Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Actividad antiinflamatoria, capacidad antioxidante y toxicidad de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de hojas de *Senecio rufescens* D.C.

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Enrique Javier AGUILAR FELICES

ASESORES

Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Edwin Carlos ENCISO ROCA (Coasesor)

Lima, Perú

2023



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

Aguilar E. Actividad antiinflamatoria, capacidad antioxidante y toxicidad de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de hojas de *Senecio rufescens* D.C. [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Enrique Javier Aguilar Felices
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06918713
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6565-4756
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Pablo Enrique Bonilla Rivera
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07212707
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7286-6810
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Edwin Carlos Enciso Roca
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	28293693
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4089-5905
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Luis Miguel Visitacion Félix Veliz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07371298
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Oscar Herrera Calderón
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	44789288
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Ernesto Raúl Torres Véliz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	21849530
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.1.1. Plantas medicinales con potencial farmacéutico y productos naturales terapéuticos: (estudios fitoquímicos, estudios toxicológicos, estudios farmacológicos, procesos de su industrialización)
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia. Lima Distrito: Lima Jirón Huanta 1182 Latitud: -12.0556133 Longitud: -77.0235747 Edificio: Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga País: Perú Departamento: Ayacucho Provincia: Huamanga Distrito: Ayacucho Av. Independencia s/n Ciudad Universitaria Latitud: -13.1480911 Longitud: -74.2214047
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Abril 2019 – junio 2021
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05 Química medicinal http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.06 Toxicología http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07

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

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Siendo las **08:00 hrs. del 18 de agosto de 2023** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr. Luis Miguel Visitacion Felix Veliz e integrado por los siguientes miembros: Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (asesor), Dr. Oscar Herrera Calderón y el Dr. Ernesto Raul Torres Véliz para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Senecio rufescens* D.C"**, presentado por el Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos **Enrique Javier Aguilar Felices.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**, Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

19 (DIECINUEVE) EXCELENTE

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos **Enrique Javier Aguilar Felices,** el Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las 9:45 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 9:45 hrs. del 18 de agosto de 2023

Dr. Luis Miguel Visitacion Felix Veliz (P. P. T.C.)
Presidente

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (P.P, T. C)
Miembro - Asesor

Dr. Oscar Herrera Calderón (P. Asoc, T.C.)
Miembro

Dr. Ernesto Raul Torres Véliz (P. P., D.E.)
Miembro

Observaciones:

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1
Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email:upg.farmacia@unmsm.edu.pe

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera en mi condición de asesor acreditado con la Dictamen N°108-FFB-UPG-2019 de la tesis, cuyo título es: : **ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Senecio rufescens* D.C,** presentado por el Magíster **Enrique Javier Aguilar Felices** para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según larevisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documentoevaluado cuenta con el porcentaje de 10% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuarcon los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado correspondiente.

Firma de la Asesor _____

DNI: 07212707

Nombres y apellidos del asesor:

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera



DEDICATORIA

Para mi madre Naciancina y mi hermana Úrsula, quienes desde el cielo guían mi camino. A mi esposa, mis hijos, mi padre Santiago, mis hermanos y sobrinos.

AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater*, la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, formadora de profesionales químico farmacéuticos con pensamiento crítico y una gran sensibilidad social.

A los docentes del Doctorado en Farmacia y Bioquímica, quienes realizaron valiosas sugerencias durante el desarrollo de las diferentes asignaturas contribuyendo en la concepción y ejecución del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera, asesor de la presente tesis, por su generosidad, apoyo permanente, sugerencias y recomendaciones.

Al Dr. Edwin Carlos Enciso Roca, co – asesor de la presente tesis, quién contribuyó en la parte farmacológica y toxicológica.

Al Dr. Oscar Herrera Calderón, compañero de promoción quién compartió desde el inicio la concepción y realizó importantes sugerencias.

A todas las personas e instituciones que apoyaron desinteresadamente.

RESUMEN

Senecio rufescens DC es una especie medicinal utilizada en el tratamiento de problemas digestivos y mal de altura, que crece en la región altoandina del sur del Perú. La presente investigación se realizó con el propósito de caracterizar y cuantificar los compuestos fenólicos presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas y determinar su capacidad antioxidante, antiinflamatoria y su toxicidad por el método de *Artemia salina*. Mediante la técnica de UHPLC – MS/MS, fueron identificados nueve flavonoides glicosilados metoxilados, de los cuales, ocho son flavonoles y una isoflavona; y seis ácidos fenólicos, de los cuales, uno es derivado del ácido málico y cinco son derivados del ácido cinámico. Los compuestos fenólicos expresados como fenoles totales, flavonoides y flavonoles, demostraron su capacidad antioxidante frente a los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP; y actividad antiinflamatoria con una correlación directa positiva. Asimismo, tuvieron una toxicidad moderada (CL_{50} = 123,58 µg/mL). Se concluye que, los compuestos fenólicos presentes son flavonoles metoxilados, isoflavona metoxilada y ácidos fenólicos, quienes son los responsables de su capacidad antioxidante, antiinflamatoria y de su toxicidad moderada.

Palabras clave: *Senecio rufescens* DC., *compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, actividad antiinflamatoria, toxicidad.*

ABSTRACT

Senecio rufescens DC is a medicinal plant used in the treatment digestive problems and altitude sickness, which growth in the high Andean region of southern Peru. The present investigation was carried out with the purpose of identifying the phenolic compounds present in the hydroalcoholic extract of the leaves and determining its antioxidant and anti-inflammatory capacity by the membrane stabilization method and its toxicity by the *Artemia salina* assay. Using the UHPLC – MS/MS technique, nine methoxylated glycosylated flavonoids were identified, of which eight are flavonols and one isoflavone; and six phenolic acids, of which one is derived from malic acid and five are derived from cinnamic acid. The phenolic compounds expressed as total phenols, flavonoids and flavonols, demonstrated their antioxidant capacity against the DPPH, ABTS and FRAP assays; and anti-inflammatory activity with a direct positive correlation. They also had moderate toxicity (LC_{50} = 123.58 µg/mL). It is concluded that the phenolic compounds present are methoxylated flavonols, methoxylated isoflavone and phenolic acids, which are responsible for their antioxidant, anti-inflammatory and moderate toxicity.

Key words: *Senecio rufescens* DC., *phenolic compounds, antioxidant capacity, antiinflammatory activity, toxicity.*

RESUMO

Senecio rufescens DC é uma planta alta andina do Peru, usada para tratar problemas digestivos e mal de altitude. A presente investigação foi realizada com o objetivo de identificar os compostos fenólicos presentes no extrato hidroalcoólico das folhas e determinar sua capacidade antioxidante e antiinflamatória pelo método de estabilização de membrana e sua toxicidade pelo ensaio de Artemia salina. Utilizando a técnica UHPLC – MS/MS, foram identificados nove flavonoides glicosilados metoxilados, sendo oito flavonóis e um isoflavona; e seis ácidos fenólicos, dos quais um é derivado do ácido málico e cinco são derivados do ácido cinâmico. Os compostos fenólicos expressos em fenóis totais, flavonoides e flavonóis demonstraram capacidade antioxidante frente aos ensaios DPPH, ABTS e FRAP; e atividade anti-inflamatória com correlação positiva direta. Eles também apresentaram toxicidade moderada (LC_{50} = 123,58 µg/mL). Conclui-se que os compostos fenólicos presentes são flavonóis metoxilados, isoflavona metoxilada e ácidos fenólicos, que são responsáveis por sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória e toxicidade moderada.

Palavras-chave: Senecio rufescens DC., compostos fenólicos, capacidade antioxidante, atividade antiinflamatória, toxicidade.

ÍNDICE

DEDICATORIA ii
AGRADECIMIENTOS iii
RESUMEN iv
ABSTRACT v
RESUMO vi
ÍNDICE vii
ÍNDICE DE TABLAS viii
ÍNDICE DE FIGURAS x
ÍNDICE DE ANEXOS xi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 1
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO 4
2.1. Planteamiento del problema de investigación 4
2.2. Antecedentes del problema 4
2.3. Bases teóricas 5
2.4. Glosario o definición de términos 18
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA 22
3.1. Tipo de investigación 22
3.2. Diseño metodológico 22
3.3. Unidad de análisis 22
3.4. Población de estudio 22
3.5. Muestra 22
3.6. Criterio de selección 22
3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos 22
3.7. Procesamiento de datos 28
3.8. Consideraciones éticas 28
CAPÍTULO IV. RESULTADOS 29
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN 43
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES 62
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 63
CAPÍTULO VIII. ANEXOS 77

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Clasificación de compuestos fenólicos de las plantas basada en número de carbonos y bloques de construcción.	8
Tabla 2	Fenoles en el género *Senecio*	10
Tabla 3	Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico en el género *Senecio*	11 - 13
Tabla 4	Ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico en el género *Senecio*	13
Tabla 5	Derivados del ácido fenilacético en el género *Senecio*	14
Tabla 6	Semiquinoles en el género *Senecio*	14
Tabla 7	Flavonoles derivados de núcleo kaempferol en el género *Senecio*	14
Tabla 8	Flavonoles derivados de núcleo isorhamnetina en el género *Senecio*	15
Tabla 9	Flavonoles derivados de núcleo quercetina y sus derivados en el género *Senecio*	15 - 16
Tabla 10	Flavanonas en el género *Senecio*	16
Tabla 11	Flavonas en el género *Senecio*	16
Tabla 12	Flavanoles en el género *Senecio*	16
Tabla 13	Chalconas en el género *Senecio*	17
Tabla 14	Cumarinas en el género *Senecio*	17
Tabla 15	Mezclas de solventes empleados en la cromatografía de columna	24
Tabla 16	Metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico y de sus fracciones	29
Tabla 17	Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico.	29
Tabla 18	Fenoles, flavonoides y compuestos secuestradores del radical libre DPPH presentes en las 13 fracciones obtenidas por cromatografía en columna	30

Tabla 19	Longitudes de onda (nm) de las curvas espectrales de los compuestos fenólicos aislados de las fracciones 9, 10, 11, 12 y 13.	30
Tabla 20	Identificación de los compuestos fenólicos basado en su tiempo de retención, *m/z* y patrones de fragmentación por UHPLC – MS/MS del extracto hidroalcohólico.	32 – 35
Tabla 21	Rendimiento del extracto metanólico y de sus fracciones; y del extracto hidroalcohólico.	37
Tabla 22	Contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles del extracto metanólico y de sus fracciones.	38
Tabla 23	Contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles del extracto hidroalcohólico.	38
Tabla 24	Capacidad antioxidante del extracto metanólico y de sus fracciones.	38
Tabla 25	Contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles de concentraciones del extracto hidroalcohólico.	39
Tabla 26	Capacidad antioxidante de concentraciones del extracto hidroalcohólico.	39
Tabla 27	Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de fenoles totales, flavonoides y flavonoles y su coeficiente de correlación con la capacidad antioxidante	39
Tabla 28	Matriz correlacional entre contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles y su capacidad antioxidante.	40
Tabla 29	Coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de fenoles, flavonoides y flavonoles y el porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos.	40
Tabla 30	Concentración letal 50 (CL_{50}) por efecto de la exposición de los compuestos fenólicos frente a nauplios de *Artemia salina*	44

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico	9
Figura 2	Ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico	9
Figura 3	Estructura básica del núcleo flavonoide	9
Figura 4	TPTZ	19
Figura 5	Perfil cromatográfico por UHPLC – MS/MS de los compuestos fenólicos contenidos en el extracto hidroalcohólico, en modo ESI negativo (superior) y positivo(inferior).	31
Figura 6	Flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico.	36
Figura 7	Ácidos fenólicos contenidos en el extracto hidroalcohólico.	37
Figura 8	Porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos por efecto de los compuestos fenólicos contenidos en el extracto hidroalcohólico.	41

ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Subgrupos de flavonoides	77
Anexo 2	Lugar y ubicación del lugar de colecta con ayuda de GPS Garmin	78
Anexo 3	Muestra herborizada para su certificación botánica.	78
Anexo 4	Constancia de certificación botánica	79
Anexo 5	Hojas desecadas, seleccionadas y conservadas en una caja de cartón.	80
Anexo 6	Concentración del extracto hidroalcohólico.	80
Anexo 7	Screening fitoquímico según Miranda.	86
Anexo 8	Cromatografía en columna	81
Anexo 9	Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto metanólico.	82
Anexo 10	Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hidroalcohólico.	82
Anexo 11	Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna.	83
Anexo 12	Cromatografía en capa fina de las fracciones 9, 10, 11, 12 y 13.	83
Anexo 13	Delimitación de zonas evidenciadas por luz UV (366 nm) de la cromatografía en capa fina de las fracciones 9,10, 11, 12 y 13.	84
Anexo 14	Flujograma para la cuantificación de fenoles totales.	84
Anexo 15	Curva de calibración del ácido gálico.	85
Anexo 16	Flujograma para la cuantificación de flavonoides.	85
Anexo 17	Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides	86
Anexo 18	Flujograma para la cuantificación de flavonoles.	86
Anexo 19	Curva de calibración para la cuantificación de flavonoles.	87
Anexo 20	Flujograma para la determinación de la actividad secuestradora del DPPH.	87
Anexo 21	Curva de calibración del Trolox para la evaluación de la actividad secuestradora del radical libre DPPH.	88
Anexo 22	Curva de calibración del Trolox para la cuantificación del porcentaje de secuestramiento del radical libre DPPH.	88

Anexo 23	Flujograma para la determinación de la actividad secuestradora del ABTS•$^{+}$.	89
Anexo 24	Curva de calibración del Trolox para la evaluación de la actividad secuestradora del radical libre ABTS•$^{+}$.	89
Anexo 25	Curva de calibración del Trolox para la cuantificación del porcentaje de secuestramiento del radical libre ABTS•+.	90
Anexo 26	Flujograma para el ensayo FRAP.	90
Anexo 27	Curva de calibración del Trolox para la evaluación del potencial reductor antioxidante del hierro (FRAP).	91
Anexo 28	Materiales, diluciones y equipos utilizados en el ensayo antiinflamatorio *in vitro*.	91
Anexo 29	Protocolo del ensayo antiinflamatorio *in vitro*	92
Anexo 30	Procedimiento y resultados del ensayo antiinflamatorio *in vitro*.	92
Anexo 31	Materiales y equipos utilizados en el bioensayo de *Artemia salina*.	93
Anexo 32	Declaración Jurada de Consentimiento informado	94
Anexo 33	Screening fitoquímico del extracto hidroalcohólico	95
Anexo 34	Ensayo con cloruro férrico al 10%, Shinoda y radical libre DPPH de las fracciones	96
Anexo 35	Curva espectral de la fracción 9,2 recuperada de la cromatografía en capa fina.	97
Anexo 36	Curva espectral de la fracción 9,4 recuperada de la cromatografía en capa fina.	97
Anexo 37	Curva espectral de la fracción 11,4 recuperada de la cromatografía en capa fina.	98
Anexo 38	Porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos.	98
Anexo 39	Gráfico Q – Q del porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos.	99
Anexo 40	ANOVA del porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos.	99
Anexo 41	Prueba de comparaciones múltiples de Scheffé del porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos.	99

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Asteraceae, el género *Senecio* se caracteriza por su gran diversidad, particularmente en el Perú existen especies endémicas adaptadas a condiciones extremas como la cordillera de los Andes, el cual, se debe a su aptitud para biosintetizar metabolitos secundarios que les permite hacer frente al estrés abiótico y biótico, entre las cuales, destacan los compuestos fenólicos por su competencia para neutralizar radicales libres[1]. *Senecio rufescens* DC., es una especie distribuida desde el sur del Perú hasta el norte de Argentina, tradicionalmente utilizada para tratar el "mal de altura" y molestias gastrointestinales corroborada por un reporte etnobotánico, el mismo que requiere ser validado por estudios sobre su composición química y sus propiedades biológicas[2].

