificación del o los principios activos por lo general se hace un tamizaje fitoquímico al extracto vegetal para determinar o tener una perspectiva clara de cuáles son los componentes mayoritarios a los que se les atribuiría la actividad identificada y a partir de ello direccionar los ensayos in vitro a realizarse.

Por otro lado, hoy en día muchas de las enfermedades metabólicas como obesidad, diabetes, enfermedades inflamatorias y degenerativas que afectan a gran parte de la población tienen su origen en el estrés oxidativo a la que es expuesta a diario. Estos factores externos hacen que se produzca un desequilibrio entre la cantidad de radicales libres y la capacidad intrínseca para metabolizarlos, generándose un exceso de

dichos radicales que al entrar en contacto con las células producen su alteración metabólica o estructural desencadenando diferentes enfermedades. Por lo que, lo que se requiere es el compensar este desequilibrio a través de la ingesta de antioxidantes, los cuales los encontramos ampliamente distribuidos en las plantas y frutos. Estos componentes antioxidantes como ya es conocido corresponden a flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides que le confieren la capacidad a los vegetales de ser una fuente rica en antioxidantes y por lo tanto el considerarse en una fuente natural de alimentación complementaria para combatir o prevenir las enfermedades que se acarrearán producto del exceso de radicales libres. Estos componentes antioxidantes presentes en las plantas actúan en forma conjunta brindando un efecto antioxidante superior al de sus componentes por separado, dicha actividad antioxidante es comparada y a veces igualada a la de estándares antioxidantes como la vitamina C, por lo que realmente resulta importante el estudio y la búsqueda de fuentes naturales con potencial reductor de radicales libres.

El género *Lomanthus* perteneciente a la familia Asteraceae con especies que anteriormente se agrupaban como del género *Senecio* se ha separado de este por algunas de sus diferencias morfológicas, pasando a formar un género distinto: el *Lomanthus*. Este nuevo género tiene una distribución geográfica que se extiende a través de los andes de los países occidentales de Sudamérica, principalmente en Perú ¹². El género *Lomanthus* carece de estudios científicos, aunque cabe mencionar la publicación de un estudio sobre el análisis fitoquímico

preliminar que se le hizo a las hojas de la especie *Lomanthus truxillensis* proveniente de la región La Libertad, en el que se reporta un contenido de metabolitos correspondientes a alcaloides, azúcares reductores, saponinas y compuestos fenólicos, así como ácidos grasos y esteroides ⁶.

Debido a la carencia de estudios previos y al parentesco taxonómico con el género *Senecio* se reportan estudios realizados a extractos y aceites de plantas del género *Senecio*, como el publicado en el 2012 que evaluó la actividad antibacteriana del *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya) en el que se enfrentó a *S. aureus* ATCC 29923 y *E. coli* cepa aislada al aceite esencial extraído de las hojas y tallos, obteniéndose actividad antibacteriana marcada y moderada a concentraciones de 100, 90 y 80 % ⁷.

Otro estudio reporta la comparación de actividad antibacteriana conseguida entre 3 plantas del altiplano boliviano con extractos etanólicos provenientes de *Senecio graveolens*, mostrando el extracto de este último el mayor diámetro inhibitorio (un promedio de 14 mm) al 80% de concentración ⁸.

Asimismo, un estudio realizado en Argentina reportó las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales de *Senecio pogonias* y *Senecio oreophyton* frente a cepas de *E. coli* por el método de microdilución, obteniéndose para ambos casos una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 2 000 µg/mL en comparación con su control positivo Cefotaxima con una CMI de 0,5 a 5 µg/mL ⁹.

En el 2016, el aceite extraído de *Senecio nutans* mostró propiedades

antibacterianas sobre el patógeno *Vibrio cholerae* causante de enfermedad gastrointestinal, obteniéndose una concentración mínima inhibitoria que se asemeja al del control positivo cefotaxima cuyo diámetro inhibitorio fue de 20 mm ¹⁰.

Por otro lado, un estudio de actividad antibacteriana realizado en el 2015 al extracto orgánico de *Senecio graveolens* mostró que presenta una concentración mínima inhibitoria de 1 500 µg/mL frente a bacterias Gram (+) como *Staphylococcus aureus* o *Mycobacterium smegmatis* (CMI= 1 000 µg/mL) resultados considerados significativos. A su vez también se identificó y aisló el componente principal de dicho extracto orgánico: el 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) acetofenona compuesto al que se le atribuyó su efecto inhibitorio frente a bacterias Gram (+) cepas resistentes y un efecto bacteriostático frente a Gram (-) ¹¹.

En base a los diversos estudios mostrados anteriormente se observa que presentan una constante en común y es que es la composición química del *Senecio* la que le confiere su actividad antibacteriana y/o antioxidante, predominando principalmente los alcaloides, compuestos fenólicos y terpenoides ¹³.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Plantas medicinales

Hace referencia a aquellos recursos botánicos a los que se les atribuye propiedades benéficas, por lo general sobre el ser humano. Estas propiedades hacen que vernacularmente se las utilice para el tratamiento, alivio o profilaxis de alguna enfermedad o malestar.

Las plantas medicinales se caracterizan por haber sido identificadas hace muchos años antes por los habitantes de las comunidades como saludables para su población, quienes convirtieron a la naturaleza que los rodeaba como la fuente de su abastecimiento medicinal, lo que sería una analogía a las farmacias y boticas actuales que nos proveen los medicamentos. Es así que estas fuentes naturales desarrollaron un papel fundamental en el desarrollo de la medicina, ya que sirvieron como remedios para el tratamiento o prevención de enfermedades que aquejaban a los antiguos pobladores.

En nuestro país, específicamente en regiones alto andinas o amazónicas así como en sectores económicos bajos, es bastante frecuente el utilizar plantas medicinales como sustitutos de fármacos convencionales a los que no se puede acceder por razones económicas, creencias religiosas, falta de acceso a centros de salud, entre otras o en algunos casos se emplean como tratamiento complementario a la medicación que se recibe ¹⁴.

Pero no solo en el ámbito nacional, porque internacionalmente también se observa la tendencia hacia la explotación de los recursos naturales como fuente medicinal, lo que se refleja en el aumento del consumo mundial de plantas medicinales ¹⁴.

2.2.2. Familia Asteraceae

Son las plantas más diversamente distribuidas a nivel mundial con alrededor de 1 600 géneros y 24 000 especies ¹⁵. En el año 2001 en el Perú se reportaron en esta familia de plantas 245 géneros y 1 530

especies incluyendo las endémicas ^{16, 17}. Esta familia de plantas destaca por la diversidad de sus especies que han sido motivo de estudio científico por las propiedades medicinales que se les atribuyen.

2.2.3. Género *Lomanthus*

Es un género nuevo que se ha segregado del *Senecio*, con 4 especies peruanas desarrolladas en la provincia de Yauyos ¹⁷.

2.2.4. Plantas en estudio

2.2.4.1. *Lomanthus tovari*

Planta endémica del Perú conocida bajo el nombre común de Canceryura (véase la información taxonómica en el Anexo 1) es un arbusto pequeño con menos de 1 m de alto que crece en las regiones de Arequipa, Ayacucho y en Yauyos, provincia de Lima ^{12, 17}.

Popularmente las hojas son utilizadas en forma de infusión para aliviar el dolor de cabeza, de estómago, resfriado y úlceras. Asimismo, el friccionar las hojas y olerlas es utilizado para tratar el mal de altura.

2.2.4.2. *Lomanthus yauyensis*

Es un arbusto endémico del Perú con una altura mayor a 1 m que se distribuye en las regiones de Lima, Cajamarca y Arequipa ^{12, 17}. De esta especie no se conoce un uso vernacular por lo que se busca evidenciar si puede presentar alguna actividad potencial similar a *L. Tovari*. (Véase la información taxonómica en el Anexo 2).

2.2.5. Extractos naturales

Son mezclas que se obtienen generalmente de la maceración de recursos botánicos en un solvente, extrayéndose, según su polaridad, sustancias químicas que corresponden a los metabolitos presentes en las plantas ¹⁸.

Se conoce según estudios que muchos de estos extractos presentan efectos benéficos como actividades antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatorias, antifúngicas, etc. por efecto de los fenoles, alcaloides, flavonoides y otros metabolitos contenidos ¹⁹. Se dice que la acción conjunta de sus metabolitos es lo que le brinda la actividad que se le reconoce. Los extractos son fáciles de preparar u obtener por lo que son muy utilizados en las comunidades para diferentes situaciones a convenir, desde ritos espirituales donde se realizan preparados de plantas alucinógenas como la comúnmente usada Ayahuasca hasta infusiones o preparados de plantas para aliviar síntomas de ciertas enfermedades o para su sanación.

2.2.6. Metabolitos secundarios

Son moléculas producidas por una ruta biosintética secundaria. Son obtenidas solo del metabolismo vegetal el cual aprovecha parte del carbono, nitrógeno y energía para la síntesis de compuestos no indispensables para la supervivencia de la planta, ya que estos compuestos químicos están más asociados a conferir características organolépticas variadas según la especie y género del vegetal, con el fin de favorecer su polinización o protegerse de plagas, es decir actuar como un mecanismo de defensa. La importancia de estos metabolitos radica en que no solo son útiles para la planta sino que también tienen

potencial industrial en el campo farmacéutico, alimentario o cosmético ²⁰ por sus propiedades inherentes que se derivan de su estructura química.

2.2.6.1 Compuestos fenólicos

Se refiere a un grupo diverso de moléculas cuya característica común es presentar el grupo fenol como molécula base. En la Figura 1 se aprecia la estructura química de fenoles simples donde la posición del grupo hidroxilo (-OH) genera un compuesto diferente. Lo particular de estos compuestos son sus propiedades antioxidantes ampliamente conocidas e incluso otras de importancia biológica ^{21, 22}.

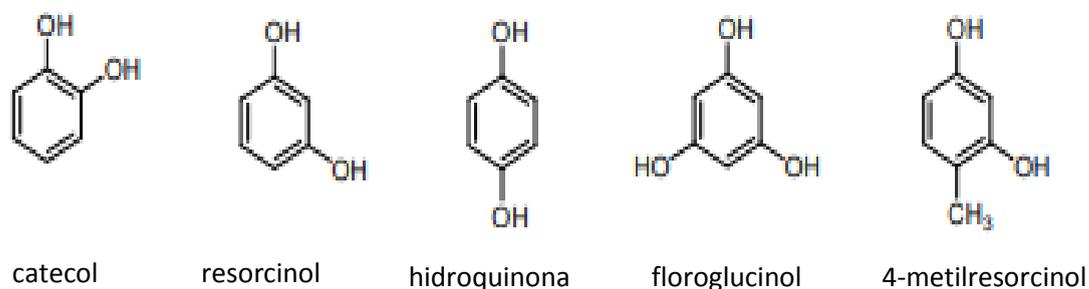


Figura 1. Compuestos fenólicos simples con grupos hidroxilo en diferentes posiciones ²¹.

2.2.6.2 Taninos

Tienen la peculiaridad de precipitar a las proteínas con las que entra en contacto. Se clasifican como compuestos fenólicos por la presencia del grupo fenol en su estructura pudiendo ser taninos complejos, condensados e hidrolizables ²¹. Se caracterizan por su sabor astringente, mismo que es debido a su capacidad de precipitar proteínas.