La determinación del contenido de compuestos fenólicos en el género *Senecio*, está ampliamente descrita en la literatura[3,4], sin embargo, no existen reportes sobre el contenido de flavonoles y su relación con otros fenoles, como los fenoles totales y flavonoides.

Los estudios sobre la actividad antioxidante *in vitro* en el género *Senecio*, han venido evolucionando conforme se han desarrollado y validado nuevos métodos; y se puede afirmar, que con los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP se abarca un amplio espectro de biomoléculas con capacidad antioxidante[3,5].

Por otro lado, en el género *Senecio*, se ha reportado la existencia de ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico, como son el ácido clorogénico y ácido feruloilquínico; y en el caso de los flavonoides, destacan derivados glicosilados de la isorhamnetina y quercetina[3,6–9]. Asimismo, reportamos por primera vez en este género, derivados glicosilados de la miricetina y quercetagenina. Estas moléculas también están presentes en nuestros resultados, que fueron demostrados por medios cromatográficos y espectroscópicos. También, se resalta el hallazgo por primera vez de una isoflavona en el género *Senecio*.

La búsqueda de especies con potencial antioxidante, es una preocupación permanente en la actualidad, teniendo en cuenta que los antioxidantes tienen la posibilidad de neutralizar a los radicales libres, quienes son responsables de muchas enfermedades agudas y crónicas[10] .

Históricamente, los fármacos antiinflamatorios tuvieron su origen en el descubrimiento fortuito de ciertas plantas y sus extractos, para el alivio del dolor, fiebre y la inflamación. La síntesis de la Aspirina®, llevó al desarrollo de los fármacos antiinflamatorios no

esteroidales (AINEs) enfocados en inhibir la síntesis de las prostaglandinas (PGs), manifestándose después efectos secundarios a nivel del tracto gastrointestinal. En los 90's, se descubrió los dos sistemas enzimáticos de la ciclo – oxigenasa (COX), en el cual, la COX – 1 regula principalmente las funciones gastrointestinales, renales y vasculares, mientras que, la COX – 2 regula la producción de las PGs involucradas en la inflamación, fiebre y dolor. El siglo XXI, es testigo del desarrollo de los inhibidores selectivos de la COX – 2 conocidos como los coxibs (celecoxib y rofecoxib), con menores efectos secundarios en el tracto gastrointestinal, sin embargo, cuando el rofecoxib produjo serios eventos cardiovasculares tuvo que ser retirado del mercado farmacéutico, volviendo sospechosos a todos los coxibs de tener los mismos efectos. Por otro lado, la existencia de procesos inflamatorios sin dolor, como sucede con el cáncer, la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, han hecho del uso de los AINEs y los coxibs útiles en la prevención y tratamiento de dichos procesos patológicos, tal como la aspirina que se utiliza para prevenir enfermedades tromboembólicas. Además, nuevos fármacos antiinflamatorios están siendo descubiertos y desarrollados como inhibidores de la transducción de señales, inhibidores de las citoquinas y otros componentes no prostaglandínicos, para controlar las inflamaciones crónicas y enfermedades neurodegenerativas. En consecuencia, lo que se inició como fármacos para controlar la inflamación, el dolor y la fiebre, en los dos últimos siglos se han desarrollado un enorme rango y tipos de agentes antiinflamatorios; y el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de una variedad de condiciones que no se habían previsto. Asimismo, la exitosa aplicación de los productos naturales, un gran número de los cuales han sido hallados efectivos en controlar la inflamación, pueden conducir al aislamiento de sus componentes activos y el desarrollo de derivados más potentes [11].

También utilizando la filosofía de las tres "R" de reducir, refinar y reemplazar animales de laboratorio por ensayos *in vitro*, se han utilizado estos, en los ensayos experimentales para evaluar la actividad antiinflamatoria y toxicidad de dichos compuestos [12].

Los ensayos de toxicidad *in vitro* se utilizan cada vez más para complementar los ensayos con animales *in vivo*, en el cual, el mayor desafío es la confianza de los datos obtenidos *in vitro*. Se han realizado comparaciones entre el ensayo de *Artemia salina* L. y la toxicidad aguda oral en ratones de 20 extractos vegetales, hallándose una buena correlación entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*, por tanto, dicho ensayo constituye un método útil para predecir la toxicidad aguda oral de extractos vegetales[13].

Finalmente, se corroboró la importancia del uso de herramientas estadísticas como una herramienta útil para establecer una correlación directa y evidenciar la afinidad que podría existir entre el contenido de fenoles totales, flavonoides, flavonoles y los ensayos de capacidad antioxidante, así como, de la actividad antiinflamatoria *in vitro* y la toxicidad de la *Artemia salina*, evaluados en la presente investigación.

Por tanto, la presente investigación se ha desarrollado planteándose los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar la correlación entre contenido de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de hojas de *Senecio rufescens* DC., con su actividad antiinflamatoria, capacidad antioxidante *in vitro*; y toxicidad en el modelo ensayado

Objetivos específicos

1. Determinar los tipos de compuestos fenólicos presentes.
2. Comprobar la relación entre capacidad antioxidante *in vitro* y contenido de compuestos fenólicos.
3. Demostrar la relación entre actividad antiinflamatoria *in vitro* y contenido de compuestos fenólicos.
4. Relacionar toxicidad del bioensayo de *Artemia salina* y el contenido de compuestos fenólicos.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Planteamiento del problema de investigación

Los radicales libres causan inflamación por el daño que producen a nivel celular en los humanos. La inflamación aguda es un evento que puede durar minutos hasta días, caracterizado por una pérdida de proteínas o líquido plasmático y el movimiento de leucocitos hacia el área extravascular, mientras que, la inflamación crónica ocurre cuando no se resuelven dentro de los mecanismos de protección endógenos o mediante algún otro mecanismo de resistencia de las defensas del huésped, el proceso molecular y celular de la inflamación crónica depende del tipo de células y órganos inflamados [14].

Los AINEs están entre los fármacos más populares de venta libre del mundo, constituyendo aproximadamente el 5% de todos los medicamentos prescritos. Mayormente son utilizados para el tratamiento de pacientes que padecen de dolor y condiciones inflamatorias tales como dolor crónico, osteoartritis, condiciones quirúrgicas postoperatorias, dolores menstruales, y aún hoy son utilizadas extensivamente como analgésicos y antipiréticos. Sin embargo, a pesar de su extenso uso terapéutico, los AINEs son conocidos por sus múltiples efectos secundarios, entre los cuales, se incluyen toxicidad gastrointestinal, riesgo cardiovascular, daño renal, y hepatotoxicidad, así como hipertensión y otras dolencias menores [15]. Por tanto, se hace necesario buscar alternativas terapéuticas a los AINEs, para el tratamiento de los procesos inflamatorios agudos y crónicos.

2.2. Antecedentes del problema

En la literatura se reportan estudios acerca del contenido de compuestos fenólicos en extractos metanólicos de nueve especies del género *Senecio* y su actividad secuestradora del radical libre 2,2 – difenil picrilhidrazilo (DPPH), en las cuales, *S. cilicius* Boiss y *S. mollis* Willd., tuvieron mayor contenido de compuestos fenólicos, mientras que, *S. salsaginea* H. Duman & Vural mostró mayor actividad frente al radical libre DPPH y se halló una correlación directa entre capacidad antioxidante total por el test del fosfomolibdeno y contenido de fenoles totales en extractos metanólicos de las nueve especies (r^2 = 0,68); y asimismo, entre contenido de fenoles totales y la actividad secuestradora del radical libre DPPH (r^2 = - 0,85) [16]. En otro estudio, se cuantificó los compuestos fenólicos en cuatro especies del género *Senecio* y se estudió su actividad antioxidante mediante los ensayos de reducción del fosfomolibdeno, actividad secuestradora del DPPH y decoloración del β – caroteno, en las cuales, las especies *S.*

nemorensis L. y *S. racemosus* DC., mostraron mayor concentración de compuestos fenólicos; *S. nemorensis* L. presentó mayor actividad frente al radical libre DPPH y mayor actividad antioxidante total de los extractos (AEE); mientras que, *S. fluviatilis* Wallr., mostró mayor porcentaje de decoloración del β – caroteno; y el coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, fue positiva para fenoles totales y actividad antioxidante total de los extractos (r = 0,788) y negativa (r = - 0,987) para fenoles totales y actividad frente al radical libre DPPH [17]. Por otro lado, Lahlou et al. [18], reportaron la correlación de contenido de flavonoides de *S. anteuphorbium* (L.) Sch. Bip.y su actividad antioxidante (r^2 = 0,90). Finalmente, Chirinos et al. [19], también precisaron la correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de plantas medicinales y nutricionales de los andes peruanos, utilizando el análisis de regresión lineal y coeficiente de Pearson ($p < 0,05$ de confianza). También existen reportes en la literatura científica sobre la actividad antiinflamatoria en especies del género *Senecio*. El extracto acuoso de hojas de *S. confusus* Britten, evidencia tener actividad antinflamatoria en un modelo *in vivo* en ratas Wistar por el método de inflamación inducido por carragenina, utilizando la indometacina (2 mg/kg) como control [20]. Mientras que, el extracto acuoso de raíces de *S. asperulus* DC, demostró esta actividad utilizando el modelo *in vitro* de macrófagos de ratón estimulado con lipopolisácarido (LPS) [21]. Asimismo, el extracto clorofórmico de hojas de *S. salignus* Kunth, también manifiesta poseer dicho efecto utilizando los métodos de edema inducido en la oreja de ratón y edema inducido por carragenina [22].

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Radical libre

Es una especie química capaz de una existencia independiente, que contiene uno o más electrones desapareados. Un electrón desapareado es aquel que ocupa un orbital atómico o molecular por sí mismo y que generalmente le da un considerable grado de reactividad. Pueden ser átomos, moléculas o iones altamente reactivos con otras moléculas y con frecuencia derivados del oxígeno, nitrógeno y azufre. Los derivados del oxígeno son considerados como el grupo más importante a nivel de los sistemas vivos y cuando se encuentran en altas concentraciones producen daño a nivel de la estructura de la célula, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas [23].

2.3.2. Antioxidantes

Son moléculas que neutralizan a los radicales libres, aceptando o donando electrones para eliminar la condición desapareada del radical; asimismo, actúan inhibiendo las reacciones enzimáticas involucradas en la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) o fortaleciendo enzimas antioxidantes, tales como, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa. Pueden ser endógenos o exógenos. Los endógenos a su vez pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Entre los enzimáticos tenemos al glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, mientras que, entre los no enzimáticos están el ácido urico, ácido lipoico, bilirrubina y glutatión. Mientras que los exógenos son carotenoides, las vitaminas A, E y C; y flavonoides u otros compuestos [24]. Por lo que, los antioxidantes pueden destruir a los radicales libres directamente y transformarlos en compuestos menos reactivos.

2.3.3. Métodos analíticos antioxidantes por secuestramiento de radicales libres

Son métodos utilizados para evaluar la actividad antioxidante mediante "el secuestro del radical libre". Entre los métodos están del ABTS (2,2´ - azino – bis (ácido 3 – etil benzotiazolina – 6 – sulfónico) y del DPPH; métodos espectrofotométricos populares utilizados para determinar la capacidad antioxidante de diversos productos como alimentos, bebidas y extractos naturales, siendo muy utilizados por ser procedimientos rápidos, reproducibles, sensitivos y simples [25,26].

2.3.4. Mecanismos de reacción de los ensayos con antioxidantes

Los antioxidantes actúan por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT por sus siglas en inglés) y transferencia de un electrón simple (SET, también por sus siglas en inglés). Las reacciones HAT son rápidas desde el punto de vista cinético en comparación con las SET, que requieren mayor tiempo y su actividad antioxidante se basa en disminuir el porcentaje del producto final, en lugar de cálculos cinéticos [25,26]. Entre las reacciones HAT se mencionan los ensayos de ABTS y DPPH; mientras que, para SET, tenemos al poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) [25].

2.3.5. Compuestos fenólicos

Se caracterizan por ser metabolitos secundarios aromáticos que poseen uno o más grupos fenólicos libres. El rango de compuestos va desde el más simple como el ácido salicílico hasta más complejos como suberina y lignina. Se clasifican de manera general según bloques de construcción y número de carbonos (**Tabla 1**) [27]. Las principales clases son ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, antocianinas y taninos, hallados en las plantas

superiores, con frecuencia a elevados niveles, mientras que, por razones quimiotaxonómicas, tienen distribución restringida estilbenos, cumarinas, y furanocumarinas [27]. En la naturaleza, ecológicamente representan alrededor del 40% del carbono orgánico que circula en la biosfera. La mayor parte del carbono fotoasimilado está en la forma de lignina, suberina y otros polímeros, llamados "compuestos fenólicos estructurales", quienes desempeñan el rol fundamental de soporte mecánico, transporte vascular y refuerzo estructural de los tejidos vegetales de larga vida. Mientras que los ácidos hidroxicinámicos, flavonoides y taninos son llamados "compuestos fenólicos no estructurales"[1] .

2.3.5.1. Rol biológico de los compuestos fenólicos

En términos ecológicos favorecen la interacción entre plantas y animales; cumpliendo funciones fisiológicas asociadas con la aclimatación al estrés ambiental. Actúan como mensajeros químicos que regulan la interacción entre plantas y microorganismos con fines nutricionales: y como agentes alelopáticos influenciando la competencia entre especies vegetales por el espacio vital. A largo plazo participan en la descomposición de la materia orgánica y la retención de minerales en los suelos, afectando el nivel de interacción en los ecosistemas. Desde la perspectiva humana, los compuestos fenólicos dietarios actúan como antioxidantes, anticancerígenos y cardioprotectores [27,28].

2.3.5.2. Metabolismo fenilpropanoide inducido por el estrés

Los compuestos fenólicos son expresados constitutivamente en todas las plantas superiores. Con frecuencia, su metabolismo es inducido por el estrés ambiental, por lo tanto, su síntesis está asociado con múltiples funciones relacionadas con el estrés que incluyen i) protección contra la radiación ultravioleta, ii) defensa frente a los herbívoros, iii) defensa contra los patógenos, iv) protección contra la fotoinhibición; y v) secuestramiento de ROS. Su producción está regulada por: intensidad de la luz solar, sequedad y salinidad de los suelos, bajas temperaturas, metales pesados, radiación ultravioleta, ozono, ataques de patógenos y daño en los tejidos. En consecuencia, la síntesis de compuestos fenólicos está asociado con la protección contra el estrés oxidativo bajo condiciones ambientales adversas para las especies vegetales [1,29].

2.3.5.3. Ácidos fenólicos

Compuestos fenólicos universalmente distribuidos en la naturaleza, principalmente derivados de ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico, donde sus principales diferencias se deben al tipo de hidroxilación y metoxilación de sus anillos aromáticos; el ácido

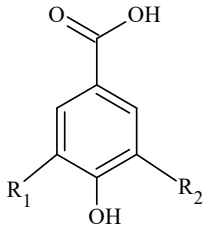
hidroxibenzoico y sus derivados se hallan principalmente en forma de heterósidos, mientras que, los derivados del ácido hidroxicinámico se encuentran formando ésteres simples con ácidos hidroxicarboxilicos o glucosa. Los ácidos hidroxibenzoicos más comunes son el ácido gálico (ácido 3, 4, 5 - trihidroxi-benzoico) y el ácido elágico, que es un dímero natural del ácido gálico (**Figura 1**). Mientras que, los ácidos hidroxicinámicos más comunes son el ácido cafeíco, ácido ferúlico, ácido p – cumárico y ácido sináptico (**Figura 2**) [27].

2.3.5.4. Flavonoides

Son el grupo de compuestos fenólicos más grande y se distribuyen ampliamente en las plantas, acumulándose en flores, frutos, hojas, raíces y tallos. Tienen funciones de coloración de los tejidos, defensa contra los patógenos, atracción de los polinizadores, etc., y hasta ahora se han identificado más de 8000 flavonoides. La estructura básica de un flavonoide es $C_6 – C_3 – C_6$, el cual consiste en, dos anillos bencénicos (A y B) unidos a través de un puente de tres carbonos que, usualmente es un heterociclo oxigenado (anillo C) (**Figura 3**). Dependiendo de la posición del enlace del anillo aromático al resto benzopirano (cromano), se dividen en tres clases: flavonoides (2 – fenilbenzopiranos), isoflavonoides (3 – benzopiranos) y los neoflavonoides (4 – benzopirano).

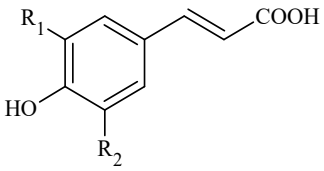
Tabla 1. Clasificación de compuestos fenólicos basado en número de carbonos y bloques de construcción presentes en las plantas [27].

Esqueleto básico	Clases	Ejemplos
C_6	Fenoles	Catecol, hidroquinona
$C_6 – C_1$	Ácidos fenólicos	Ácido gálico, ácido salicílico
$C_6 – C_2$	Acetofenona, derivados de la tirosina, ácidos fenilacéticos	Ácido p – hidroxifenilacético, tirosol, 3 – acetil – 6 - metoxibenzaldehido
$C_6 – C_3$	Ácido hidroxicinámico, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas	Ácido cafeíco, ácido ferúlico, miristicina, eugenol, umbeliferona, esculetina.
$C_6 – C_4$	Naftoquinonas	Juglona, Plumbagina
$C_6 – C_1 – C_6$	Xantonas	Mangiferina
$C_6 – C_2 – C_6$	Estilbenos, antraquinona	Resveratrol, emodina
$C_6 – C_3 – C_6$	Flavonoides, isoflavonoides, neoflavonoides	Quercetina, cianidina, genisteína
$(C_6 – C_3)_2$	Lignanos, neolignanos	Pinoresinol, eusiderina
$(C_6 – C_3 – C_6)_2$	Biflavonoides	Amentoflavona
$(C_6 – C_3)_n$; $(C_6)_n$; $(C_6 – C_3 – C_6)_n$	Ligninas, melaninas, flavolanos	Polímeros fenólicos



R_1	R_2	Acido fenólico
H	OH	ácido protocatequíco
OH	OH	ácido gálico

Figura 1. Ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico. [27]



R_1	R_2	Acido fenólico
OH	H	ácido cafeíco
OCH_3	OH	ácido ferúlico
--	--	Ácido p - cumárico
OCH_3	OCH_3	Ácido sináptico

Figura 2. Ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico.[27]

Su diversidad estructural se debe a la saturación del anillo C y en el patrón general de hidroxilación. Asimismo, los flavonoides se subdividen en varios subgrupos sobre la base de las características estructurales del anillo C. Estos subgrupos son: flavano, flavanona, flavona, dihidroflavonol, flavonol, flavan – 3 – ol, flavan – 4 – ol, flavan – 3,4 – diol, peltoginoide, dihidrochalcona, chalcona, aurona, antocianina e isoflavona (**Anexo 1**) [28]. Los flavonoides pueden presentarse como glicósidos y derivados metoxilados, así como, flavonoides libres [27,28]. Se caracterizan por tener absorbancia en la región del ultravioleta, en las cuales muestran dos picos de máxima absorbancia, en el rango de 240 – 285 nm (banda II) y entre 300 – 400 nm (banda I), respectivamente. La absorción en la banda II se origina en el sistema benzoilo del anillo A y la absorción en la banda I se origina en el sistema cinamoilo del anillo B [30] (**Figura 3**).

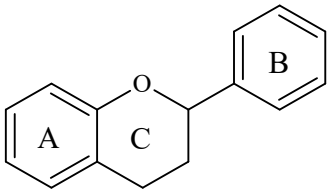


Figura 3. Estructura básica del núcleo flavonoide [27]

2.3.6. Compuestos fenólicos y su propiedad antioxidante

Se debe a su potencial redox. Actúan como sustancias químicas reductoras, donadoras de hidrógeno, queladoras de metales y secuestran al oxígeno singulete [1,27]. Por lo que, se requiere ciertas condiciones estructurales para que cumplan el rol de antioxidantes.

2.3.7. Propiedades biológicas de los flavonoides

2.3.7.1. Antioxidantes

Se le considera como un antioxidante no – enzimático. *In vitro* han demostrado que suprimen la formación de ROS, protegiendo las defensas antioxidantes. Esto se debe a la existencia de grupos hidroxilos adyacentes en el anillo B, doble enlace α, β conjugado en posición 2, 3 con el grupo ceto en posición 4 en el anillo C, las cuales, son condiciones esenciales para su actividad antioxidante. Se ha demostrado que la ortohidroxilación en el anillo B secuestra dos radicales libres, siendo el principal responsable de su actividad antioxidante [31].

2.3.7.2. Otras propiedades

Mejora la memoria y concentración, aumenta la efectividad de la vitamina C, regula al óxido nítrico, previene la coagulación, inhibe la oxidación del LDL – colesterol, reduce la presión sanguínea, mejora el comportamiento sexual masculino, antiinflamatorio, fortalece el sistema inmunológico, previene el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, alivia la sensación de fatiga crónica y retarda el envejecimiento [31,32].

2.3.8. Compuestos fenólicos en el género *Senecio*

Se han descrito presencia de fenoles, ácidos fenólicos que contienen núcleos del ácido cinámico, ácido benzoico y del ácido fenilacético; también la presencia de semiquinoles. Asimismo, flavonoides, que pueden ser flavonoles, flavanonas, flavonas, flavanoles y chalconas; y cumarinas (**Tablas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14**).

Tabla 2. Fenoles en el género *Senecio*.

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Hidroquinona	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[33,34]
		S. cannabifolius var. integrifolius (Koidz.) Kitam.	Partes aéreas	[35]
2	Pirogalol	*S. glaucus* L. supsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
3	Catecol	*S. glaucus* L. supsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
4	Tirosol (4 – (2 – hidroxietil) – fenol)	*S. biafrae* (Oliv. & Hiern) J. Moore	Parte aéreas	[37]
5	Hidroxi - tirosol	*S. biafrae* (Oliv. & Hiern) J. Moore	Parte aéreas	[37]
6	Fenol	*S. biafrae* (Oliv. & Hiern) J. Moore	Parte aéreas	[37]

Ref. = Referencia bibliográfica

Tabla 3. Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico en el género *Senecio*.

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Ácido p – metoxicinámico	*S. obtusatus* Wall ex DC.	Hojas y raíces desecadas	[38]
2	Ferulaldehido	*S. obtusatus* Wall ex DC.	Hojas y raíces desecadas	[38]
3	Ácido cinámico	*S. inops* subsp. *karamanicus* Hamzaoglu & Budak	Partes aéreas	[16]
		S. olympicus Boiss.	Partes aéreas	[16]
		S. viscosus L.	Partes aéreas	[16]
		S. glaucus subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
4	Ácido clorogénico	*S. scandens* Buch.-Ham	Partes aéreas	[9,33,39,40]
		S. cilicius Boiss	Partes aéreas	[16]
		S. inops subsp. *karamanicus* Hamzaoglu & Budak	Partes aéreas	[16]
		S. mollis Willd.	Partes aéreas	[16]
		S. olympicus Boiss.	Partes aéreas	[16]
		S. othonnae M. Bieb.	Partes aéreas	[16]
		S. salsuginea H. Duman & Vural	Partes aéreas	[16]
		S tauricolus VA Mattews	Partes aéreas	[16]
		S. viscosus L.	Partes aéreas	[16]
		S. clivicolus Wedd.	Partes aéreas	[3]
		S. glaucus subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
		S. abyssinicus Sch. Bip. ex A. Rich.	Hojas	[41]
5	Éster Metílico del ácido clorogénico	*S. samnitum* Huet.	Partes aéreas	[42]
		S. vulgaris L.	Partes aéreas	[40]
		S. clivicolus Wedd	Partes aéreas	[3]
6	Derivado hexósido del éster métilico del ácido clorogénico	*S. clivicolus* Wedd.	Partes aéreas	[3]
7	Ácido caféico	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9,33,39,40]
		S. glaucus subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
		S. abyssinicus Sch. Bip. ex A. Rich.	Hojas	[41]
		S. biafrae (Oliv. & Hiern) J. Moore	Partes aéreas	[37]
8	Éster métilico del ácido cafeíco	*S. procumbens* Kunth	Partes aéreas	[43]
9	2´- *O* – cafeoil – D – glucosa	*S. scandens* Buch.- Ham	Partes aéreas	[9]
10	2´- *O* – cumaroil – D – glucosa	*S. scandens* Buch.- Ham	Partes aéreas	[9]
11	1,4 – dicafeoil – quínico	*S. brasiliensis* (Spreng) Less.	Flores	[33]
12	3,4 – dicafeoil – quínico	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[19]
		S. brasiliensis (Spreng) Less.	Flores	[44]
		S. clivicolus Wedd.	Partes aéreas	[28]
13	3,5 – dicafeoil – quínico	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[25]
			Flores	[33]

		S. brasiliensis (Spreng) Less.	Partes aéreas	[28]
		S. clivicolus Wedd.		
14	4,5 – dicafeoil – quínico	*S. brasiliensis* (Spreng) Less.	Flores	[33]
15	Ácido dicafeoil – quínico	*S. vulgaris* L.	Partes aéreas	[26]
16	Derivado del ácido dicafeoil – quínico	*S. clivicolus* Wedd.	Partes aéreas	[3]
17	Dicafeoil – metoxi – oxaloil – quínico	*S. clivicolus* Wedd.	Partes aéreas	[3]
18	Ácido cumárico (ácido *p* – hidroxi – cinámico)	*S. scandens* Buch.-Ham.	Partes aéreas	[9,33,40]
		S. vulgaris L.	Partes aéreas	[40]
		S. cilicius Boiss	Partes aéreas	[16]
		S. inops subsp. *karamanicus* Hamzaoglu & Budak	Partes aéreas	[16]
		S. mollis Willd.	Partes aéreas	[16]
		S. olympicus Boiss.	Partes aéreas	[16]
		S. othonnae M. Bieb.	Partes aéreas	[16]
		S. salsuginea H. Duman & Vural	Partes aéreas	[16]
		S. sandrasicus P.H. Davis	Partes aéreas	[16]
		S. tauricolus Mattews		
		S. viscosus L.	Partes aéreas	[16]
		S. glaucus subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Partes aéreas	[16]
			Raíces	[36]
		S. biafrae (Oliv. & Hiern) J. Moore	Partes aéreas	[37]
19	Derivado del ácido cumárico (ácido *p* – hidroxicinámico)	*S. scandens* Buch.- Ham	Partes aéreas	[33,40]
20	Ácido cumaroil – quínico	*S. scandens* Buch.- Ham	Partes aéreas	[33,40]
21	Ácido feruloil – quínico	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[33,40]
22	Ácido ferúlico	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[33]
		S. glaucus subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
23	Coniferina (derivado glucosilado del ácido ferúlico)	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[33]
24	Ácido 4 – cafeoil – 5 – feruloil – quínico	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[33]
25	Isómero del ácido feruloil – cafeoil – quínico	*S. clivicolus* Wedd.	Partes aéreas	[3]
26	Ácido cafeoil – feruloil - quínico	*S. scandens* Buch.- Ham	Partes aéreas	[33]
27	Ácido sinápico (ácido 3,5 – dimetoxi – 4 – hidroxi – cinámico)	*S. scandens* Buch.- Ham	Partes aéreas	[33]
28	Ácido iso – ferulíco	*S. glaucus* subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
29	Ácido *o* – cumárico	*S. glaucus* subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
		S. biafrae (Oliv. & Hiern) J. Moore	Partes aéreas	[37]

30	Ácido 3,4,5 – metoxi – cinámico	*S. glaucus* subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
31	Ácido rosmarínico	*S. glaucus* subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]

Tabla 4. Ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico en el género *Senecio*.