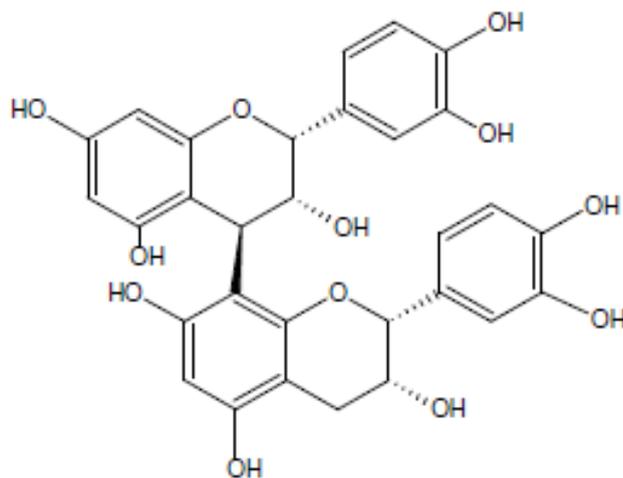


Figura 2. Estructura química de la Procianidina B2. Tanino condensado de gran tamaño ²¹.

2.2.6.3 Flavonoides

Son compuestos polifenólicos con una estructura básica compuesta por tres anillos, como se muestra en la figura 3 donde A y B son fenilos y C un pirano. La diversidad de flavonoides como antocianidinas, flavanos, flavonas y flavonoles se debe a la variación del anillo pirano.

Estos compuestos presentan actividad antioxidante demostrada, siendo uno de sus mecanismos la inhibición de enzimas relacionadas con procesos oxidativos ^{21, 23, 24, 25, 26}.

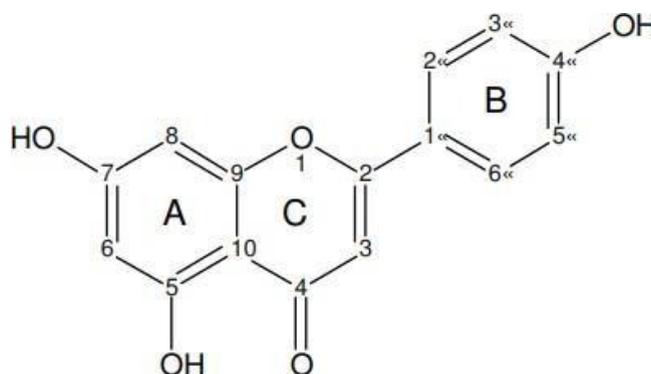


Figura 3. Estructura básica de un flavonoide ²¹.

2.2.6.4 Alcaloides

Son compuestos nitrogenados en los que el nitrógeno proveniente de un aminoácido puede formar parte de un heterociclo o no, son de distribución restringida y con actividad farmacológica significativa a dosis bajas. Los alcaloides se encuentran distribuidos fundamentalmente en las angiospermas, sobre todo en las dicotiledóneas y particularmente en familias como Apocynaceae, Asteraceae, Loganiaceae, Papaveraceae, Rubiaceae, Ranunculaceae y Solanaceae.

Estos compuestos se clasifican en grupos según su precursor, así encontramos a los: alcaloides derivados de la ornitina y la lisina, derivados de la tirosina y la fenilalanina, derivados del triptófano, del ácido nicotínico y de la histidina ²⁷.

2.2.7 Radicales libres

Son sustancias químicas que presentan un orbital con electrón solitario lo que le confiere la característica de ser altamente reactivo, capaz de combinarse con componentes celulares como lípidos, proteínas o nucleótidos produciendo daño funcional y/o estructural en la célula. Si bien estas sustancias son producto del metabolismo normal celular y a su vez desactivados por enzimas como la peroxidasa, su producción en demasía es la causa de alteraciones patológicas como las cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias, o ciertos tipos de cáncer ^{28, 29}.

2.2.8 Estrés oxidativo

Es el desequilibrio bioquímico producido entre los radicales libres formados en los procesos metabólicos de obtención de energía o por efecto de sustancias exógenas o factores ambientales y las sustancias antioxidantes endógenas ^{29, 30} que genera una alteración del equilibrio homeostático. La proliferación en demasía de estos radicales libres es lo que desencadena la aparición de las enfermedades anteriormente mencionadas.

2.2.9 Actividad antioxidante

Determinadas moléculas de origen endógeno (sintetizados por el organismo) y exógeno (provenientes de fuentes externas) son las que poseen actividad antioxidante; es decir, la capacidad de donar electrones para estabilizar a los radicales libres y de esta forma neutralizar los efectos del daño oxidativo causado por éstos, siendo los carotenoides, aminoácidos y ciertas proteínas de origen animal y vegetal, como también los metabolitos secundarios como flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos, los que presentan potencial antioxidante ^{31, 32, 33}

2.2.10 Métodos para medir la actividad antioxidante

Entre los muchos métodos utilizados para la evaluación in vitro de esta propiedad se encuentran los dos más comunes: el DPPH y el ABTS ^{34, 35,}
³⁶

Método DPPH

Es un ensayo propuesto originalmente por Brand-Williams en el que la

molécula DPPH presenta un electrón deslocalizado que hace que esta no dimerice, como generalmente sucede con los radicales libres, brindándole ese color violeta característico que puede medirse a 517 nm. De este modo al producirse la reacción entre el DPPH y un agente antioxidante, dador de hidrógenos, el DPPH se reduce y su color se desvanece (Figura 4) ^{34, 37, 38}.

Entre las ventajas encontramos:

- su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental,
- además de su estabilidad,
- fuerte coloración,
- fácil de llevar a cabo y utilizar porque no requiere que el reactivo se sintetice previo a la reacción.

Entre las desventajas:

- en ocasiones puede llevar al error de resultados cuando se trata con sustancias que poseen espectro de absorción enmascarado con el del DPPH;
- adicionalmente el tamaño molecular del DPPH (Figura 5) favorece la reacción con sustancias pequeñas que con las grandes ³⁹.

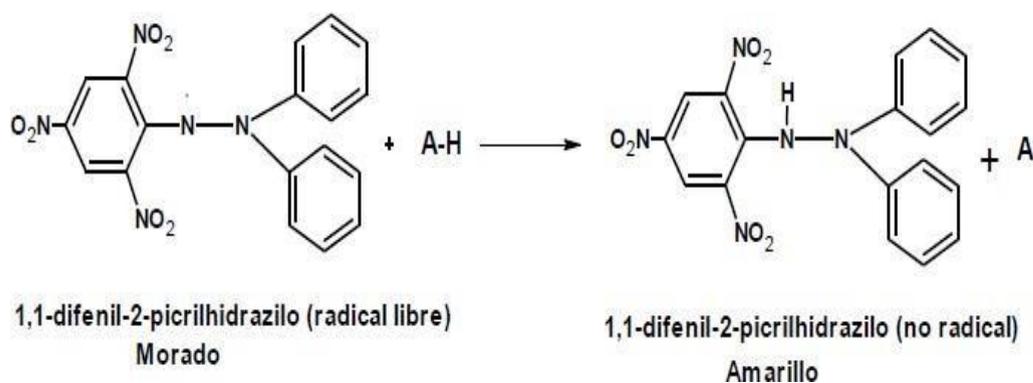


Figura 4. Reacción del DPPH con la sustancia reductora o antioxidante ⁴⁰

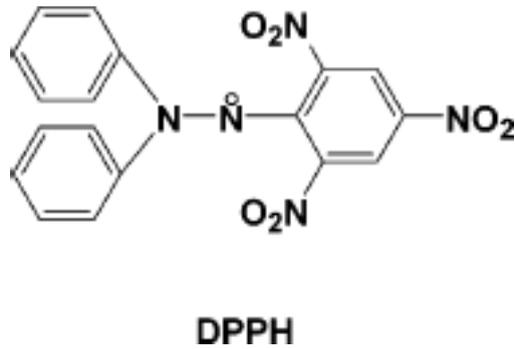


Figura 5. Estructura química del radical DPPH ³⁹.

Método ABTS

Primero consiste en formar al radical catión ABTS^{•+} a partir de la oxidación del reactivo ABTS (Figura 6) ya sea de forma química con persulfato de potasio, enzimática con peroxidasa, o vía electroquímica. El radical ABTS posee un color verde-azul cuya decoloración por un agente antioxidante se mide por espectrofotometría en el UV-visible a 734 nm (Figura 7).

Entre las ventajas encontramos que:

- este método es sensible y útil para evaluar muestras liposolubles e hidrosolubles; sin embargo,

Entre las desventajas:

- presenta la dificultad de tener que generar al radical ABTS previamente
- el punto final de reacción se fija de manera arbitraria ^{39,41}.

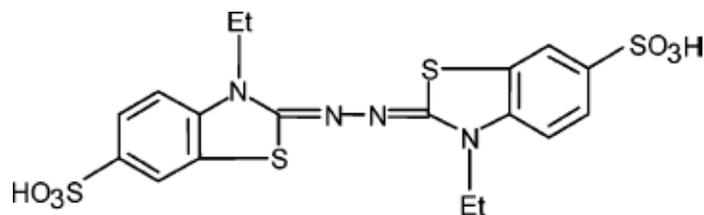


Figura 6. Estructura química del ABTS ⁴¹.

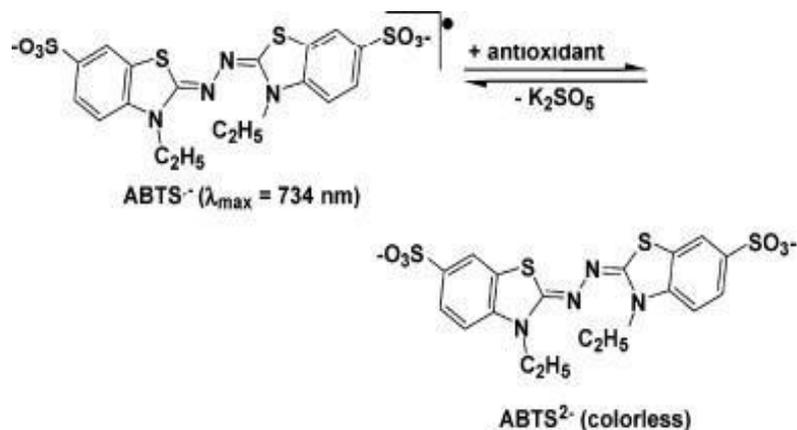


Figura 7. Reacción entre el ABTS y una sustancia antioxidante ⁴².

2.2.11 Actividad antibacteriana

Es la propiedad ya sea bactericida o bacteriostática que posee una sustancia química de origen natural o sintético sobre determinados microorganismos.

Los métodos para la evaluación antibacteriana son diversos, teniendo sus variaciones en cuanto a costos, tiempo, sensibilidad, practicidad. Asimismo, los resultados entre un método y otro pueden variar ya que depende mucho de otros factores como la solubilidad de la muestra, los microorganismos (m.o.) utilizados, etc. ⁴³

Los métodos de evaluación antibacteriana se clasifican en básicamente 3; sin embargo, un cuarto método se realiza por análisis conductimétrico ^{43, 44}. La figura 8 muestra el detalle de los métodos.