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Ácido *p* – hidroxi - benzoico	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9,33]
		S. glaucus L. Subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
		S. clivicolus Wedd.	Partes aéreas	[3]
2	Ácido protocatéquico (ácido 3,4 – dihidroxi – benzoico)	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9,33,40]
		S. vulgaris L.	Partes aéreas	[40]
3	Ácido gentísico (ácido 2,5 – dihidroxi – benzoico)	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9,33]
4	Ácido salicílico	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9,33,34]
		S. glaucus L. Subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
5	2,5 –dihidroxi – benzoato de etilo	*S. cannabifolius* var. *integrifolius* (Koidz.) Kitam.	Partes aéreas	[35]
6	Ácido 3,4 – dihidroxi – benzoico	*S. biafrae* (Oliv. & Hiern) J. Moore	Partes aéreas	[23]
7	Ácido siríngico (ácido 3,5 – dimetoxi – 4 – hidroxi – benzoico)	*S. glaucus* L. supsp. *coronopifolius* (Maire) Alexander	Raíces	[36]
		S. biafrae (Oliv. & Hiern) J. Moore	Partes aéreas	[37]
8	Ácido gálico	*S. glaucus* L. supsp. *coronopifolius* (Maire) Alexander	Raíces	[36]
		S. glaucus L.	Partes aéreas	[4]
		S. abyssinicus Sch. Bip. ex A. Rich.	Hojas	[41]
		S. biafrae (Oliv. & Hiern) J. Moore	Partes aéreas	[37]
9	Ácido vaníllico	*S. glaucus* L. supsp. *coronopifolius* (Maire) Alexander	Raíces	[36]
		S. glaucus L	Partes aéreas	[4]
		S. biafrae (Oliv. & Hiern) J. Moore	Partes aéreas	[37]
10	Ácido 2 - vaníllico	*S. glaucus* L. supsp. *coronopifolius* (Maire) Alexander	Raíces	[36]
11	Ácido elágico	*S. glaucus* L. supsp. *coronopifolius* (Maire) Alexander	Raíces	[36]
		S. abyssinicus Sch. Bip. ex A. Rich.	Hojas	[41]

Tabla 5. Derivados del ácido fenilacético en el género *Senecio.*

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Ácido *p* – hidroxi - fenilacético	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9,33,40]
		S. vulgaris L.	Partes aéreas	[40]
2	*p* – hidroxi – fenilacetato de metilo	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9]
3	Ácido 2,5 – dihidroxi – fenilacético	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9,33]
4	2,5 – dihidroxi – fenilacetato de metilo	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9]
5	ácido 1 – hidroxi – 4 – oxo – 2,5 – ciclohexadieno – 1 – ácetico	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[33]
6	Derivado del ácido *p* – hidroxi - fenilacético	*S. vulgaris* L.	Partes aéreas	[40]

Tabla 6. Semiquinoles en el género *Senecio*.

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Jacaranona	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[33,40]
		S. othonnae M. Bieb	Partes aéreas	[45]
		S. wagneri Degen	Partes aéreas	[45]
		S. subalpinus WDJ Koch	Partes aéreas	[45]
		S. carphaticus Herbich	Partes aéreas	[45]
		S. obtusatus Wall. ex DC	Partes aéreas	[45]

Tabla 7. Flavonoles derivados de núcleo kaempferol en el género *Senecio*.

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Kaempferol	*S. scandens* Buch.- Ham	Partes aéreas	[9,33]
		S. kingii Hook	Partes aéreas	[46]
		S. glaucus L. supsp. *coronopifolius* (Maire) Alexander	Raíces	[36]
2	Kumatakenina (3,7 – dimetil – kaempferol)	*S. viscosissimus* Colla	Partes aéreas	[47]
		S. kingii Hook	Partes aéreas	[46]
3	Astragalina (Kaempferol – 3 – O – glucósido)	*S. scandens* Buch.- Ham	Partes aéreas	[9]
4	Kaempferol – 3 – O – deoxihexósido	*S. scandens* Buch.- Ham	Partes aéreas	[33,40]
		S. vulgaris L.	Partes aéreas	[40]
5	Kaempferol – 3 – O – dideoxihexósido	*S. vulgaris* L.	Partes aéreas	[40]
6	Kaempferol – 3 – O – hexósido – 7 – O – deoxihexósido	*S. scandens* Buch.- Ham	Partes aéreas	[33,40]
7	3,7 ,4´- trimetoxi – kaempferol	*S. kingii* Hook	Partes aéreas	[46]
8	Isokaempferida (3 – O – metil – kaempferol)	*S. kingii* Hook	Partes aéreas	[46]
		S. viscosissimus Colla	Partes aéreas	[47]
9	Kaempferol – 3 – O – α – L – rhamnosido)	*Senecio obtusatus* Wall ex DC.	Partes aéreas	[38]

Tabla 8. Flavonoles derivados de núcleo isorhamnetina en el género *Senecio*.

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Isorhamnetina	*S. scandens* Buch.-Ham.	Partes aéreas	[33,48]
2	Cacticina (Isorhamnetin – β – galactósido)	*S. procumbens* Kunth.	Partes aéreas	[43]
3	Paquipodol (3,7 – dimetil – isorhamnetina)	*S. viscosissimus* Colla	Partes aéreas	[47]
4	Isorhamnetin – 3 – O – β – D – glucósido	*S. vulgaris* L.	Partes aéreas	[6]
		S. acaulis (L.f.) Sch. Bip	Partes aéreas	[7]
5	3 – metil - isorhamnetina	*S. viscosissimus* Colla	Partes aéreas	[47]
6	Isorhamnetin - glucósido	*S. clivicolus* Wedd.	Partes aéreas	[3]
7	Isorhamnetin – acetil – glucósido	*S. clivicolus* Wedd.	Partes aéreas	[3]

Tabla 9. Flavonoles de núcleo quercetina y sus derivados en el género *Senecio*

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Quercetina	*S. obtusatus Wall* ex DC	Partes aéreas	[16]
		S. cilicius Boiss	Partes aéreas	[16]
		S. inops subsp. *karamanicus* Hamzaoglu & Budak	Partes aéreas	[16]
		S. mollis Willd.	Partes aéreas	[16]
		S. olympicus Boiss.	Partes aéreas	[16]
		S. othonnae M. Bieb.	Partes aéreas	[16]
		S. salsuginea H. Duman & Vural	Partes aéreas	[16]
		S. scandens Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9,33,48]
		S. cannabifolius var. *integrifolius* (Koidz.) Kitam.	Partes aéreas	[21]
		S. glaucus subsp. *coronopifolius*	Raíces	[22]
		S. biafrae (Oliv. & Hiern) J. Moore	Partes aéreas	[23]
2	Quercitrina (Quercetin 3 – *O* –α – L – rhamnosido)	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[19,25]
		S. glaucus subsp. *coronopifolius*	Raíces	[36]
		S. acaulis (L.f.) Sch. Bip.	Partes aéreas	[7]
3	Quercetin – 3 – O - glucósido	*S. clivicolus* Wedd	Partes aéreas	[3]
4	Quercetin – 3 – O – hexosil - deoxihexósido	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[33,40]
5	Quercetin – 3 – O – glucosil – 7 – O - rutinósido	*S. aegyptius* var. *discoides* Boiss.	Partes aéreas	[8]
6	Rutina (quercetin – 3 – rutinósido)	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9,33]
		S. aegyptius var. *discoides* Boiss.	Partes aéreas	[8]
		S. cilicius Boiss	Partes aéreas	[16]
		S. inops subsp. *karamanicus* Hamzaoglu & Budak	Partes aéreas	[16]
		S. othonnae M. Bieb.	Partes aéreas	[16]
		S. salsuginea H. Duman & Vural	Partes aéreas	[16]
		S. clivicolus Wedd.	Partes aéreas	[3]
		S. glaucus subsp. *coronopifolius*	Raíces	[36]
		S. biafrae (Oliv. & Hiern) J. Moore	Partes aéreas	[37]

7	Hiperósido (quercetin – 3 – O – galactósido)	*S. cannabifolius* var. *integrifolius* (Koidz.) Kitam	Partes aéreas	[35]
		S. scandens Buch.- Ham.	Partes aéreas	[9,33,39,40]
		S. obtusatus Wall ex DC	Partes aéreas	[38]
8	3,7,4´- trimetoxi - quercetina	*S. kingii* Hook	Partes aéreas	[46]
9	Paquipodol (3,7,3´- trimetoxi – quercetina)	*S. viscosissimus* Colla.	Partes aéreas	[47]
		S. viscosus L.	Partes aéreas	[49]
10	Isoquercitrina (quercetin – 3 – *O* – β – D – glucopiranósido)	*S. scandens* Buch.- Ham.	Partes aéreas	[33,39,40]
		S. vulgaris L.	Partes aéreas	[40]
		S. acaulis (L.f.) Sch. Bip.	Partes aéreas	[7]

Tabla 10. Flavanonas en el género *Senecio*

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Eriodictol	*S. inops* subsp. *karamanicus* Hamzaoglu & Budak	Partes aéreas	[16]
		S. othonnae M. Bieb.		[16]
		S. salsuginea H. Duman & Vural		[16]
		S. viscosus L.		[16]
2	Naringenina	*S. mollis* Willd.	Partes aéreas	[16]
		S. tauricola V.A. Mattews	Partes aéreas	[16]
		S. viscosus L.	Partes aéreas	[16]
		S. glaucus subsp. *coronopifolius* Alexander	Raíces	[36]
3	Naringina	*Senecio glaucus* subsp. *coronopifolius* Alexander	Raíces	[36]
4	Hesperidina	*Senecio glaucus* subsp. *coronopifolius* Alexander	Raíces	[36]
5	Hesperitina	*Senecio glaucus* subsp. *coronopifolius* Alexander	Raíces	[36]

Tabla 11. Flavonas en el género *Senecio*

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Linarina	*Senecio scandens* Buch.-Ham.	Partes aéreas	[9]
2	Luteolina	*S. scandens* Buch.-Ham.	Partes aéreas	[33]
		S. glaucus subsp. *coronopifolius* Alexander	Raíces	[36]
3	Apigenina	*S. glaucus* subsp. *coronopifolius* Alexander	Raíces	[36]
		S. biafrae (Oliv. & Hiern) J. Moore	Partes aéreas	[37]
4	Cartamidina	*S. kingii* Hook	Partes aéreas	[46]
5	Velutina	*S. viscosus* L	Partes aéreas	[49]

Tabla 12. Flavanoles en el género *Senecio*

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Catequina	*S. glaucus* subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]
		S. biafrae (Oliv. & Hiern) J. Moore	Partes aéreas	[37]
2	Epicatequina	*S. glaucus* subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander	Raíces	[36]

Tabla 13. Chalconas en el género *Senecio*

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Okanin 4 – metil – éter – 3´- *O* – β – D – (6" – acetil) glucopiranósido	*S. pseudotites* Griseb	No menciona	[34]
2	Okanin 4 – metil – éter – 3´- *O* – β – D –glucopiranósido	*S. pseudotites* Griseb	No menciona	[34]
3	Okanin 4´- *O* – β – D – (3", 4", 6" – triacetil) glucopiranósido	*S. pseudotites* Griseb	No menciona	[34]

Tabla 14. Cumarinas en el género *Senecio*

N°	Compuesto	Especie	Parte de la planta	Ref.
1	Isoescopoletina	*S. humillimus* Sch. Bip.	Partes aéreas	[34,50]
2	3,7 – dihidroxi -5,6 – dimetoxi – cumarin – 3 – O – β – D – glucósido	*S. vulgaris* L.	Partes aéreas	[6]
3	Escopoletina	*S. nutans* Sch. Bip.	Partes aéreas	[51]

2.3.9. Toxicidad de compuestos fenólicos

Podrían actuar como prooxidantes, actividad estrógenica, efecto citotóxico, inducción de apoptosis celular e interacción con fármacos [32].

2.3.10. Género *Senecio* en el Perú

Forma parte de la familia Asteraceae y está ampliamente difundida en el Perú. Beltrán y Roque [52], precisaron que el Perú alberga 177 especies, tienen distribución restringida, son endémicas y se adaptan por encima de los 4000 msnm.

2.3.11. *Senecio rufescens* D.C.

2.2.11.1. Clasificación sistemática

Según el sistema de clasificación de Cronquist (1988):

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub Clase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: Senecio

Especie: *Senecio rufescens* D.C.

Nombre vulgar: "inca taya"

2.2.11.2. Distribución

En América del Sur, desde el centro del Perú hasta el norte de Argentina. Perú las reporta en las regiones Ancash, Arequipa, Lima y Puno entre 3500 a 4500 msnm; y en la región Ayacucho a 4700 msnm [52].

2.2.11.3. Descripción botánica

Subarbusto que crece en suelos crioturbados, entre rocas asociadas a otras especies, posición vertical desde 40 a 70 cm. de altura, ligeramente caducifolio hacia la base, tallo profusamente cubierto por hojas hasta el ápice; las hojas son sésiles, organizadas en fascículos laterales, lineal lanceolada, borde entero, márgenes notablemente resolutos, profusamente glandulosa – pubescente en ambos lados, de 1 a 2 cm. de largo por 1,5 a 3 mm. de ancho; su inflorescencia se presenta en cabezuelas discoideas de color amarillo, solitarias, en el extremo de las ramas laterales; involucro en forma de campana de 8 – 10 mm. de largo por 10 mm. de diámetro; brácteas en involucro lineal – lanceolada, glandulosas y pubescentes en el dorso; flores isomorfas, hermafroditas; corola tubulosa, amarillenta – parduzca, pentalobulada y el fruto es un aquenio cilíndrico[2,53].

2.2.11.4. Composición química

No existen reportes en la literatura científica respecto a su composición química.

2.2.11.5. Usos populares

Según versión obtenida por el autor, las hojas se utilizan en infusión para problemas digestivos como antiespasmódico y mal de altura. Sin embargo, su utilidad no se reporta en la literatura científica.

2.3. Glosario o definición de términos

2.3.1. ABTS

Es un radical libre utilizado para evaluar la actividad secuestradora por antioxidantes. La decoloración de una solución verde azulada del catión $ABTS^{\bullet+}$ preformada por la reacción del ABTS y persulfato de potasio, se determina espectrofotométricamente a 734 nm [25,26].

2.3.2. DPPH

Es un radical libre utilizado para evaluar la actividad secuestradora por antioxidantes, se fundamenta por el cambio de absorción del DPPH cuando se reduce y que es medido espectrofotométricamente a 517 nm [25,26].

2.3.3. TPTZ

Acrónimo en inglés que describe a la 2,4,6 – tri (2 – piridil) – *s* – triazina[25].