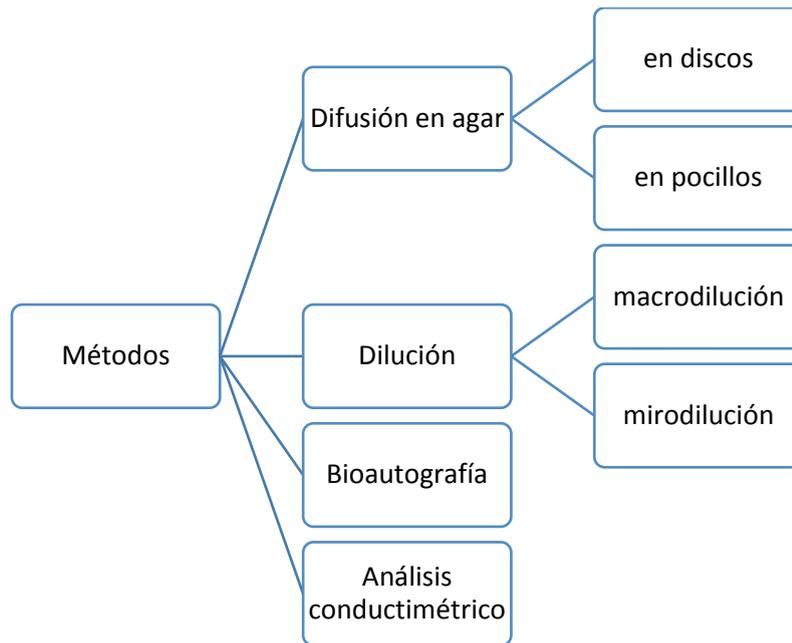


Figura 8. Métodos para el estudio de la actividad antibacteriana.

2.2.12 Microdilución

Se refiere a la microtitulación en una placa con pocillos donde la resazurina es utilizada como indicador Redox para la detección del crecimiento bacteriano por su cambio de color de azul a rosa ^{45, 46, 47} como se muestra en la Figura 9.

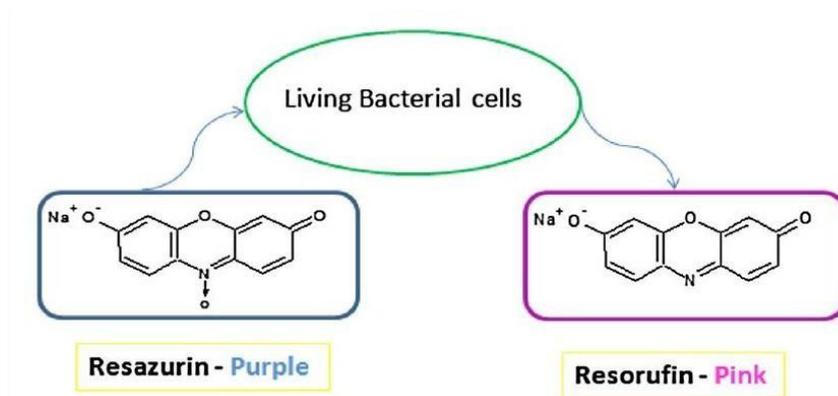


Figura 9. Célula activa causando la reducción de la resazurina ⁴⁵.

2.2.13 Bacillus cereus

Es una bacteria Gram + capaz de crecer y adaptarse a diferentes ambientes, se caracteriza por producir endosporas lo que la hace resistente a la pasteurización, radiación gamma y desinfectantes. Su mecanismo de intoxicación alimentaria se da a través de enzimas como proteasas lipasas, etc ⁴⁸.

Es también causante del síndrome emético y diarreico producidas por sus toxinas eméticas y enterotoxinas. Es capaz de provocar infecciones locales y sistémicas, sobre todo si se trata de pacientes inmunocomprometidos. También son capaces de sintetizar exotoxinas necrotizantes parecidas a las hemolisinas y fosfolipasas ^{49, 50}.

III. PARTE EXPERIMENTAL

Entidades que permitieron el desarrollo de la investigación.

Se realizó en los laboratorios de Química Orgánica y Microbiología de la UNMSM.

Clase de estudio

Es experimental, descriptivo, transversal y prospectivo.

3.1. Materiales

- Fiolas de vidrio
- Matraz Erlenmeyer de 10 mL
- Frascos de vidrio ámbar
- Recipientes de plástico
- Tips de 100 μ L y 1000 μ L
- Bagueta de vidrio
- Micropipeta
- Microplacas estériles de polipropileno de 96 pocillos

Material vegetal

- Hojas de *Lomanthus tovari*
- Hojas de *Lomanthus yauyensis*

Reactivos

- Metanol
- Etanol 96°
- Vitamina C: Ácido ascórbico

- DPPH
- ABTS
- Resazurina
- Dimetilsulfóxido (DMSO)

Instrumentos

- Balanza analítica (ACCULAB ALC – 210.4)
- Estufa (KERLAB ODHG - 9053A)
- Autoclave (Chincan LDZX-500KBS)
- Incubadora (INCUCCELL)
- Cabina de bioseguridad de tipo II (Telstar Bio II Advance)

3.2. Metodología

3.2.1. Recolección e identificación de las plantas en estudio

Las muestras vegetales fueron obtenidas del departamento de Lima, provincia de Laraos para el caso de *Lomanthus tovari* y de la provincia de Yauyos, Chiclla a 3750 msnm para *Lomanthus yauyensis*.

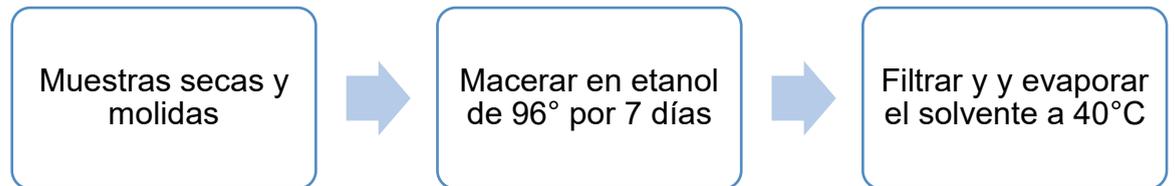
Se recolectó 7 Kg de ambas plantas entre los meses de enero-febrero del 2018.

3.2.2. Acondicionamiento de la muestra

Se seleccionaron las plantas en mejor estado físico y se procedió a deshojar a ambas muestras, se colocó sobre un papel seco en forma de bandeja y luego se llevó a una estufa a una temperatura de 40°C por 7 días y se redujo de tamaño en un molino de cuchillas.

3.2.3. Preparación de los extractos

Se siguió el siguiente esquema ⁵¹:



3.2.4. Análisis fitoquímico preliminar

Para identificar los metabolitos secundarios se realizaron las siguientes reacciones ^{52, 53}.

3.2.4.1. Reacción con cloruro férrico: a 30 mg de muestra resuspendida en alcohol 96° se adicionaron 3 gotas de cloruro férrico al 10%. Los compuestos fenólicos se identificaron por la aparición del color azul negruzco.

3.2.4.2. Reacción con gelatina: a 30 mg de muestra resuspendida en alcohol 96° se adicionaron gotas del reactivo, el precipitado blanquecino indicó la existencia de taninos.

3.2.4.3. Reacción de Shinoda: a 30 mg de muestra resuspendida en alcohol 96° se adicionaron 1 a 2 granallas de Mg metálico y 3 gotas de HCl concentrado, la coloración naranja indicó la presencia de flavonoides.

3.2.4.4. Reacción de Dragendorf: a 30 mg de muestra resuspendida en alcohol 96° se le evaporó el solvente en baño maría, posteriormente se

adicionaron 5 gotas de HCl al 10% y 3 gotas de reactivo Dragendorf. El precipitado de color anaranjado indicó la presencia de alcaloides.

3.2.4.5. Reacción de Bertrand: a 30 mg de muestra resuspendida en alcohol 96° se le evaporó el solvente en baño maría, posteriormente se adicionaron 5 gotas de HCl al 10% y 3 gotas de reactivo Bertrand. El precipitado de color blanco indicó la presencia de alcaloides.

3.2.4.6. Reacción de Liebermann-Burchard: a 30 mg de muestra resuspendida en alcohol 96° se le llevó a sequedad en baño maría y se adicionaron 1 mL de cloroformo más 1 mL de anhídrido acético y gotas de H₂SO₄ concentrado, la coloración azul verdoso indicó la presencia de esteroides.

3.2.4.7. Generación de espuma: a 30 mg de muestra resuspendida en 5 mL de agua destilada se agitó fuertemente por 1 minuto. La presencia de saponinas es revelada si se forma espuma de 0,5 a 1 cm de altura por 15 minutos.

3.2.5. Determinación de la actividad antioxidante

3.2.5.1. Método DPPH

Se siguió la metodología de Rojas *et al.* 2010⁵³. Los extractos secos se resuspendieron y se realizaron 5 concentraciones intermedias. Se mezcló 0,8 mL de cada concentración con 1,6 mL de DPPH obteniéndose concentraciones finales que se muestran en la Tabla 1. La preparación se realizó por triplicado. De la misma forma se procedió con el estándar vitamina C.

Asimismo, se prepararon los blancos de las muestras mezclando 0,8 mL de cada concentración intermedia con 1,6 mL de metanol (Tabla 2).

Todos los tubos de ensayo se dejaron en reposo por 30 minutos y se leyeron por espectrofotometría a 517 nm.

Tabla 1. Concentraciones finales preparadas de las muestras en estudio.

Concentración de las muestras (µg/mL)	
<i>Lomanthus tovari</i>	<i>Lomanthus yauyensis</i>
100	200
75	100
50	75
25	50
12,5	25

Tabla 2. Concentraciones finales preparadas de estándar vitamina C.

Concentraciones del estándar (µg/mL)	
Vitamina C	2,4
	2,0
	1,6
	1,2
	0,8

Cálculo de la capacidad antioxidante

Se determinó haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad antioxidante (\%)} = \frac{1 - (X - Y)}{Z} \cdot 100$$

Dónde: X, Y y Z representan las absorbancias de la muestra, el blanco de muestra y el patrón de referencia, respectivamente.

Los resultados experimentales se expresan como el valor IC50, es decir, la concentración de la muestra problema que produce una inhibición del 50% del radical libre DPPH.

3.2.5.2. Método ABTS

Se siguió el método descrito por Re *et al.* 1999⁵⁴. Los extractos se resuspendieron y se prepararon 5 concentraciones intermedias, luego se realizó una dilución 1:50 entre las concentraciones preparadas y la solución ABTS, obteniéndose concentraciones finales que se muestran en la Tabla 3. La preparación se realizó por triplicado. De la misma forma se procedió con el estándar Trolox®.

También se prepararon los blancos de cada concentración de muestra problema mezclando 20 µL de cada una con 980 µL de agua destilada.

Todos los tubos de ensayo fueron agitados y dejados en reposo por 7 minutos y posteriormente se leyeron por espectrofotometría UV a 734 nm.