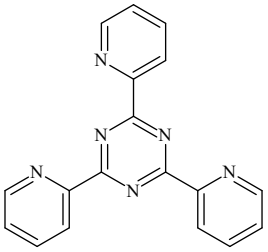


Figura 4. TPTZ

2.3.4. FRAP

Acrónimo inglés que significa poder antioxidante reductor del hierro (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power), en el cual, inicialmente se forma un complejo entre el $FeCl_3$ y dos unidades de TPTZ; y ante la presencia de un oxidante se produce una reacción de transferencia de electrones desde el complejo TPTZ - Fe^{+3}, reduciéndose a TPTZ - Fe^{+2}, observándose una intensificación del color, el cual se puede cuantificar espectrofotométricamente a 593 nm [25,26].

2.3.5. Trolox

Es el ácido 6 – hidroxi – 2,5,7,8 – tetrametil – croman -2 – carboxílico, derivado hidrosoluble de la vitamina E, utilizado como estándar para determinar la actividad antioxidante y se expresan como micromoles equivalentes de Trolox/gramo de muestra (µmol ET/g de muestra) [25].

2.3.6. Correlación lineal

Procedimiento comúnmente utilizado para caracterizar cuantitativamente las relaciones entre las variables dependiente e independiente. Mientras que, "un coeficiente de correlación mide el grado de relación o asociación existente generalmente entre dos variables aleatorias"**.** El coeficiente de correlación de Pearson, "tiene como objetivo medir la fuerza o grado de asociación entre dos variables aleatorias cuantitativas que poseen una distribución normal" [54].

2.3.7. Estudios *in vitro*

Buscan reproducir o al menos aproximarse a las condiciones naturales aplicadas a los experimentos *in vivo* y se aplican para el estudio de mecanismos propios de los fenómenos observados [55].

2.3.8. Capacidad antioxidante

El término "capacidad antioxidante" se refiere a los resultados obtenidos por diferentes ensayos: "capacidad secuestradora del radical peroxil", "capacidad secuestradora del radical superóxido", "capacidad reductora del ion férrico" y similares. Mientras que la "actividad antioxidante", refleja el resultado de un ensayo individual en el contexto de las

condiciones de reacción: presión, temperatura, medio de reacción, correactantes y puntos de referencia [25,26].

2.3.9. Cromatografía en capa fina y cromatografía en columna

La primera es una técnica rápida, sensible y económica utilizada para establecer el número de compuestos en una mezcla, verificar la identidad y pureza de un compuesto, monitorear el progreso de una reacción, determinar el sistema de solventes para una separación preparativa y evaluar las fracciones obtenidas por cromatografía en columna [56]. Mientras que, la segunda se utiliza para purificar compuestos químicos individuales de una mezcla de compuestos, con frecuencia utilizada para aplicaciones preparativas en escalas desde microgramos hasta gramos, en el cual, utiliza una columna de vidrio típicamente empacada con silicagel de 70 – 230 µm de tamaño de partícula y en el que se aplican mezclas de solventes de diferentes polaridad que arrastran las sustancias que se desea separar y cuyo desempeño es monitoreado por cromatografía en capa fina [57].

2.3.10. Cromatografía liquida de ultra alta performance (UHPLC)

Es una cromatografía líquida que se diferencia de la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) convencional, porque el material de empaque de la columna tiene un menor tamaño de partícula (< 2µm). Emplea temperaturas más altas para reducir la viscosidad y frecuencia de flujo de la fase móvil. El tiempo de retención es la medición del tiempo que toma un analito para pasar a través de la columna cromatográfica, desde el momento de la inyección hasta su detección y es utilizado como un parámetro para su identificación. Los cromatogramas de la UHPLC tienen una mejor resolución y separación comparadas con las obtenidas por HPLC, además los análisis son más sensibles, reducen el consumo de solventes y son más rápidas [58]. Se ha demostrado que la eficiencia de un proceso cromatográfico es proporcional a una reducción del tamaño de partícula.

2.3.11. Cromatografía líquida de ultra alta performance acoplado a espectroscopia de masas (UHPLC – MS/MS)

Es una técnica que combina métodos cromatográficos y espectrales para aprovechar la ventaja de ambos. Con el UHPLC se optimiza la detección y se reduce la dispersión del analito, produciendo una mejor eficiencia de la fuente de ionización. Para detectar y determinar la cantidad del analito, la espectrometría de masas (MS) es ampliamente utilizada por su selectividad. Utiliza técnicas de ionización, entre las cuales, la ionización por electrospray (ESI) y la ionización química atmosférica (APCI) son las más utilizadas;

y el analizador de masas cuádrupolo es preferido. Para las fases móviles se utilizan agua, acetonitrilo o metanol, ácido acético, ácido fórmico 0,1%, solución de hidróxido de amonio/amoníaco y acetato de amonio [59]. La MS es una poderosa técnica analítica que permite identificar y cuantificar un analito utilizando la relación carga masa (*m/z*) de sus iones generados a partir de una muestra, los iones generados corresponden a la molécula original, sus fragmentos u otras especies formadas durante el proceso de ionización, por tanto, facilita la identificación directa de las moléculas basada en su *m/z*, así como, de su patrón de fragmentación [60].

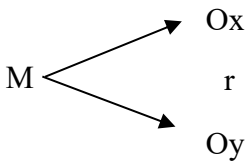
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

Se realizó una investigación de tipo cuantitativo, porque los datos fueron de naturaleza objetiva, recolectados mediante ensayos de laboratorio; todo ello enmarcado en el paradigma positivista de la investigación científica y el nivel de investigación fue de tipo correlacional. La parte descriptiva fue la identificación de los compuestos fenólicos por ser una variable cualitativa nominal; mientras que, la determinación del contenido de fenoles totales, flavonoides, flavonoles y los ensayos de capacidad antioxidante fueron variables cuantitativas de intervalo, asimismo, la parte experimental fue la determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* y el bioensayo de *Artema salina*; en las cuales, se manipuló la variable independiente que fue la concentración de los extractos y se utilizaron controles[61].

3.2. Diseño metodológico

Se utilizó un diseño correlacional, cuyo diagrama es el siguiente [61].



3.3. Unidad de análisis

Extracto hidroalcohólico. Para el ensayo de actividad antiinflamatoria *in vitro* se utilizó una suspensión de glóbulos rojos al 10% y en el ensayo de *Artemia salina,* se utilizaron larvas (nauplios) de huevos eclosionados después de 24 horas.

3.4. Población de estudio

S. rufescens D.C., que crece en el distrito de Paras (provincia de Cangallo, región Ayacucho) a 4756 msnm[53]. La localización exacta se determinó utilizando GPS (Global Position System) marca GARMIN y software libre Google Earth Pro. (**Anexo 2**)

3.5. Muestra

Cinco kg de hojas frescas.

3.6. Criterio de selección

Se utilizó un muestreo no probabilístico por conveniencia [61], seleccionando las hojas que se encontraban en buen estado y madurez fisiológica.

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1. Técnicas e instrumentos

Se utilizó la técnica de observación no participante y como instrumento una ficha para el registro de datos [61].

3.7.2. Recolección de muestra

Fueron recolectadas en las primeras horas de la mañana, para luego trasladarse al Laboratorio de Farmacognosia (Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga). Una muestra fue herborizada para su clasificación botánica en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (**Anexos 3 y 4**). La muestra para la clasificación botánica se colectó en el mes de agosto de 2018 y para la ejecución de la presente investigación fue colectada en el mes de abril de 2019.

3.7.3. Desecación y preparación de muestra

Las hojas fueron separadas del tallo y colocadas sobre papel kraft para su desecación a la sombra (**Anexo 5**). Una vez desecadas se pulverizaron en un molino de cuchillas, hasta obtener un polvo, el cual, fue almacenado en un envase de vidrio de color ámbar y conservadas en refrigeración hasta su utilización.

3.7.4. Obtención de los extractos

3.7.4.1. Extracto metanólico

Se pesó 100 g de hojas desecadas y se maceró con un litro de metanol. Se realizó una extracción dinámica [62], con la ayuda de un agitador magnético por un período de cuatro horas. Se filtró y el residuo fue sometido a un segundo proceso de extracción con un litro de metanol por el mismo período de tiempo, filtrándose al final. Se reunieron los filtrados y fueron concentrados en un rotavapor, hasta obtener un extracto seco (**Anexo 6**), el cual, fue conservado a 4°C hasta su uso.

3.7.4.2. Extracto hidroalcohólico

Con 400 g de muestra, se realizó una extracción dinámica con 4 litros de etanol al 80%, luego se siguió el mismo procedimiento descrito en **3.7.4.1.**

3.7.5. Screening fitoquímico

Se realizó con el extracto metanólico e hidroalcohólico, según lo descrito por Miranda [63], que consistió en realizar reacciones químicas de coloración y precipitación para la identificación de metabolitos secundarios (**Anexo 7**).

3.7.6. Fraccionamiento de los extractos

3.7.5.1. Extracto metanólico

Se realizó con una columna cromatográfica (1,5 cm de diámetro x 60 cm de altura), empacada con silicagel 60 (70 – 230 mesh Merck®) con *n* – hexano. Se pesó aproximadamente 5 g del extracto y empleando de forma sucesiva *n* – hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol cada uno 100 mL [3,7] (**Anexos 8 y 9**), se

obtuvieron las fracciones respectivas. Se eliminó el solvente en el rotavapor y los extractos obtenidos fueron conservados a 4 °C. Se calculó el rendimiento (g) y su porcentaje (%).

3.7.5.2. Extracto hidroalcohólico

Se siguió el mismo procedimiento para el extracto metanólico, pero como sistema de solventes se utilizó *n* – hexano, acetato de etilo y metanol, en mezclas de polaridad creciente (**Tabla 16**), obteniéndose 13 fracciones [64] (**Anexos 10 y 11**). En cada una de las fracciones se realizaron los ensayos de cloruro férrico para compuestos fenólicos, Shinoda para flavonoides y DPPH para antioxidantes.

Tabla 15. Mezclas de solventes empleados en la cromatografía de columna.

Fracción	*n* - hexano	Acetato de etilo	Metanol
1	50	0	0
2	45	5	0
3	40	10	0
4	25	25	0
5	10	40	0
6	5	45	0
7	0	50	0
8	0	45	5
9	0	40	10
10	0	25	25
11	0	10	40
12	0	5	45
13	0	0	50

3.7.7. Cromatografía en capa fina

Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto hidroalcohólico que resultaron positivas para los ensayos de cloruro férrico, Shinoda y DPPH, fueron evaluadas por cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios de aluminio de silicagel G con indicador fluorescente (Merck®) 20 x 20 y la mezcla de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100;11;11;22) como sistema de solventes; disolviéndose las muestras en metanol y sembrándose con la ayuda de un capilar. Los cromatogramas fueron revelados con luz ultravioleta a 254 nm y 366 nm [65] (**Anexo 12**).

Se delimitó las manchas observadas bajo la luz ultravioleta (**Anexo 13**) y con la ayuda de un bisturí, se raspó y se colocó en tubos de ensayo, disolviéndose con metanol y se realizó la lectura de su curva espectral en un espectrofotómetro UV – Vis, registrándose los picos característicos.

3.7.8. Identificación de los compuestos fenólicos por UHPLC – MS/MS

Las fracciones de la cromatografía en columna del extracto hidroalcohólico que resultaron positivas a los ensayos descritos anteriormente, fueron reunidas y sometidas a un análisis por UHPLC – MS/MS por ionización con electrospray (ESI), para el cual se utilizó un UHPLC Dionex Ultimate 3000 System (Thermo Scientific), con un volumen de inyección 3 µL, una columna Luna Omega C18 100 Å, Phenomenex (150 x 2,1 mm, 1,6 µm), temperatura de la columna 30 °C y flujo 0,3 mL/min y como eluentes una mezcla de los solventes A: H_2O (agua) 1% HCOOH (ácido fórmico) y B: ACN (acetonitrilo) 1% HCOOH. Se utilizó un espectrómetro de masas Q Exactive Plus (Thermo Scientific), con las siguientes condiciones: a) Parámetros del *scan Full MS*: rango de 120 – 1500 m/z; resolución: 35000; microscans: 1; AGC Target: 5 x 10^6; Máximo IT: 80 ms; b) Parámetros *MS2*: resolución: 17500; *AGC Target*: 5 x 10^6; Máximo IT: 100 ms; c) Parámetros de la fuente de ionización: fuente y modo de ionización: ESI (positivo y negativo), voltaje del spray: 3,5/2,5 kV; temperatura del capilar: 300 °C; gas transportador: N_2 (nitrógeno) (tasa de flujo del gas envolvente: 50; tasa de flujo del gas de barrido:1); temperatura de calentamiento del gas: 400 °C; *S – lens RF level*: 100; energía de colisión normalizada: 30, 40. Los parámetros evaluados fueron tiempo de retención, relación *m/z* y patrones de fragmentación.

3.7.9. Cuantificación de fenoles totales

Se preparó 1 mg/mL del extracto metanólico y del extracto hidroalcohólico. Se utilizó el método de Folin – Ciocalteu adaptado de Swain y Hillis [66]. El contenido se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto (mg GAE/g de extracto) (**Anexos 14 y 15**). En el caso del extracto hidroalcohólico se prepararon diluciones para el análisis correlacional.

3.7.10. Cuantificación de flavonoides

Se utilizó los extractos a la misma concentración que **3.7.9.** Se desarrolló según el protocolo descrito por Zhishen et al. [67], con algunas modificaciones. El contenido se expresó como mg equivalentes de quercetina/g de extracto (mg QE/g de extracto)

(**Anexos 16 y 17**). Para el análisis correlacional se realizaron las diluciones correspondientes.

3.7.11. Cuantificación de flavonoles

Se utilizó los extractos a la misma concentración que **3.7.9.** Se aplicó el procedimiento descrito por Miliauskas et al. [68] (**Anexos 18 y 19**). El contenido se representó como mg equivalentes de quercetina/g de extracto (mg QE/g de extracto). Para el análisis correlacional se realizaron las diluciones correspondientes.

3.7.12. Ensayos de la capacidad antioxidante *in vitro*

3.7.12.1. Actividad antioxidante por método de secuestramiento del radical libre DPPH

Se utilizó los extractos a la misma concentración que **3.7.9.** Se siguió el método de Brand – Williams et al., con algunas modificaciones de Thaipong et al. [66]. La actividad secuestradora expresada en porcentaje se determinó según la siguiente fórmula matemática:

$$\%\ \text{de actividad secuestradora del DPPH} = \left[\frac{A_{DPPH} - (A_{MP} - A_{BMP})}{A_{DPPH}}\right] X\ 100$$

En donde $A_{DPPH,}$ A_{MP} y A_{BMP} corresponden a las absorbancias del DPPH, muestra problema tratada con DPPH y del blanco de la muestra problema respectivamente. Los resultados se expresan como µmoles ET/g de extracto; y también, se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), el cual, representó la concentración de la muestra capaz de reducir al 50% la absorbancia del DPPH (**Anexos 20, 21 y 22**). Para el análisis correlacional se realizaron las diluciones correspondientes.