Tabla 3. Concentraciones finales preparadas de las muestras en estudio.

Concentración de las muestras ($\mu\text{g/mL}$)	
<i>Lomanthus tovari</i>	<i>Lomanthus yauyensis</i>
100	150
75	100
50	75
25	50
12,5	25

Tabla 4. Concentraciones finales preparadas del estándar Trolox $\text{\textcircled{R}}$

Concentración del estándar ($\mu\text{g/mL}$)	
Trolox $\text{\textcircled{R}}$	3
	2,4
	1,2
	0,4
	0

Cálculo de la capacidad antioxidante

Se utilizó la misma ecuación que para el método DPPH expresándose los resultados como el valor IC50.

3.2.5.3. Análisis estadístico de la actividad antioxidante

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de Tukey al 95 % de confianza para determinar variedad estadísticamente

significativa ($p < 0,05$)⁵⁵ haciendo uso del software estadístico para Windows IBM SPSS Statistics versión 23.

3.2.6. Determinación de la actividad antibacteriana

3.2.6.1. Método de microdilución colorimétrica

Se eligieron los m.o. a estudiar, siendo cepas estándares Gram positivas: *Bacillus cereus* cepa alimentaria, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Se siguió la metodología del CLSI⁵⁶ y Sarker *et al.* 2007⁵⁷; se resuspendieron los extractos secos de *L. tovari* y *L. yauyensis* en dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% v/v obteniendo una solución inicial de 200 mg/mL, para luego diluirlas y obtener concentraciones finales en el rango de 7,8 – 4 000 µg/mL (tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones finales para ambas muestras en estudio.

Dilución	Concentración final (µg/mL)
1	4 000
2	2 000
3	1 000
4	500
5	250
6	125
7	62,5
8	31,25
9	15,6
10	7,8

El control positivo utilizado fue ciprofloxacino, preparándose concentraciones entre 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 µg/mL en agua destilada siguiendo el esquema de preparación similar al de las muestras. El control de esterilidad utilizado fue caldo Mueller Hinton con rezasurina.

En caso de los inóculos, se disolvieron en NaCl 0,9% hasta llegar a una turbidez de 0,5 según la escala de McFarland. Posteriormente, se realizaron dos diluciones seriadas de 1:30 y 1:5 en caldo Mueller Hinton obteniendo una concentración de inóculo de $1 - 5 \times 10^5$ UFC/mL. Luego se adicionó el reactivo de rezasurina.

Una vez realizado todo lo anterior se distribuyeron las muestras e inóculos en las placas de poliestireno de 96 pocillos como se observa en la Tabla 6.

Tabla 6. Posicionamiento de todos los reactivos utilizados en la bandeja de microdilución colorimétrica.

A	CE	M1	CC									
B	CE	M1	CC									
C	CE	M1	CC									
D	CE	M2	CC									
E	CE	M2	CC									
F	CE	M2	CC									
G	CE	CP	CC									
H	CE	CP	CC									

Donde:

CE corresponde al control de esterilidad = caldo Mueller Hinton

CC corresponde al control de crecimiento = inóculo más caldo Mueller Hinton

M1 y M2 corresponde a las muestras en estudio = 100 µL de muestra más 100 µL de inóculo.

CP corresponde al control positivo = Ciprofloxacino

A-H: se refiere a las filas de la bandeja.

La incubación de las microplacas se realizó a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16-20 h.

Lectura de resultados

Se expresó como la CMI, es decir, la menor concentración de muestra a la que no se observó viraje de color.

IV. RESULTADOS

4.1 Análisis fitoquímico preliminar

Se identificó la presencia de taninos, esteroides y alcaloides para ambas especies *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis* (Tabla 7).

Tabla 7. Tabla comparativa de análisis fitoquímico de los extractos etanólicos de las hojas de *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis*.

Metabolitos secundarios	Reacción	Resultado	
		L.T	L.Y
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	+	+
Taninos	Gelatina	+	+
Flavonoides	Shinoda	-	+
Alcaloides	Dragendorf	+	+
	Bertrand	+	+
Naftaquinonas, antraquinonas y antronas	Borntranger (NaOH 5%)	-	-
Esteroides	Lieberman-burchard	+	+
Saponinas	Poder afrógeno	-	-

Leyenda: Presencia: + Ausencia: -

4.2 Actividad antioxidante

Los resultados de las lecturas a 517 nm con DPPH muestran un IC50 de 45,9 µg/mL para *Lomanthus tovari* (L.t.) y 85,81 µg/mL para *Lomanthus yauyensis* (L.y.), dichos resultados se aprecian en las figuras 11 y 12 y tablas 9 y 10. En caso del IC50 del estándar Vitamina C este fue de 1,31 µg/mL, el cual se observa en la tabla 8 y la figura 10.

Con el ABTS se obtuvo un IC50 de 73,44 µg/mL para *Lomanthus tovari* y 126,43 µg/mL para *Lomanthus yauyensis* como se observa en las figuras 14 y 15 y las tablas 12 y 13.

La tabla 11 y la figura 13, se observa lo obtenido por el estándar Trolox®, con un IC50 de 2,54 µg/mL.

Tabla 8. Capacidad antioxidante del estándar de vitamina C con DPPH.

Concentración (µg/mL)	% de captación de radicales libres	IC 50 (µg/mL)
2,4	77,31581953	1,31
2	65,16847516	
1,6	53,82638492	
1,2	48,73786408	
0,8	38,54368932	
0	0	

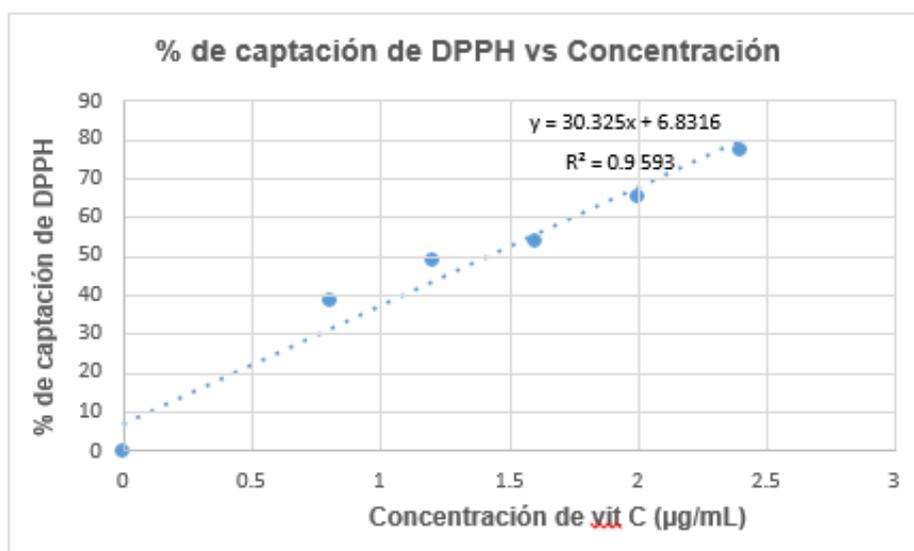


Figura 10. Correlación entre % de captación de DPPH del estándar vitamina C vs las concentraciones

Un coeficiente de determinación (R^2) de 0,959 indica una correlación positiva fuerte entre las variables dependiente e independiente.

Tabla 9. Capacidad antioxidante con el método DPPH del extracto de *Lomanthus tovari*.

Concentración (µg/mL)	% de captación de radicales libres	IC 50 (µg/mL)
100	93,83	45,97
75	84,15	
50	58,28	
25	29,66	
12,5	15,53	
0	0	

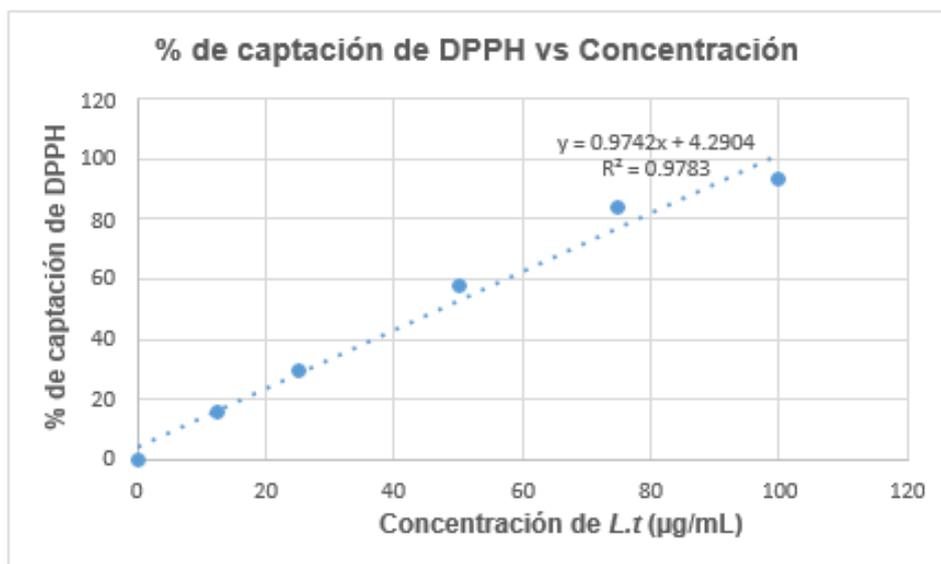


Figura 11. % de captación de DPPH del extracto de *Lomanthus tovari* vs las concentraciones.

Se observa un coeficiente de determinación (R^2) de 0,978 que indica una correlación positiva fuerte entre las dos variables.

Tabla 10. Capacidad antioxidante con el método DPPH del extracto de *Lomanthus yauyensis*.

Concentración (µg/mL)	% de captación de radicales libres	IC 50 (µg/mL)
200	91,77	85,81
100	60,01	
75	49,06	
50	34,91	
25	24,38	
0	0	

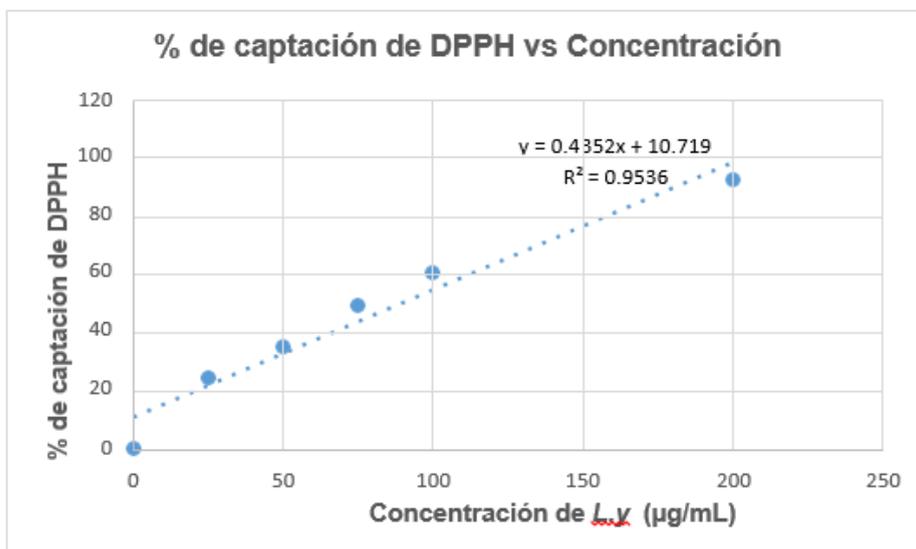


Figura 12. % de captación de DPPH del extracto de *Lomanthus yauyensis* vs las concentraciones.

Se observa un coeficiente de determinación (R^2) de 0,953 que indica una correlación positiva fuerte entre las dos variables.

Tabla 11. Capacidad antioxidante del estándar Trolox ® con ABTS.

Concentración (µg/mL)	% de captación de radicales libres	IC 50 (µg/mL)
3	59,13	2,54
2,4	46,49	
1,2	24,46	
0,4	8,03	
0	0	

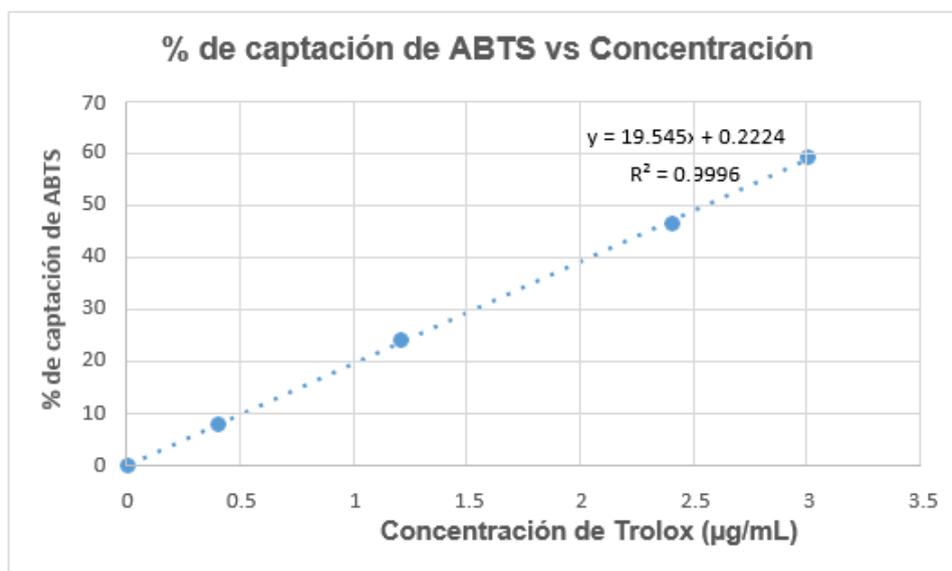


Figura 13. Correlación entre % de captación de ABTS del estándar Trolox® vs las concentraciones.

Se observa la correlación existente entre el estándar Trolox® y el % de captación del radical ABTS con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,999 que indica una correlación positiva fuerte entre las dos variables.

Tabla 12. Capacidad antioxidante con el método ABTS del extracto de *Lomanthus tovari*.

Concentración (µg/mL)	% de captación de radicales libres	IC 50 (µg/mL)
100	64,88	73,44
75	52,09	
50	35,42	
25	21,33	
12,5	9,45	
0	0	

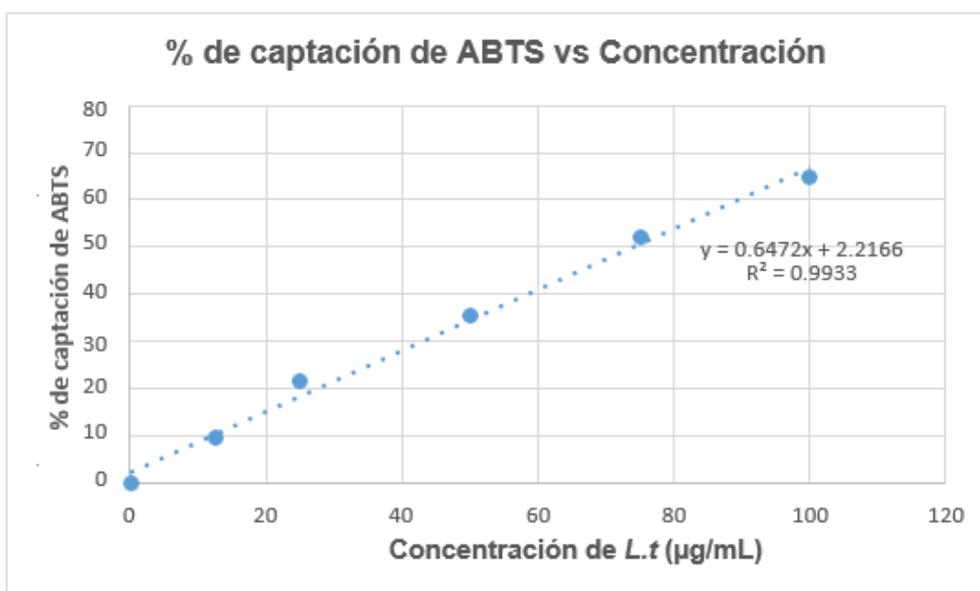


Figura 14. % de captación de ABTS del extracto de *Lomanthus tovari* vs las concentraciones.

Se observa el poder de captación de DPPH del extracto de *Lomanthus tovari* con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,993 que indica una correlación positiva fuerte entre las dos variables.

Tabla 13. Capacidad antioxidante con el método ABTS del extracto de *Lomanthus yauyensis*.

Concentración (µg/mL)	% de captación de radicales libres	IC 50 (µg/mL)
150	57,16	126,43
100	39,59	
75	32,15	
50	22,94	
25	11,83	
0	0	

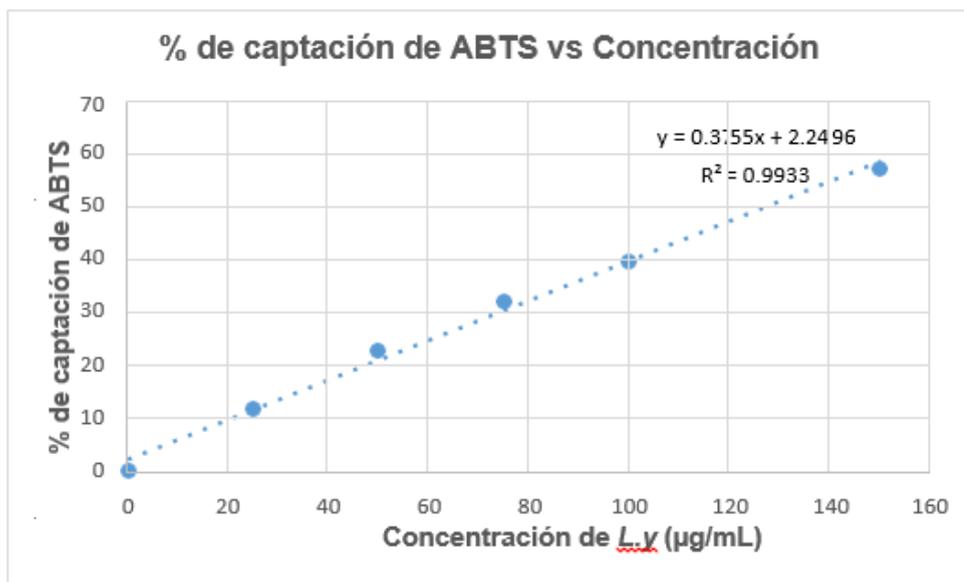


Figura 15. % de captación de ABTS del extracto de *Lomanthus yauyensis* vs las concentraciones.

Se observa la correlación existente entre el extracto etanólico de *Lomanthus yauyensis* y el % de captación del radical ABTS con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,993 que indica una correlación positiva fuerte entre las dos variables.

4.3 Análisis estadístico de la actividad antioxidante

Las tablas 14 a la 17 muestran el análisis de varianza realizado.

Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) con el método DPPH para el extracto de *Lomanthus tovari*.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	gl	Promedio de los cuadrados	F	Significancia p<0.05
Entre grupos	0,669	5	0,1338	1319,864	0,00
Dentro de los grupos	0,0012	12	0,00		
Total	0,6703	17			

La presente tabla indica la diferencia estadísticamente significativa de la actividad antioxidante definidos por concentraciones de la muestra.

Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados con el método DPPH para el extracto de *Lomanthus yauyensis*.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	gl	Promedio de los cuadrados	F	Significancia p<0.05
Entre grupos	0,5513	5	0,110	1957,205	0,00
Dentro de los grupos	0,0006	12	0,00		
Total	0,5519	17			

La presente tabla indica la diferencia estadísticamente significativa de la actividad antioxidante entre los grupos definidos por concentraciones de la muestra.

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados con el método ABTS para el extracto de *Lomanthus tovari*.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	gl	Promedio de los cuadrados	F	Significancia p<0.05
Entre grupos	0,410	5	0,0820	442,510	0,00
Dentro de los grupos	0,002	12	0,0002		
Total	0,412	17			

La presente tabla indica la diferencia estadísticamente significativa de la actividad antioxidante entre los grupos definidos por concentraciones de la muestra.

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados con el método ABTS para el extracto de *Lomanthus yauyensis*.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	gl	Promedio de los cuadrados	F	Significancia p<0.05
Entre grupos	0,271	5	0,0542	839,998	0,00
Dentro de los grupos	0,0007	12	0,00		
Total	0,2717	17			

La presente tabla indica la diferencia estadísticamente significativa de la actividad antioxidante entre los grupos definidos por concentraciones de la muestra.

Se utilizó el software estadístico para Windows IBM SPSS Statistics 23 para la realización de la prueba de Tukey a ambos extractos en ambos métodos de determinación de actividad antioxidante (Anexos 3-6).

4.4 Actividad antibacteriana

Las muestras en estudio no presentaron actividad frente a *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* (Figura 16 y Figura 17), sobre *Bacillus cereus* cepa alimentaria *Lomanthus yauyensis* presentó una CMI = 1000 $\mu\text{g/mL}$ y *Lomanthus Tovar* una CMI = 4000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18).

Asimismo, la CMI del estándar ciprofloxacino contra *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* fue de 62,75 $\mu\text{g/mL}$ y 7,81 $\mu\text{g/mL}$ frente a *Bacillus cereus* cepa alimentaria.