3.7.12.2.Actividad antioxidante por el método de secuestramiento del catión radical ABTS•+

Se utilizó los extractos a la misma concentración que **3.7.9.** Se utilizó el protocolo citado por Arnao et al., con algunas modificaciones de Thaipong et al.,[66]. Los resultados también se expresan en µmoles ET/g de extracto. La actividad secuestradora expresada en porcentaje se calculó adecuando la relación matemática de **3.7.12.1.**; y también, se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), que representa aquella concentración de muestra capaz de reducir al 50% la absorbancia del $ABTS^{\bullet+}$ (**Anexos 23, 24 y 25**). Para el análisis correlacional se realizaron las diluciones correspondientes.

3.7.12.3. Actividad antioxidante por el método de reducción de hierro (FRAP)

Se utilizó los extractos a la misma concentración que **3.7.10.** Se aplicó el procedimiento descrito por Benzie y Strain modificada por Thaipong et al., [66]. Los resultados también se expresan en µmoles ET/g de extracto (**Anexos 26 y 27**). Para el análisis correlacional se realizaron las diluciones correspondientes.

3.7.13. Actividad antiinflamatoria *in vitro* por el método de estabilización de membrana[69]

Fundamento: la actividad antiinflamatoria puede ser estudiada *in vitro* utilizando la membrana de los glóbulos rojos como análogo de la membrana lisosomal y podría ser extrapolado a la estabilización de la membrana lisosomal. Su estabilización (lisis de la membrana inducida por hipotonicidad) por fármacos estándar o muestras sometidas a ensayo se puede considerar como una medida de la actividad antinflamatoria *in vitro*.

Se utilizaron 1, 2, 3, 4 y 5 mg/mL, respectivamente, de concentraciones de compuestos fenólicos (**Anexos 28, 29 y 30**). Se utilizaron diclofenaco (diclofenaco sódico 25 mg/mL ampolla de Laboratorio GENFAR) y dexametasona (dexametasona sódica 4 mg/mL, ampolla de Laboratorio GENFAR), como fármacos de referencias.

Se utilizó la siguiente relación matemática para calcular el porcentaje (%) de inhibición:

$$\%\ \text{de inhibición} = \frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control}}\ \text{x}\ 100$$

Asimismo, se determinó la relación entre concentración de compuestos fenólicos y porcentaje de inhibición, utilizando la ecuación de regresión para calcular el coeficiente de correlación.

3.7.14. Determinación de bioactividad de *Artemia salina*

Se basa en la determinación de la mortalidad *in vivo* de larvas de *Artemia salina* en 24 horas a concentraciones iguales o menores de 1000 µg/mL [70,71]. Se evaluaron extractos conteniendo compuestos fenólicos a concentraciones de10, 100 y 1000 µg/mL. En un vial conteniendo 5 mL de solución salina de mar y 10 larvas de *Artemia salina*, se adicionaron los extractos, utilizando tres viales por concentración y una gota de suspensión de levadura de pan como alimento para las larvas; y se utilizó como blanco agua de mar. Se realizó el recuento del número de larvas muertas después de 24 h, considerándose para tal fin, la falta total de movimientos en el período de 10 segundos observados con el estereoscopio (**Anexo 31**). La CL_{50} con un nivel de confianza de 95% se calculó utilizando el método estadístico Probit, el cual, se le define como la concentración de una sustancia tóxica letal que produce la muerte del 50% de los organismos de la prueba.

Los niveles de toxicidad se categorizan de la siguiente manera [[71]:

a) Extremadamente tóxico ($CL_{50} < 10$ µg/mL)

b) Muy tóxico (10 µg/mL < $CL_{50} < 100$ µg/mL)

c) Moderamente tóxico (100 µg/mL < $CL_{50} < 1000$ µg/mL)

d) No tóxico ($CL_{50} > 1000$ µg/mL)

3.7. Procesamiento de datos

Se determinó las medias ± desviación estándar de tres repeticiones de los ensayos realizados. El análisis de varianza (ANOVA) y su correspondiente prueba de comparaciones múltiples de Schefeé, se utilizaron para estimar las diferencias entre los tratamientos y los controles en el ensayo de actividad antinflamatoria *in vitro* ($p < 0,05$). Se calcularon los coeficientes de correlación (r) con nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0,05$) entre las variables en estudio. Todos los cálculos se realizaron utilizando los programas Excel y SPSS en entorno Windows. Para calcular la CL_{50} en el ensayo de *Artemia salina* se aplicó el método Probits. Los resultados son presentados como figuras y tablas.

3.8. Consideraciones éticas

Para el ensayo de actividad antinflamatoria *in vitro* se utilizó 5 mL de sangre obtenida por punción venosa del brazo izquierdo de cuatro jóvenes voluntarios sanos quienes declararon no haber consumido antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y voluntariamente aceptaron donar sangre después de conocer el objetivo del estudio y previamente haber leído y firmado el consentimiento informado respectivo (**Anexo 32**).

Tabla 16. Metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico y de sus fracciones.

Ensayo	Extracto metanólico	Fracción			
		n - hexano	diclorometano	acetato de etilo	metanólica
Fenoles	+	-	+	+	+
Flavonoides	+	-	+	+	+
Catequinas	+	-	+	+	+
Aminoácidos libres y/o grupos amino	+	-	-	-	+
Alcaloides	+	-	+	-	-
Saponinas	+	-	-	-	+
Triterpenoides y/o esteroides	+	+	+	-	-
Resinas	+	+	+	-	-
Cardenólidos	+	+	+	-	-
Cumarinas y/o lactonas	+	+	+	-	-

Leyenda: +(presente); - (ausente).

Tabla 17. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico.

Ensayo	Extracto hidroalcohólico
Fenoles	+
Flavonoides	+
Catequinas	+
Aminoácidos libres y/o grupos amino	+
Alcaloides	+
Saponinas	+
Triterpenoides y/o esteroides	+
Resinas	+
Cardenólidos	+
Cumarinas y/o lactonas	+

Leyenda: +(presente); - (ausente)

Tabla 18. Fenoles, flavonoides y compuestos secuestradores del radical libre DPPH presentes en las 13 fracciones obtenidas por cromatografía en columna.

Fracción	Ensayos		
	$FeCl_3$ 10%	Shinoda	DPPH
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	-	+

Leyenda: +(presente); - (ausente)

Tabla 19. Longitud de onda (nm) de las curvas espectrales de los compuestos fenólicos aislados de las fracciones 9, 10, 11, 12 y 13.

Bandas	Fracciones (longitud de onda en nm)				
	9	10	11	12	13
1	252, 280	254, 272 (sh), 342	252, 272 (sh), 344	252, 276	254, 276
2	258, 347	254, 272 (sh), 346	253, 273 (sh), 329	254, 321	254
3	268	253, 273	252, 272	253	
4	254, 275 (sh), 342	253, 275 (sh), 330	287, 324	287, 324	
5	275	252, 277	251, 277 (sh), 330	253, 278	
6		251	251, 300		
7		253	254		

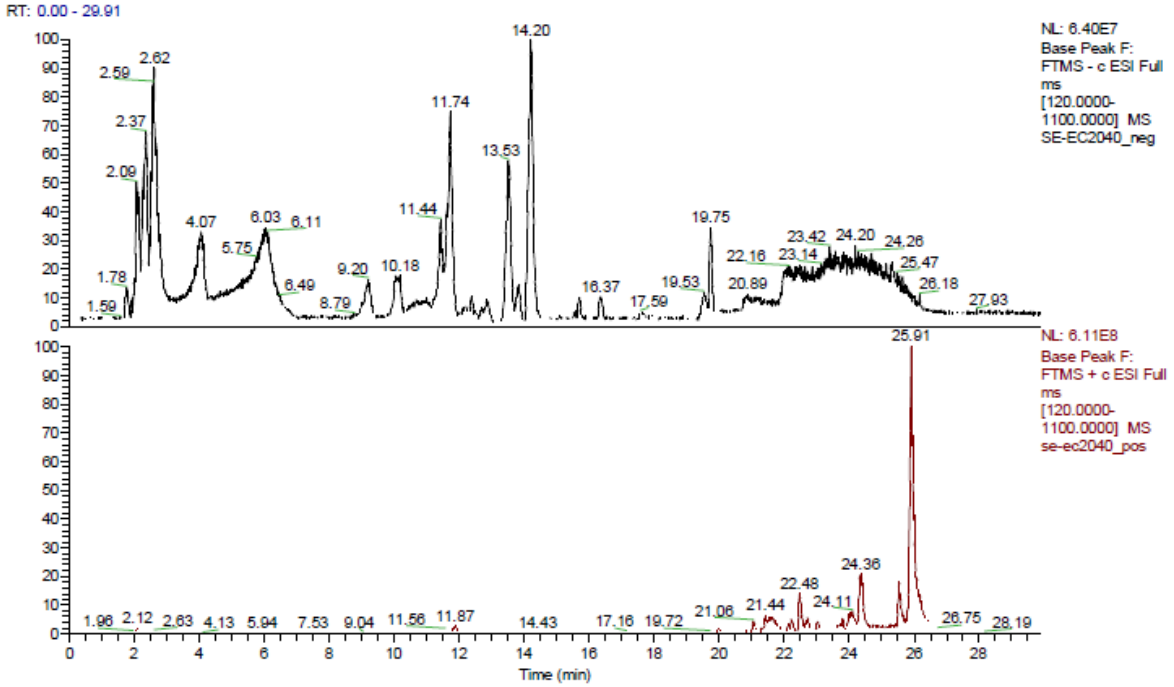


Figura 5. Perfil cromatográfico por UHPLC – MS/MS de los compuestos fenólicos contenidos en el extracto hidroalcohólico, en modo ESI negativo (superior) y positivo (inferior).

Tabla 20. Identificación de los compuestos fenólicos basado en su tiempo de retención, *m/z* y patrones de fragmentación por UHPLC – MS/MS del extracto hidroalcohólico.

N°	t_R (min)	MS – ES^{--} *m/z*	MS^2	Error (ppm)	MS – ES^{+}	MS^2	Error (ppm)	Masa nominal	Formula molecular	Nombre del compuesto	Referencia
1	2,56	623,1622	477,1041 461,1093 315,0512 299,0199 271,0249 243,0291 180,0061 151,0030	2,51				624	$C_{28}H_{32}O_{16}$	Isorhamnetin 3 – *O* - rutinosido (isómero 1)	[72–79]
2	2,60	239,0561	179,0345 177,0533 149,0602 133,0651 107,0493	4,37				240	$C_{11}H_{12}O_6$	Ácido eucómico (isómero 1)	[80–84]
3	2,61	653,1729	507,1143 345,0617 329,0306 315,0154 302,0431 287,0198 208,0014 165,9899	2,49				654	$C_{29}H_{34}O_{17}$	Siringetin -3 – *O* – rutinósido (isómero 1)	[79,85–87]
4	2,62				641,1716	479,1182 333,0605 317,0655 301,0336 145,0494 127,0390 85,0289	0,63	640	$C_{28}H_{32}O_{17}$	Ranupenin 3 – *O* – rhamnopiranosil, 8 - glucopiranosa	[88]
5	3,85	353,0880	191,0556 179,0341	3,51				354	$C_{16}H_{18}O_9$	Ácido clorogénico	[3,40,89–92]

6	4,06	239,0650	173,0450 135,0440 179,0344 177,0552 149,0601 133,0651 107,0493 191,0556	4,12	240	$C_{11}H_{12}O_6$	Ácido eucómico (isómero 2)	[80–83]
7	6.03	367,1034	173,0449 134,0365 110,0442 93,0335	2,89	368	$C_{17}H_{20}O_9$	Ácido 3 – *O* – feruloilquínico	[93,94]
8	8,81	623,1617	445,3145 315,0508 299,0501 271,0244 243,0301 180,0054 153,0188	1,64	624	$C_{28}H_{32}O_{16}$	Isorhamnetin – 3 – (glucopiranosil) – (1→2) - rhamnopiranosa	
9	9,20	653, 1724	345,0614 329,0303 315,0146 302,0428 287,0196 208,0002 180,0061	1,83	654	$C_{29}H_{34}O_{17}$	Siringetin 3 – *O* - rutinosido (isómero 2)	[79,85–87]
10	10,10	653,1721	345,0610 329,0302 314,0073 301,0351 287,0185 178,9975 165,9900	1,28	654	$C_{29}H_{34}O_{17}$	Siringetin 3 – *O* – rutinosido (isómero 2)	[79,85–87]
11	10,68	507,114	344,0534 329,0301 301,0351	1,43	508	$C_{23}H_{24}O_{13}$	Siringetin 3 – *O* – glucósido	[79,86]

12	11,44	637,1772	287,0192 273,0407 491,1328 328,0587 313,0352 299,0194 286,0487 271,0244 195,0293 180,0060	1,47				638	$C_{29}H_{34}O_{16}$	Ombuin – 3 – *O* - rutinósido (isómero 1)	[95–97]
13	11,51	447,0930	271,0466 253,0350 209,0445 191,0332 181,0498 165,0549	1,93				448	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Ácido cimicifúgico A	[98]
14	11,64	637,1773	329,0662 313,0352 299,0193 286,0478 271,0244 195,0289 180,0060	1,57				638	$C_{29}H_{34}O_{16}$	Ombuin 3 – *O* – rutinosido (isómero 2)	[97]
15	11,72	667,1880	521,1345 359,0769 343,0457 329,0341 316,0584 301,0349 195,0293 180,0056	1,67	669,2026	361,0918 346,0681 328,0577 300,0026 129,0547 85,0289	0,08	668	$C_{30}H_{36}O_{17}$	Jaceidin – 7-neohesperidósido	[99,100]
16	12,39	491,1192	329,0663 313,0352 299,0193 286,0478 271,0245	1,56				492	$C_{23}H_{24}O_{12}$	Ombuin 3 – *O* – glucósido	[101,102]

			195,0285 180,0054 359,0876 343,0455 329,0299					
17	12,47	521,1297	316,0582 301,0349 284,0318 195,0289 180,0054	1,41	522	$C_{24}H_{26}O_{13}$	Iridina	[103,104]
			237,0403 209,0499					
18	12,50	431,0981	193,0499 165,0499 145,0599 267,0504 223,0606 195,0656	1,80	432	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Ácido 2 – feruloilpiscídico	[105]
			193,0499					
19	12,71	461,1088	180,0420 178,0262 163,0393 149,0600 134,0363	2,09	462	$C_{22}H_{22}O_{11}$	Ácido cimicifúgico G	[106]