Figura 16. Placa de 96 pocillos con los extractos de ambas plantas frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

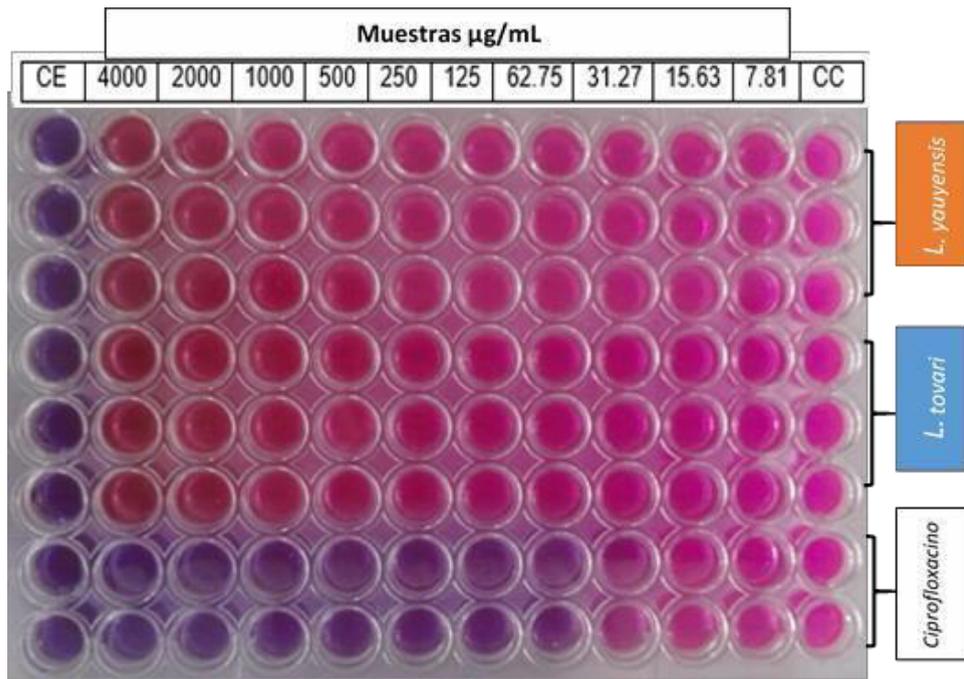


Figura 17. Placa de 96 pocillos con los extractos de ambas plantas frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

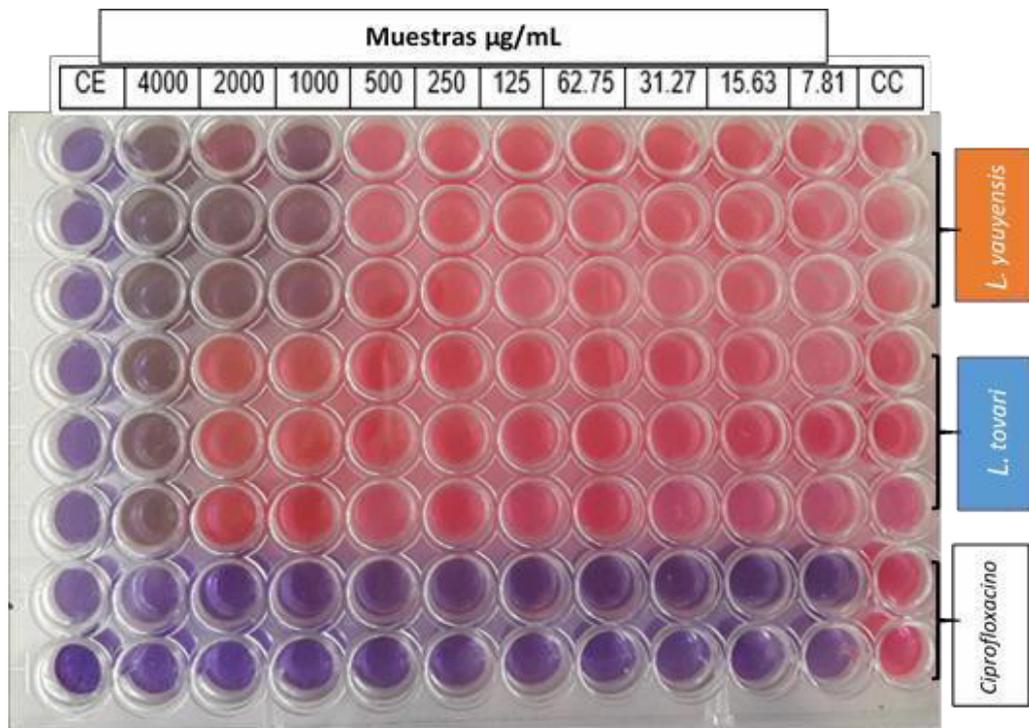


Figura 18. Placa de 96 pocillos con los extractos de ambas plantas frente a *Bacillus cereus* cepa alimentaria.

V. DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios que se encontraron fueron los compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides y esteroides, según el análisis fitoquímico realizado a los extractos etanólicos de las hojas de las especies: *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis*; siendo este el primer reporte que se obtiene para estas dos especies. Estos resultados, correspondientes a la tabla N° 7, están acordes con los obtenidos por Malca et al. con el extracto etanólico de las hojas de *Lomanthus truxillensis* que mostró la presencia abundante de alcaloides junto con esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides ⁶. No se conocen estudios de actividad antioxidante y antibacteriana realizada a plantas de este género, por lo que las comparaciones de los resultados se hicieron con estudios realizados a plantas pertenecientes a la misma familia, siendo esta la Asteraceae.

La actividad antioxidante con el método DPPH fue de un IC₅₀ de 45,97 µg/mL y 85,81 µg/mL para *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis* respectivamente, los cuales se muestran en la Tabla N° 9 y Tabla N° 10. A su vez, con el método de ABTS cuyos resultados se muestran en la Tabla N° 12 y Tabla N° 13 el IC₅₀ fue de 73,44 µg/mL para *Lomanthus tovari* y de 126,43 µg/mL para *Lomanthus yauyensis*. A pesar de las diferencias metodológicas, los resultados obtenidos con ambos métodos permiten concluir similarmente, siendo el extracto etanólico de *Lomanthus tovari* el que mejor actividad antioxidante presentó. Sin embargo, la actividad antioxidante de ambos extractos resultó menor en comparación con los estándares de referencia utilizados: el ácido ascórbico con un IC₅₀ 1,31 µg/mL por el método de DPPH

(Tabla N° 8) y el Trolox® con un IC₅₀ 2,54 µg/mL por el método de ABTS (Tabla N°11), esto puede deberse a que los estándares son sustancias químicamente puras a diferencia de los extractos que además de los metabolitos presentan interferencias.

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante son los primeros en reportarse para las especies *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis*, por lo que la presente investigación servirá de referencia para estudios posteriores.

Entre los métodos utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres, el radical ABTS es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable ⁵⁸; a pesar de esto los valores de actividad antioxidante pueden depender del tiempo escogido para efectuar la medida. Sin embargo, el ABTS presenta importantes ventajas y una buena solubilidad, permitiendo el ensayo de compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica ⁵⁹.

La presencia de alcaloides y taninos en ambas especies podría ser la razón de la actividad antioxidante evidenciada, ya que en un estudio realizado por Echavarría et al., (2016) ⁶⁰ a plantas de diferentes familias, cinco de ellas pertenecientes a la familia Asteraceae (a la cual pertenece el género *Lomanthus*) reveló la presencia de alcaloides, algunas con taninos y flavonoides, metabolitos que se relacionaron con su actividad antioxidante, aunque los IC₅₀ de dicho estudio fueron mejores en comparación con los obtenidos por *L. tovari* y *L. yauyensis*, en parte debido a que el estudio también mostró una presencia abundante de triterpenos. Por otro lado, la

actividad antioxidante evidenciada con diversos niveles de poder inhibitorio sobre el DPPH y ABTS (Tablas N° 9, 10, 12 y 13) también puede deberse al efecto sinérgico entre los alcaloides y esteroides presentes en ambas plantas⁶¹. Asimismo, los flavonoides encontrados en *Lomanthus yauyensis* también podrían contribuir en su actividad antioxidante por la presencia de un anillo B monofenólico o con catecol que les permiten secuestrar los radicales libres con facilidad⁶².

Además, los alcaloides se correlacionan con el uso vernacular que se le atribuye a *Lomanthus tovari* para el tratamiento de malestares estomacales y dolor de cabeza ya que por lo general los alcaloides actúan como antiespasmódicos, antiinflamatorios, antitusivos, diuréticos, sedantes, etc⁶³. Por otro lado, si bien de *Lomanthus yauyensis* no se conoce un uso tradicional, la presencia de alcaloides, fenoles y taninos podría brindarle también propiedades para el alivio de malestares estomacales o como antiinflamatorio^{63, 64}, similar a *Lomanthus tovari*.

En lo que se refiere a la actividad antibacteriana *in vitro* por el método de microdilución colorimétrica, solo se consiguió actividad antibacteriana significativa con el extracto de *Lomanthus yauyensis* frente a *Bacillus cereus* cepa alimentaria con una CMI = 1000 µg/mL (Figura 18), mas no presentó actividad antibacteriana a concentraciones ≤ 4000 µg/mL frente a las demás cepas en estudio. Dicha actividad podría deberse a los compuestos fenólicos presentes, en especial flavonoides (ausentes en *L. tovari*) ya que en estudios de evaluación de actividad antimicrobiana hecho a *Taraxacum officinale* “diente de león” de la familia Asteraceae, la presencia de flavonoides, quinonas y triterpenos en el extracto etanólico de las hojas le brindó

actividad antimicrobiana relevante a la concentración de 1000 µg/µL por el método de difusión en agar frente a ocho microorganismos ⁶⁵.

La actividad antimicrobiana podría haberse ejercido lesionando la membrana plasmática que contienen lípidos, lo que determina la pérdida del contenido celular ⁶⁶, por lo que resulta de importancia la actividad presentada ya que sería una nueva fuente en la medicina alternativa para el tratamiento de la infección causada por *B. cereus*.

VI. CONCLUSIONES

- El análisis fitoquímico preliminar evidenció la presencia de taninos, alcaloides y esteroides para los extractos de ambas especies.
- La actividad antioxidante para los extractos de ambas especies resultó menor en comparación con los estándares ácido ascórbico y Trolox®.
- La actividad antibacteriana del extracto de *Lomanthus yauyensis* fue significativa frente a *Bacillus cereus* cepa alimentaria con una CMI de 1000 µg/mL, mas no contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. El extracto etanólico de las hojas de *Lomanthus Tovar* presentó actividad antibacteriana no significativa con una CMI de 4000 µg/mL frente a *Bacillus cereus* cepa alimentaria.

RECOMENDACIONES

- El estudio para determinar la propiedad antioxidante y antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas de *Lomanthus tovari* y *Lomanthus yauyensis* debe continuar con estudios posteriores como por ejemplo de extracción de aceites esenciales.
- Se recomienda separar y caracterizar los metabolitos secundarios encontrados en ambas especies vegetales y determinar qué sustancias específicas les brindan sus actividades antioxidantes.
- Con la evidencia de la presencia de alcaloides y taninos en ambas plantas, se pueden realizar estudios *in vivo* de actividad antiespasmódica y antiinflamatoria.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Resistencia a los antibióticos [internet]. 2018. [Citado el 24 de octubre del 2018] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
2. OMS. Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo [internet]. 2018. [Citado el 24 de octubre del 2018] Disponible en: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>
3. OMS. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo [internet]. 2014. [Citado el 24 de octubre del 2018] Disponible en: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
4. Zampini I, Cudmani N, Isla M. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. Acta Bioquím Clín Latinoam. 2007; 41(3): 385-393.
5. Vitto L, Petenatti E. Asteráceas de importancia económica y ambiental. primera parte. sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. Multequina. 2009; 1(18): 87-115
6. Malca J, Rodriguez C. Identificación preliminar de fitoconstituyentes presentes en las hojas de *Lomanthus truxillensis* procedentes del valle El Platanar de la provincia de Otuzco, región de La Libertad [Tesis para optar el título profesional]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2017.
7. Ochoa K, Paredes L, Bejarano D, Silva R. Extraction, characterization and evaluation of antibacterial activity of essential oil of *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). Scientia agropecuaria. 2012; 3(1): 291-302.

8. Alí Y, Acebey S, Alvarez D, Condori A, Huari C, Huaycho A. Inhibición de *Staphylococcus aureus* mediante la Actividad Antibacteriana de Plantas Medicinales Bolivianas. SCientifica. 2009; 7(1): 29-32.
9. Lopez S, Lima B, Agüero M, López M, Hadad M, Zygadlo J, et al. Chemical composition, antibacterial and repellent activities of *Azorella trifurcata*, *Senecio pogonias*, and *Senecio oreophyton* essential oils. Arab J Chem. 2014; 11(1): 1-7.
10. Paredes A, Leyton Y, Riquelme C, Morales G. A plant from the altiplano of Northern Chile *Senecio nutans*, inhibits the *Vibrio cholera* pathogen. Springerplus. 2016; 5(1):1788-1795.
11. Santander J, Otto C, Lowry D, Cuellar M, Mellado M, Salas C, et al. Specific Gram-Positive Antibacterial Activity of 4-hydroxy-3-(3-methyl-2- butenyl) Acetophenone Isolated from *Senecio graveolens*. Br Microbiol Res J 2015; 5(2):94-106.
12. Nordenstam B, Pelsner P, Walter L. *Lomanthus*, a new genus of the Compositae-Senecioneae from Ecuador, Peru, Bolivia and Argentina. Comp Newsl. 2009; 47(1):37-41.
13. Benites J, Bravo F, Rojas M, Fuentes R, Moiteiro C, Venancio F. Composition and antimicrobial screening of the essential oil from the leaves and stems of *Senecio atacamensis* phil. From Chile. J Chil Chem Soc. 2011; 56(2): 712-714.
14. El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los andes. Informe final [internet]. Viena: Organización de las Naciones Unidas Para el Desarrollo Industrial; 2008. [Citado el 10 de setiembre del 2018] Disponible en: https://www.unido.org/sites/default/files/2009-07/08-53895_Ebook_0.PDF
15. Funk V, Susanna A, Stuessy T, Bayer R. Systematics, Evolutions, and Biogeography of Compositae. Viena: International Association for Plant Taxonomy, 2009. 965p.
16. Beltrán H, Granda A, León B, Sagátegui A, Sánchez I, Zapata M. Asteráceas endémicas del Perú. Rev peru biol. 2006; 13(2): 64-164.
17. Beltrán H. Las Asteráceas (Compositae) del distrito de Laraos (Yauyos, Lima, Perú). Rev peru biol. 2016; 23(2): 195-220.

18. Pardo J. Patentabilidad de los extractos vegetales. [internet] 2002. [Citado el 5 de enero del 2018] de: http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patente_sextractosplantas.pdf
19. Calvo M, Angulo E, Costa-Batllo P, Shiva C, Adelantado C, Vicente A. Natural Plant Extracts and Organic Acids: Synergism and Implication on Piglet's Intestinal Microbiota. *Biotechnology*. 2005; (2): 137-142.
20. García A., Pérez E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*. 2009; 2(3): 119-145
21. Peñarrieta J, Tejeda L, Mollinedo P, Vila J, Bravo J. Phenolic Compounds in Food. *Rev Boliv Quím*. 2014; 31(2): 68-81.
22. Kozubek A, Tyman J. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chemical Reviews*. 1999; 99: 1-26.
23. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*. 2009; 52(2): 73-75.
24. Andersen Ø, Markham K. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Estados Unidos: Taylor and Francis Group, 2006. 1212p.
25. Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol*. 1998; 3: 249-255.
26. Sudheesh S, Sandhya C, Sarah K, Vijayalakshmi N. Antioxidant activity of flavonoids from *solanum melongena*. *Phyto Research*. 1999; 13(1): 393- 396.
27. Rosas K. Análisis de los principios activos en *Caléndula officinalis* y *Camellia sinesis* [Tesis para optar el título profesional]. México D.F: Instituto Politécnico Nacional; 2009.
28. Martínez M. Oxygen free radicals and human diseases. *Biochemic* 1995; 77: 147-161.
29. Avello, M., Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. 2006; (494): 161-172

30. Ames B, Shigenaga M, Hagen T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90(79):15- 22.
31. Olivares L, Betanzos G, Sumaya M. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. Investigación y ciencia. 2010; 18(50): 10-15.
32. Iglesias J. Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca [Tesis].
33. Wright J, Johnson E, Dilabio G. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. J Am Chem Soc. 2001; 123(1): 1173-1183.
34. Nur Alam, Jahan N, Rafiquzzaman. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saud Pharm Journal.2013; 21:143-15.
35. Rivas-Morales M, Investigación en plantas de importancia médica. México: OmniaScience, 2016. 450p
36. Mesa-Vanegas A, Zapata-Urbe S, Arana L, Zapata I, Monsalve Z, Rojano B. Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. Bol Latin Caribe Plant Med Arom.2015;14(1):1-10.
37. Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technol. 1995; 28(1):25-30.
38. Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico. 2008; 8(1): 56-72.
39. Londoño J. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. capítulo 9 parte III. [citado el 27 de mayo del 2019] Disponible en:
<http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129-162.pdf>

40. Alam Md. N., Jahan N., Rafiquzzaman Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013; 21(2):143-152.
41. Litescu, S. C., Eremia, S., & Radu, G. L. (2010). *Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials. Bio-Farms for Nutraceuticals*, 241–249. doi:10.1007/978-1-4419-7347-4_18 disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-7347-4_18
42. Zulueta A., Esteve M., Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*. 2009; 114: 310–316
43. Ramírez L., Marín D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2009; 42: 263-268.
44. Sawai J, Doi R, Maekawa Y, Yoshikawa T, Kojima H. Indirect conductimetric assay of antibacterial activities. *J Indu Microb Biotech*. 2002; 29(1): 296-298.
45. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett*. 2016; 38(6):1015-1019.
46. 'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000; 267:5421-5426.
47. Liu M, Seidel V, Katerere D, Gray A. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*. 2007; 42(4):325-329.
48. Turnbull P, Jørgensen K, Kramer J, Gilbert R, Parry J. Several clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and apparent involvement of exotoxins. *J Clin Pathol*. 1979; 32:89-293.
49. Pérez I. *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Rev Cuba Salud púb*. 2012; 38(1): 98-108.

50. Sánchez J., Correa M., Castañeda-Sandoval L. *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública* 34(2): 230-242.
51. Beltrán C., Díaz F., Gómez H. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. *Rev Cubana Plant Med.* 2013; 18(4): 619-631.
52. Lock O. Investigación fitoquímica. Fondo editorial de PUCP. 2016.
53. Rojas J, Tomás G. Tamizaje fitoquímico y actividad antioxidante in vitro de *Passiflora edulis sims* (maracuyá). *Rev Per Quím Ing Quím.* 2010; 13(1): 23-29.
54. Re R, Pellegrini N, Preteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 1999; 26 (9/10): 1231-1237
55. Wayne D. Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud. México: Limusa Wiley, 2002. 915p
56. CLSI. Methods or dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-tenth Edition. CLSI document M07- A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
57. Sarker S, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007; 42(4): 321-324.
58. Arnao M. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Technol.* 2000; 11:419-421.
59. Kuskoski E, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc Tecnol Aliment Campinas.* 2005; 25(4): 726-732.
60. Echavarría A, D'Armas H, Matute-L N, Jaramillo C, Rojas-de-Astudillo L, Benítez R. Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos

- secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales. Revista Ciencia UNEMI. 2016; 9(20):29-35.
61. Rivas K, Muñoz L, Pino C, Balcázar N. Actividad antioxidante, contenido fenólico total y citotoxicidad de extractos polares obtenidos de plantas antidiabéticas colombianas. Rev. Cuba Plant Med. 2015; 20(3):277-289.
 62. Pannala A, Chan T, O'Brien P, Rice-Evans C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. Biochem Biophys Res Com. 2001; 282: 1161-1168.
 63. Martínez C, Cano A. Plantas medicinales con alcaloides en la provincia de Jaén. Bol Instit Estud Giennenses. 2009; 200:125-163.
 64. Campagna M, Martínez M, Broussalis A, Gattuso M. Actividad antioxidante, análisis fitoquímico y micrografía analítica de hojas de *Castela tweedii* (Simaroubaceae). Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2012;11(6): 498-509.
 65. Rodríguez C, Zarate A, Sánchez L. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. NOVA. 2017; 15 (27): 119-129.
 66. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. Argentina: Médica panamericana, 2007. 959p.

ANEXOS

ANEXO 1

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com

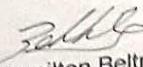
CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la planta proporcionada por la Srta. MILUZKA ROCIO LUNA APAZA, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Lomanthus tovari* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Asterales
Familia: Asteraceae
Genero: *Lomanthus*
Especie: *Lomanthus tovari* (Cabrera) B. Nord. & Pelser
(=*Senecio tovarii* Cabrera)

Se expide la presente certificación a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Lima, 07 Abril 2018


Blgo. Hamilton Beltrán
Hamilton Wilmer Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
CRP 2719

Constancia de identificación botánica de *Lomanthus tovari*

ANEXO 2

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com

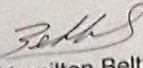
CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la planta proporcionada por la Srta. MILUZKA ROCIO LUNA APAZA, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Lomanthus yauyensis* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Asterales
Familia: Asteraceae
Genero: *Lomanthus*
Especie: *Lomanthus yauyensis* (Cabrera) B. Nord. & Pelser
(=*Senecio yauyensis* Cabrera)

Se expide la presente certificación a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Lima, 07 Abril 2018


Btgo. Hamilton Beltrán
Hamilton Wilmer Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
CRP. 2719

Constancia de identificación botánica de *Lomanthus yauyensis*

ANEXO 3

Tabla 18. Prueba de Tukey- Comparaciones múltiples (ensayo de DPPH de

Lomanthus tovari)

Variable

dependiente:

Absorbancias HSD

Tukey

(I) GRUPO S	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 µg/ml	12,5µg/ml	0,089333*	0,008221	0,00	0,06172	0,11695
	25 µg/ml	0,167333*	0,008221	0,00	0,13972	0,19495
	50 µg/ml	0,336667*	0,008221	0,00	0,30905	0,36428
	75 µg/ml	0,479333*	0,008221	0,00	0,45172	0,50695
	100 µg/ml	0,512667*	0,008221	0,00	0,48505	0,54028
12,5µg/ ml	0 µg/ml	-0,089333*	0,008221	0,00	-0,11695	-0,06172
	25 µg/ml	0,078000*	0,008221	0,00	0,05038	0,10562
	50 µg/ml	0,247333*	0,008221	0,00	0,21972	0,27495
	75 µg/ml	0,390000*	0,008221	0,00	0,36238	0,41762
	100 µg/ml	0,423333*	0,008221	0,00	0,39572	0,45095
25 µg/ml	0 µg/ml	-0,167333*	0,008221	0,00	-0,19495	-0,13972
	12,5µg/ml	-0,078000*	0,008221	0,00	-0,10562	-0,05038