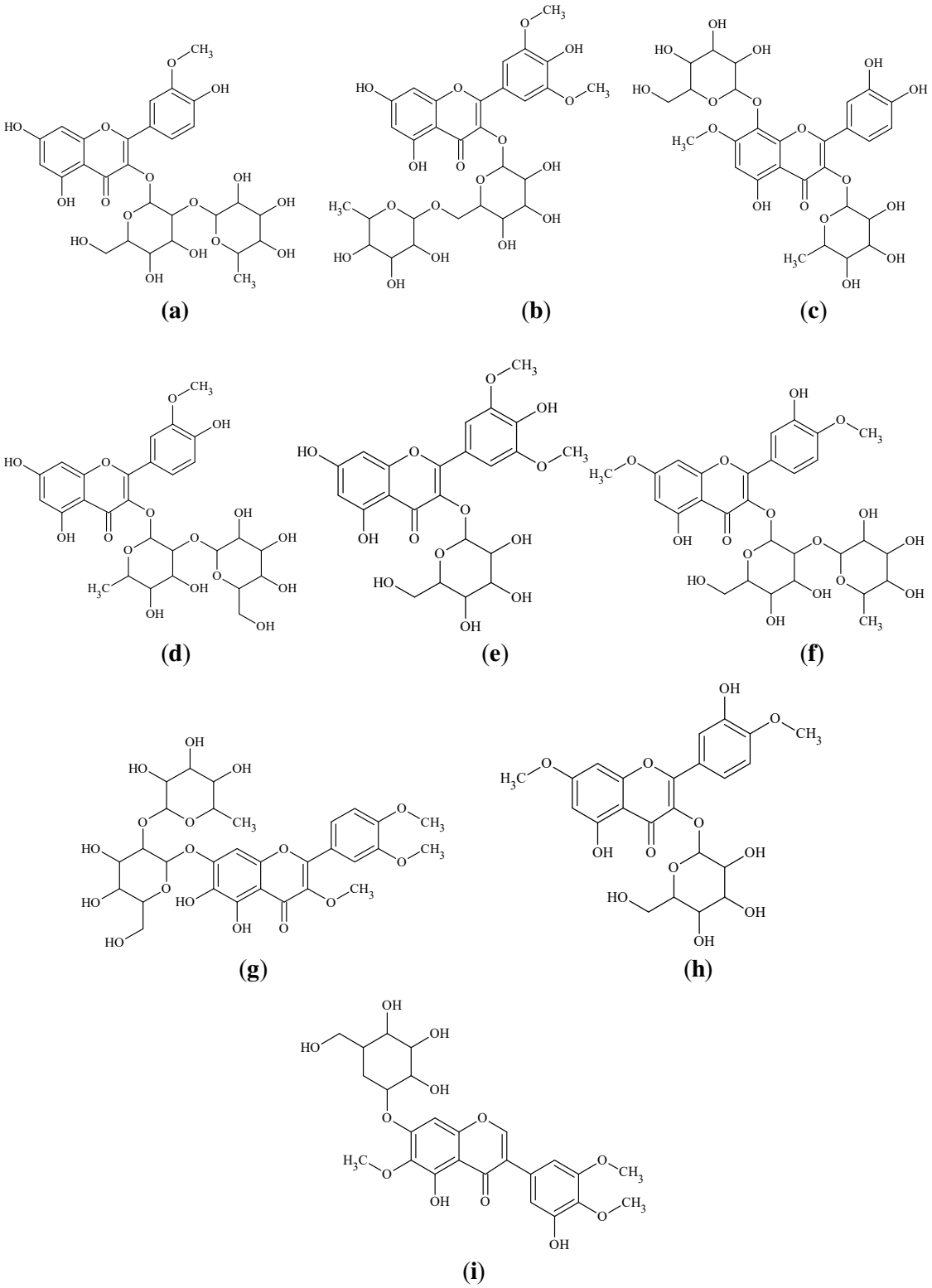


Figura 6. Flavonoides contenidos en el extracto hidroalcohólico: (**a**) isorhamnetin 3 – *O* – rutinósido; (**b**) siringetin 3 – *O* – rutinósido; (**c**) ranupenin 3 – *O* – rhamnopiranósido, 8 – *O* – glucopiranósido; (**d**) isorhamnetin 3 – *O* - [glucopiranosil – (1 →2) – *O* - rhamnopiranósido]; (**e**) siringetin 3 – *O* - glucósido; (**f**) ombuin 3 – *O* – rutinósido; (**g**) jaceidin 7 – neohesperidosa; (**h**) ombuin 3 – *O* – glucósido e (**i**) iridina.

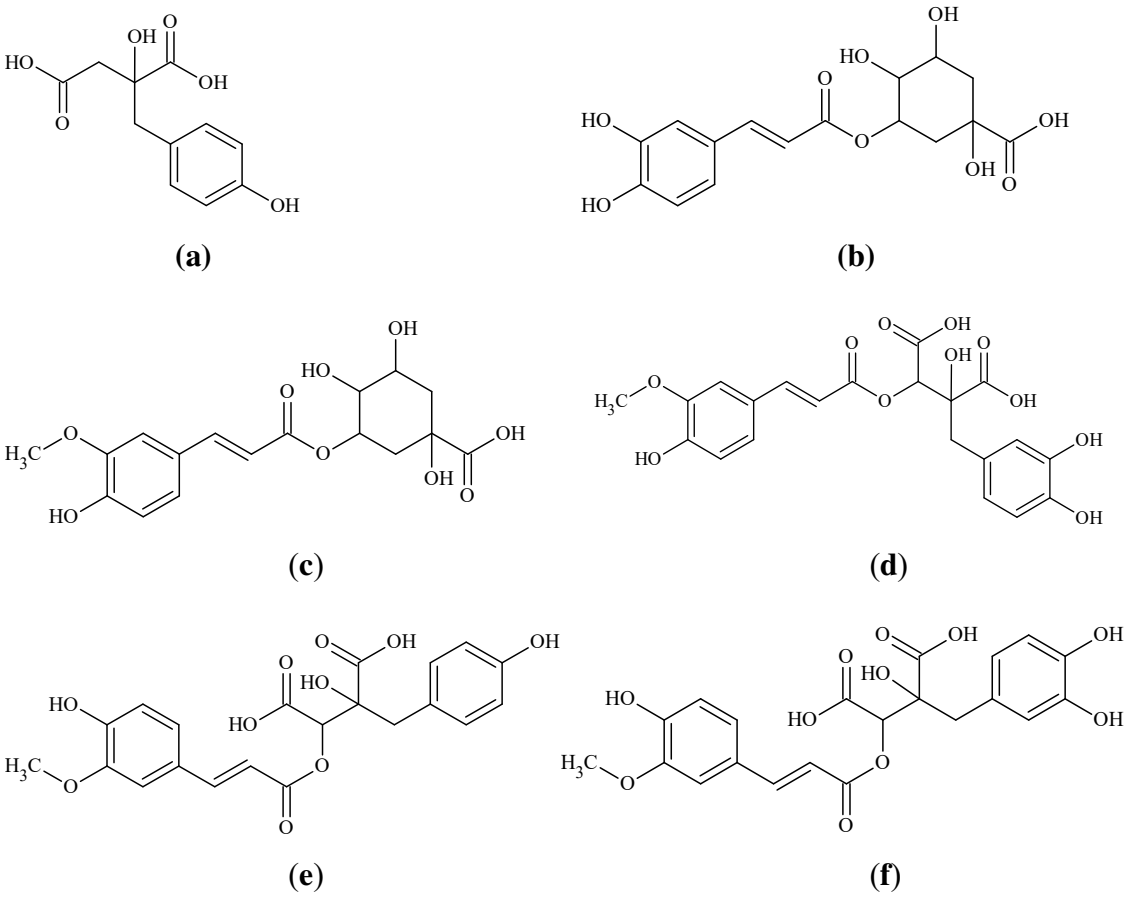


Figura 7. Ácidos fenólicos contenidos en el extracto hidroalcohólico: (**a**) ácido eucómico, (**b**) ácido clorogénico, (**c**) ácido 3 – feruloilquínico, (**d**) ácido cimicifúgico A, (**e**) ácido 2 – feruloilpiscídico y (**f**) ácido cimicifúgico G.

Tabla 21. Rendimiento del extracto metanólico y de sus fracciones[53]; y del extracto hidroalcohólico.

Extracto y/o fracción	Peso de muestra (g)	Peso seco de extracto y/o fracción (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
Extracto metanólico	100	40	40,00
Fracción de *n* – hexano	5	0,66	14,18
Fracción de diclorometano	5	1,85	39,79
Fracción de acetato de etilo	5	0,86	18,52
Fracción metanólica	5	1,28	27,51
Extracto hidroalcohólico	400	130	32,50

Tabla 22. Contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles del extracto metanólico y de sus fracciones[53].

Extracto/ Fracción	Fenoles totales (mg GAE/g de extracto)	Flavonoides (mg QE/g de extracto)	Flavonoles (mg QE/g de extracto)	Relación	
				Flavonoides/ Fenoles totales	Flavonoles/ flavonoides
Extracto metanólico	64,5 ± 1,17^{b}	36,55 ± 1,91^{c}	10,58 ± 0,85^{c}	0,57	0,29
Fracción de *n* – hexano	N.D.	N.D.	N.D.		
Fracción diclorometano	44,32 ± 1,6^{a}	17,27 ± 1,64^{a}	6,48 ± 0,34^{b}	0,39	0,38
Fracción de acetato de etilo	74,46 ± 1,6^{c}	28,06 ± 1,1^{b}	2,92 ± 0,23^{a}	0,38	0,1
Fracción metanólica	149,81 ±5,02^{d}	47,33 ± 2,27^{d}	14, 34 ± 0,69^{d}	0,32	0,3
Valor *p*	< 0,05	< 0,05	<0,05		

Los resultados son el promedio ± D.E. de tres determinaciones, las letras en superíndices diferentes significan diferencias significativas (p <0,05).

Tabla 23. Contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles del extracto hidroalcohólico.

Extracto	Fenoles totales (mg GAE/g de extracto)	Flavonoides (mg QE/g de extracto)	Flavonoles (mg QE/g de extracto)	Relación	
				Flavonoides/ Fenoles totales	Flavonoles/ flavonoides
Extracto hidroalcohólico	125,03± 6,15	60,42 ± 2,14	19,85 ± 0,27	0,48	0,33

Los resultados son el promedio ± D.E. de tres determinaciones

Tabla 24. Capacidad antioxidante del extracto metanólico y de sus fracciones[53].

Extracto/ Fracción	DPPH		ABTS		FRAP
	%	µmoles ET/g de extracto	%	µmoles ET/g de extracto	µmoles ET/g de extracto
Extracto metanólico	13,61 ± 0,84^{b}	76,97 ± 7,17^{b}	27,0 ± 1,57^{b}	172,38 ± 10,78^{b}	188,68 ± 2,76^{b}
Fracción *n* – hexano	2,66 ± 0, 93a	0^{a}	15,28 ± 1,51^{a}	91,71 ± 10,42^{a}	160,8 ± 1,66^{ab}
Fracción diclorometano	3,96 ± 0, 47a	0^{a}	14,44 ± 0,58^{a}	85,93 ± 4^{a}	124,89 ± 0,17^{a}
Fracción acetato de etilo	23,27 ± 3,41^{c}	159,82 ± 29,2^{c}	25,52 ± 1,25^{b}	162,16 ± 8,6^{b}	244,59 ± 3,18^{c}
Fracción metanólica	66,41 ± 1,67^{d}	529,80 ± 14,3^{d}	66,54 ± 3,07^{c}	444,38 ± 11,31^{c}	406,86 ± 24,58^{d}
Valor *p*	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Los resultados son el promedio ± D.E. de tres determinaciones, las letras con superíndices diferentes significan diferencias significativas (p <0,05).

Tabla 25. Contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles de concentraciones del extracto hidroalcohólico.

Concentración del extracto (mg/mL)	Fenoles totales (mg GAE/g de extracto)	Flavonoides (mg QE/g de extracto)	Flavonoles (mg QE/g de extracto)
0,1	49,17 ± 3,45	18,69 ± 1,52	3,69 ± 0,43
0,2	87,49 ± 4,44	30,36 ± 0,25	7,68 ± 0,43
0,3	121,97 ± 1,91	44,86 ± 2,95	10,78 ± 0,11
0,4	150,57 ± 3,48	57,24 ± 2,64	16,14 ± 0,20
0,5	187,87 ± 4,52	76,33 ± 0,75	19,33 ± 0,25

Promedio ± D.E. de tres determinaciones

Tabla 26. Capacidad antioxidante de concentraciones del extracto hidroalcohólico.

Concentración del extracto (mg/mL)	DPPH (%)	ABTS (%)	FRAP (µmoles ET/g de extracto)
0,1	35,36 ± 0,02	22,85 ± 1,44	103,68 ± 7,53
0,2	60,65 ± 1,20	51,72 ± 1,52	168,53 ± 5,01
0,3	84,38 ± 0,64	62,67 ± 2,35	249,29 ± 11,04
0,4	93,27 ± 0,18	74,60 ± 2,35	302,62 ± 0,21
0,5	93,66 ± 0,25	81,65 ± 2,82	411,41 ± 30,16

Promedio ± D.E. de tres repeticiones

Tabla 27. Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de fenoles totales, flavonoides y flavonoles y su coeficiente de correlación con la capacidad antioxidante.

Compuesto fenólico (mg/g de extracto)	Capacidad antioxidante				
	DPPH		ABTS		FRAP
	CI_{50}	*r*	CI_{50}	*r*	*r*
Fenoles totales	88,87	0,983	118,36	0,990	0,994
Flavonoides	17,28	0,975	29,18	0,983	0,996
Flavonoles	5,73	0,980	8,82	0,987	0,993

Tabla 28. Matriz correlacional entre contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles y su capacidad antioxidante.