50 µg/ml		0,169333*	0,008221	0,00	0,14172	0,19695
75 µg/ml		0,312000*	0,008221	0,00	0,28438	0,33962
100 µg/ml		0,345333*	0,008221	0,00	0,31772	0,37295
50 µg/ml	0 µg/ml	-0,336667*	0,008221	0,00	-0,36428	-0,30905
	12,5 µg/ml	-0,247333*	0,008221	0,00	-0,27495	-0,21972
	25 µg/ml	-0,169333*	0,008221	0,00	-0,19695	-0,14172
	75 µg/ml	0,142667*	0,008221	0,00	0,11505	0,17028
	100 µg/ml	0,176000*	0,008221	0,00	0,14838	0,20362
75 µg/ml	0 µg/ml	-0,479333*	0,008221	0,00	-0,50695	-0,45172
	12,5 µg/ml	-0,390000*	0,008221	0,00	-0,41762	-0,36238
	25 µg/ml	-0,312000*	0,008221	0,00	-0,33962	-0,28438
	50 µg/ml	-0,142667*	0,008221	0,00	-0,17028	-0,11505
	100 µg/ml	0,033333*	0,008221	0,015	0,00572	0,06095
100 µg/ml	0 µg/ml	-0,512667*	0,008221	0,00	-0,54028	-0,48505
	12,5 µg/ml	-0,423333*	0,008221	0,00	-0,45095	-0,39572
	25 µg/ml	-0,345333*	0,008221	0,00	-0,37295	-0,31772
	50 µg/ml	-0,176000*	0,008221	0,00	-0,20362	-0,14838
	75 µg/ml	-0,033333*	0,008221	0,015	-0,06095	-0,00572

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 4

Tabla 19. Prueba de Tukey – Comparaciones múltiples (ensayo con DPPH de

Lomanthus yauyensis)

Variable

dependiente:

Absorbancias HSD

Tukey

(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 µg/ml	25 µg/ml	0,141667*	0,006128	0,00	0,12108	0,16225
	50 µg/ml	0,207667*	0,006128	0,00	0,18708	0,22825
	75 µg/ml	0,294667*	0,006128	0,00	0,27408	0,31525
	100 µg/ml	0,362000*	0,006128	0,00	0,34142	0,38258
	200 µg/ml	0,556333*	0,006128	0,00	0,53575	0,57692
25 µg/ml	0 µg/ml	-0,141667*	0,006128	0,00	-0,16225	-0,12108
	50 µg/ml	0,066000*	0,006128	0,00	0,04542	0,08658
	75 µg/ml	0,153000*	0,006128	0,00	0,13242	0,17358
	100 µg/ml	0,220333*	0,006128	0,00	0,19975	0,24092
	200 µg/ml	0,414667*	0,006128	0,00	0,39408	0,43525
50 µg/ml	0 µg/ml	-0,207667*	0,006128	0,00	-0,22825	-0,18708
	25 µg/ml	-0,066000*	0,006128	0,00	-0,08658	-0,04542
	75 µg/ml	0,087000*	0,006128	0,00	0,06642	0,10758

	100 µg/ml	0,154333*	0,006128	0,00	0,13375	0,17492
	200 µg/ml	0,348667*	0,006128	0,00	0,32808	0,36925
75 µg/ml	0 µg/ml	-0,294667*	0,006128	0,00	-0,31525	-0,27408
	25 µg/ml	-0,153000*	0,006128	0,00	-0,17358	-0,13242
	50 µg/ml	-0,087000*	0,006128	0,00	-0,10758	-0,06642
	100 µg/ml	0,067333*	0,006128	0,00	0,04675	0,08792
	200 µg/ml	0,261667*	0,006128	0,00	0,24108	0,28225
100 µg/ml	0 µg/ml	-0,362000*	0,006128	0,00	-0,38258	-0,34142
	25 µg/ml	-0,220333*	0,006128	0,00	-0,24092	-0,19975
	50 µg/ml	-0,154333*	0,006128	0,00	-0,17492	-0,13375
	75 µg/ml	-0,067333*	0,006128	0,00	-0,08792	-0,04675
	200 µg/ml	0,194333*	0,006128	0,00	0,17375	0,21492
200 µg/ml	0 µg/ml	-0,556333*	0,006128	0,00	-0,57692	-0,53575
	25 µg/ml	-0,414667*	0,006128	0,00	-0,43525	-0,39408
	50 µg/ml	-0,348667*	0,006128	0,00	-0,36925	-0,32808
	75 µg/ml	-0,261667*	0,006128	0,00	-0,28225	-0,24108
	100 µg/ml	-0,194333*	0,006128	0,00	-0,21492	-0,17375

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 5

Tabla 20. Prueba de Tukey- Comparaciones múltiples (ensayo con ABTS de

Lomanthus tovari).

Variable

dependiente:

Absorbancias HSD

Tukey

(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 µg/ml	12,5 µg/ml	0,0625000*	0,0111169	0,00	0,025159	0,099841
	25 µg/ml	0,1410000*	0,0111169	0,00	0,103659	0,178341
	50 µg/ml	0,2341333*	0,0111169	0,00	0,196792	0,271474
	75 µg/ml	0,3443000*	0,0111169	0,00	0,306959	0,381641
	100 µg/ml	0,4288333*	0,0111169	0,00	0,391492	0,466174
12.5 µg/ml	0 µg/ml	-0,0625000*	0,0111169	0,00	-0,099841	-0,025159
	25 µg/ml	0,0785000*	0,0111169	0,00	0,041159	0,115841
	50 µg/ml	0,1716333*	0,0111169	0,00	0,134292	0,208974
	75 µg/ml	0,2818000*	0,0111169	0,00	0,244459	0,319141
	100 µg/ml	0,3663333*	0,0111169	0,00	0,328992	0,403674
25 µg/ml	0 µg/ml	-0,1410000*	0,0111169	0,00	-0,178341	-0,103659
	12.5 µg/ml	-0,0785000*	0,0111169	0,00	-0,115841	-0,041159
	50 µg/ml	0,0931333*	0,0111169	0,00	0,055792	0,130474

	75 µg/ml	0,2033000*	0,0111169	0,00	0,165959	0,240641
	100 µg/ml	0,2878333*	0,0111169	0,00	0,250492	0,325174
50 µg/ml	0 µg/ml	-0,2341333*	0,0111169	0,00	-0,271474	-0,196792
	12,5 µg/ml	-0,1716333*	0,0111169	0,00	-0,208974	-0,134292
	25 µg/ml	-0,0931333*	0,0111169	0,00	-0,130474	-0,055792
	75 µg/ml	0,1101667*	0,0111169	0,00	0,072826	0,147508
	100 µg/ml	0,1947000*	0,0111169	0,00	0,157359	0,232041
75 µg/ml	0 µg/ml	-0,3443000*	0,0111169	0,00	-0,381641	-0,306959
	12,5 µg/ml	-0,2818000*	0,0111169	0,00	-0,319141	-0,244459
	25 µg/ml	-0,2033000*	0,0111169	0,00	-0,240641	-0,165959
	50 µg/ml	-0,1101667*	0,0111169	0,00	-0,147508	-0,072826
	100 µg/ml	0,0845333*	0,0111169	0,00	0,047192	0,121874
100 µg/ml	0 µg/ml	-0,4288333*	0,0111169	0,00	-0,466174	-0,391492
	12,5 µg/ml	-0,3663333*	0,0111169	0,00	-0,403674	-0,328992
	25 µg/ml	-0,2878333*	0,0111169	0,00	-0,325174	-0,250492
	50 µg/ml	-0,1947000*	0,0111169	0,00	-0,232041	-0,157359
	75 µg/ml	-0,0845333*	0,0111169	0,00	-0,121874	-0,047192

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 6

Tabla 21. Prueba de Tukey – Comparaciones múltiples (ensayo con ABTS de

Lomanthus yauyensis).

Variable

dependiente:

Absorbancias HSD

Tukey

(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 µg/ml	25 µg/ml	0,0781667*	0,0065589	0,00	0,056136	0,100198
	50 µg/ml	0,1516000*	0,0065589	0,00	0,129569	0,173631
	75 µg/ml	0,2124333*	0,0065589	0,00	0,190402	0,234464
	100 µg/ml	0,2615667*	0,0065589	0,00	0,239536	0,283598
	150 µg/ml	0,3776333*	0,0065589	0,00	0,355602	0,399664
25 µg/ml	0 µg/ml	-0,0781667*	0,0065589	0,00	-0,100198	-0,056136
	50 µg/ml	0,0734333*	0,0065589	0,00	0,051402	0,095464
	75 µg/ml	0,1342667*	0,0065589	0,00	0,112236	0,156298
	100 µg/ml	0,1834000*	0,0065589	0,00	0,161369	0,205431
	150 µg/ml	0,2994667*	0,0065589	0,00	0,277436	0,321498
50 µg/ml	0 µg/ml	-0,1516000*	0,0065589	0,00	-0,173631	-0,129569
	25 µg/ml	-0,0734333*	0,0065589	0,00	-0,095464	-0,051402
	75 µg/ml	0,0608333*	0,0065589	0,00	0,038802	0,082864

	100 µg/ml	0,1099667*	0,0065589	0,00	0,087936	0,131998
	150 µg/ml	0,2260333*	0,0065589	0,00	0,204002	0,248064
75 µg/ml	0 µg/ml	-0,2124333*	0,0065589	0,00	-0,234464	-0,190402
	25 µg/ml	-0,1342667*	0,0065589	0,00	-0,156298	-0,112236
	50 µg/ml	-0,0608333*	0,0065589	0,00	-0,082864	-0,038802
	100 µg/ml	0,0491333*	0,0065589	0,00	0,027102	0,071164
	150 µg/ml	0,1652000*	0,0065589	0,00	0,143169	0,187231
100 µg/ml	0 µg/ml	-0,2615667*	0,0065589	0,00	-0,283598	-0,239536
	25 µg/ml	-0,1834000*	0,0065589	0,00	-0,205431	-0,161369
	50 µg/ml	-0,1099667*	0,0065589	0,00	-0,131998	-0,087936
	75 µg/ml	-0,0491333*	0,0065589	0,00	-0,071164	-0,027102
	150 µg/ml	0,1160667*	0,0065589	0,00	0,094036	0,138098
150 µg/ml	0 µg/ml	-0,3776333*	0,0065589	0,00	-0,399664	-0,355602
	25 µg/ml	-0,2994667*	0,0065589	0,00	-0,321498	-0,277436
	50 µg/ml	-0,2260333*	0,0065589	0,00	-0,248064	-0,204002
	75 µg/ml	-0,1652000*	0,0065589	0,00	-0,187231	-0,143169
	100 µg/ml	-0,1160667*	0,0065589	0,00	-0,138098	-0,094036

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 7



Figura 19. Acondicionado de ambas plantas en el que se seleccionaron las hojas de *L.* y a la izquierda y de *L.t* a la derecha.



Figura 20. Secado de las plantas en estufa

ANEXO 8



Figura 21. Filtración de los macerados etanólicos



Figura 22. Obtención de los extractos etanólicos secos