	Fenoles totales	Flavonoides	Flavonoles	DPPH	ABTS	FRAP
Fenoles totales	1					
Flavonoides	0,989**	1				
Flavonoles	0,989**	0,986**	1			
DPPH	0,983**	0,975**	0,980**	1		
ABTS	0,990**	0,983**	0,987**	0,972**	1	
FRAP	0,994**	0,996**	0,993**	0,901**	0,924**	1

**. La correlación es significativa en el nivel 0,05.

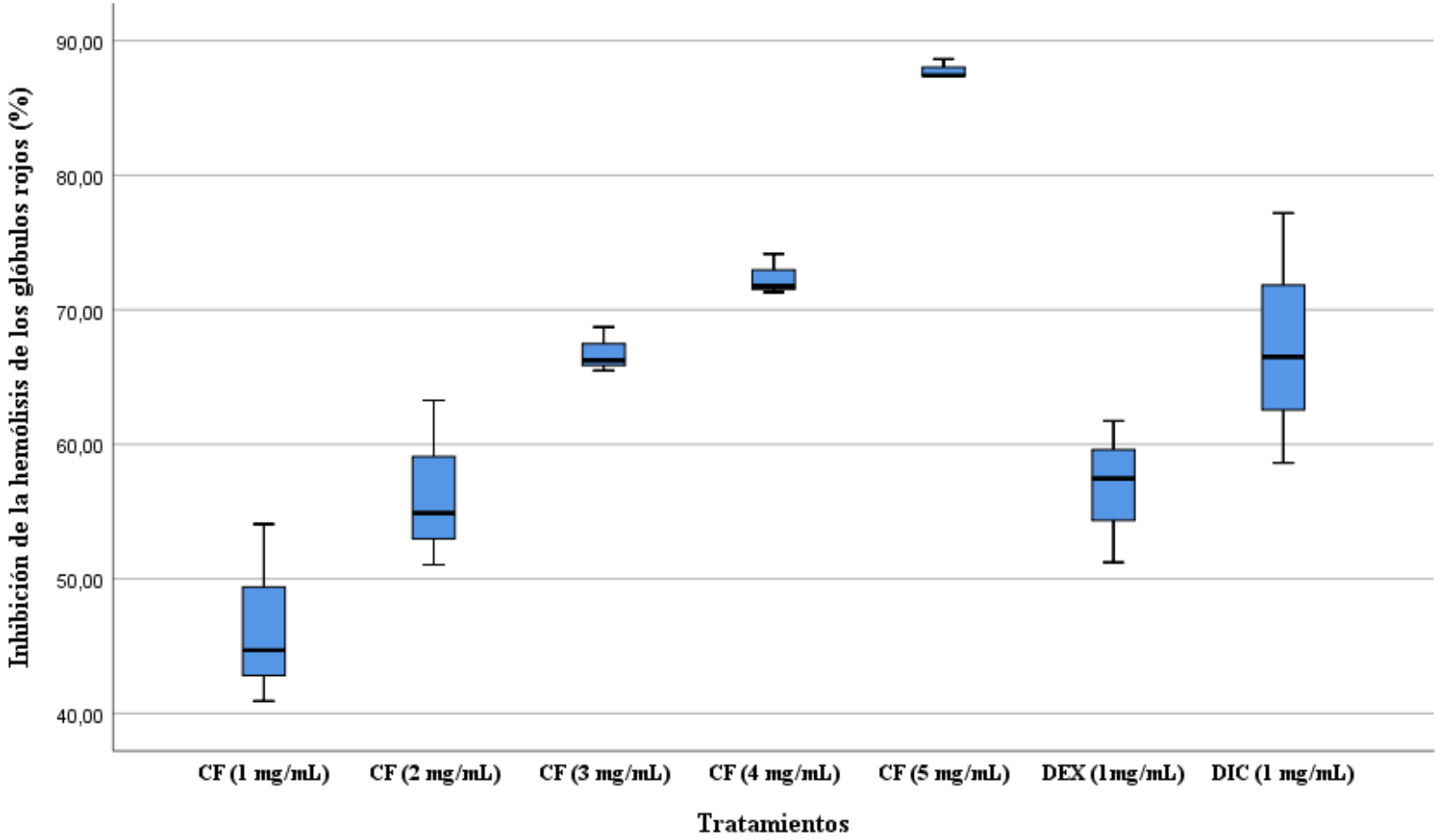


Figura 8. Porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos por efecto de los compuestos fenólicos contenidos en el extracto hidroalcohólico. Leyenda: **CF**: Compuestos fenólicos; **DEX**: Dexametasona, **DIC**: diclofenaco

Tabla 29. Coeficiente de correlación de Pearson entre fenoles totales, flavonoides y flavonoles y el porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos.

	Fenoles totales	Flavonoides	Flavonoles	Inhibición de hemólisis de glóbulos rojos (%)
Fenoles totales	1			
Flavonoides	1,000**	1		
Flavonoles	1,000**	1,000**	1	
Inhibición de hemólisis de glóbulos rojos (%)	0,980**	0,980**	0,980**	1

**. Correlación significativa ($p<0,05$)

Tabla 30. Concentración letal 50 (CL_{50}) por efecto de la exposición de los compuestos fenólicos frente a nauplios de *Artemia salina.*

Concentración (µg/mL)	Total	Vivos	Muertos	% Muertes	Probit	r	CL_{50} (µg/mL)
10	30	19	11	36.67	4.66		
100	30	15	15	50.00	5.00	0,993	123,58
1000	30	12	18	60.00	5.25		

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

S. rufescens DC., es una especie nativa propia de los andes del sur del Perú, caracterizada por soportar un estrés biótico y abiótico propio de su hábitat y que para hacerle frente ha desarrollado una capacidad de biosintetizar metabolitos secundarios, entre los cuales, destacan los compuestos fenólicos objetivo de la presente investigación.

Las **Tablas 17 y 18**, muestran los resultados del screening fitoquímico del extracto metanólico y sus fracciones; así como, del extracto hidroalcohólico (**Anexo 33**). En ambos extractos se destaca la presencia de fenoles, flavonoides, catequinas, aminoácidos y/o grupos amino, alcaloides, saponinas, triterpenos y/o esteroides, resinas, cardenólidos y cumarinas y/o lactonas; mientras que, en las fracciones del extracto metanólico, se muestra que estos se van separando según su polaridad, resaltando los fenoles, flavonoides y catequinas en las fracciones más polares (acetato de etilo y metanol). Existen reportes en la literatura de los hallazgos del screening fitoquímico de extractos obtenidos en especies de este género. En el extracto acuoso de hojas de *S. candicans* se reporta presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, glicósidos y fitosteroles [107]. En extractos hidroalcohólicos al 95% de diez especies de *Senecio*, se reportaron la presencia de ácidos grasos, cumarinas, alcaloides, esteroles, triterpenos, compuestos reductores, saponinas, terpenoides, flavonoides, taninos y polifenoles [108]. En las partes aéreas de *S. delphinoides* se demostró la presencia de aceites volátiles, esteroides y/o triterpenoides, carotenoides en la fracción de *n* – hexano; taninos, azúcares reductores, triterpenos en la fracción metanólica, alcaloides y flavonoides en la fracción acuosa [109]. Por lo tanto, se confirmó la presencia fenoles, flavonoides y catequinas en *S. rufescens* DC., el cual es, recurrente en otras especies de este género.

En la **Tabla 19**, se muestra que en las fracciones 9, 10, 11, 12 y 13 obtenidas por cromatografía en columna, se evidencia la presencia de fenoles, flavonoides a excepción de la fracción 13 y compuestos químicos con capacidad de secuestrar el radical libre DPPH (**Anexo 34**). Dichas fracciones fueron obtenidas de mezclas de acetato de etilo y metanol utilizadas en la cromatografía en columna (**Tabla 16**). Por tanto, se puede afirmar que los compuestos fenólicos con capacidad de secuestrar al radical libre DPPH, se encontraban en estas cinco últimas fracciones y éstas fueron utilizadas para la obtención de dichos compuestos por cromatografía en capa fina, su posterior identificación por UHPLC – MS/MS y para las pruebas bioquímicas, farmacológicas y toxicológicas, respectivamente.

Los espectros UV de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna, se muestran en la **Tabla 20**. Las fracciones 9,2 (**Anexo 35**); 9,4 (**Anexo 36**); 10,1; 10,2; 10,4; 11,1; 11,2 y 11,5; sugieren la presencia de flavonas y flavonoles tanto libres como glicosilados. Markhan y Mabry [30], han realizado una descripción amplia de los espectros ultravioleta de las flavonas y flavonoles al estado libre y glicosilados; asimismo, también Lock de Ugaz [110], señala que las flavonas tienen valores de absorción en la banda I entre 310 – 350 nm y la banda II entre 250 – 280 nm; mientras que, los flavonoles con el OH en posición 3 sustituido, tienen valores de absorción en la banda I entre 330 – 360 y en la banda II entre 250 – 280; los cuales se aproximan a nuestros hallazgos.

Brito et al. [75], refieren que la isorhamnetin 3 – *O* – rutinosido en el UV muestra picos en 250, 268 (sh) y 342 nm respectivamente, que se aproxima a la fracción 1,10 de la **Tabla 20**. Chahdoura et al. [84], mencionan que el ácido eucómico tiene un pico máximo en 282 nm, que se aproxima a la fracción 9.1. Parker y Böhm [85], describen que siringetin 3 – *O* – rutinosido tiene picos en el espectro UV de 254, 268, 300 y 361 nm respectivamente y la fracción que más se aproxima es la 11.6. Los espectros de las fracciones 11,4 (**Anexo 37**) y 12,4, tienen una forma característica que tentativamente sugieren presencia de derivados del ácido cinámico. El ácido clorogénico, tiene picos máximos en 240, 296sh y 324 nm según Belay et al. [111]; 241, 300sh y 325 según Zhang et al. [94]; 238, 286, y 316 según Tomac et al. [112] y 244, 303sh y 328 nm según Goufo et al. [92]. Mientras que, el ácido 3 – O – feruloilquínico tiene picos máximos en 238, 286 y 313 nm según Tomac et al. [112]. En el caso de la isorhamnetina cuando se encuentra glicosilado sus picos máximos se encuentran entre 255, 268sh, 303sh y 357 (isorhamnetin 3 – *O* – galactósido) y 254, 265sh, 305sh y 356 (isorhamentin 3 – *O* rutinósido) [113] , no hay reportes del espectro UV para la isorhamnetin 3 – O – (glucopiranosil – (1 →2) – rhamnopiranósido) con el cual hacer la comparación. La siringetin 3 – *O* – glucósido presenta un pico máximo de absorción en 354 nm según el reporte de Liu et al. [114]. La ombuin 3 - rutinósido presenta picos máximos de absorción en 255, 264 y 349 según Iñigo et al. [95]. El ácido cimicifúgico A muestra un pico máximo en 328 nm según Takahira et al. [115] y Jahn et al. [116]. No existen reportes para el espectro UV de la jaceidin 7 – neohesperidósido, sin embargo, Mabry et al. [113], reportan que la jaceidina tiene picos máximos en 256, 271 y 351 nm, respectivamente. La ombuin 3 – *O* – glucosido (ombuin 3 – *O* – D – glucopiranósido) muestra un espectro en el UV característico de la ombuina, con bandas en 254,8 – 353,5 nm según Malek et al. [117]. Zhang et al. [118], señalan que la iridina es una isoflavona y que

tiene picos en 216sh, 267 y 332 nm respectivamente. Jahn et al, refieren que el ácido 2 – *O* – feruloilpiscídico (también conocido como ácido cimicifúgico E), tiene un pico máximo de absorción en 325 nm y el ácido cimicifúgico G en 328 nm [116].

La **Figura 5**, presenta el perfil cromatográfico por UHPLC – MS/MS de los compuestos fenólicos hallados en el extracto hidroalcohólico y en la **Tabla 21**, su identificación tentativa según su tiempo de retención, relación *m/z* y patrones de fragmentación, en la cual, como resultado se han logrado identificar 19 compuestos fenólicos agrupados en ácidos fenólicos y flavonoides. La identificación de cada uno de ellos, se ha llevado a cabo revisando sus patrones de fragmentación y por comparación con la literatura científica.

A la señal de 2,56 min en *m/z* 623,1622 se ha identificado tentativamente como isorhamnetin – 3 – rutinósido, porque produjo el ión *m/z* 315,0512 $[M - rutinosa - H]^-$, que corresponde a la isorhamnetina después de la separación de la glucosa y rhamnosa que componen el disacárido rutinosa y la presencia de sus iones de fragmentación típicos en modo negativo *m/z* 299,0199; 271,0249; 243,0297; 180,0061 y 151,0030. Schieber et al. [78]; Gutzeit et al. [79]; Arimboor y Arumughan [72]; Brito et al. [75]; Chen et al. [77]; Ghaareb et al. [74]; Sun et al. [119]; Rini y Raghu [76]; Pianoski et al. [73], reportan patrones de fragmentación similares en modo negativo para la isorhamnetin 3 – *O* - rutinosido. En la **Tabla 8**, se reporta la presencia de la isorhamnetina libre y como glicósido en diversas especies del género *Senecio*.

A la señal de 2,60 min en *m/z* 239,0561 se ha identificado tentativamente como ácido eucómico (isómero 1) y entre sus fragmentos están los iones en *m/z* 179,0345; 177,0553; 149,0602; 133,0651 y 107,0493, respectivamente. Mun'im et al. [81]; Okada et al. [80]; Chahdoura et al. [84]; y Aremu et al. [82], reportan patrones de fragmentación similares a esta investigación.

A la señal de 2,61 min en *m/z* 653,1729 en modo negativo $[M - H]^-$, fue identificado tentativamente como siringetin 3 – *O* – rutinosido (4',5,7 – trihidroxi – 3'.5' – dimetoxiflavonol 3 – [*O* – α – L – rhamnopiranosil – (1→6) – β – D - glucopiranosido]) y entre sus fragmentos se encuentran en *m/z* 507,1143 $[M - rham - H]^-$; 345,0617 $[M - glu - H]^-$; los fragmentos en *m/z* 315,0154; 302, 0431; 287;0198; 208,0014 y 165,9899, respectivamente; corresponden al patrón de fragmentación de la miricetina [120], debido a que la siringetina es la 3',5' – dimetoxi – miricetina, dichos resultados coinciden con lo descrito por Gutzeit et al. [79]. Mientras que, Slimestad et al. [86], reportan en modo positivo

$[M + H]^+$ en *m/z* 655 y entre sus fragmentos en *m/z* 509, 449, 347 y 287; respectivamente. Razgonova et al. [121], describen para la siringetina en modo negativo $[M - H]^-$ el ión precursor en *m/z* 345 y entre sus fragmentos 330, 315, 287 y 163 que son semejantes a lo reportado en nuestra investigación. Otro acercamiento a estos resultados es citado por Castillo – Muñoz et al. [122], quienes precisan que en modo positivo $[M + H]^+$ la siringetin 3 – *O* – glucósido en *m/z* 509 experimenta un fragmento en *m/z* 347, debido a la pérdida de un fragmento de *m/z* 162 (que se debe a la glucosa).

A la señal 2,62 min en *m/z* 641,1716 en modo positivo $[M + H]^+$, se ha identificado tentativamente como ranupenin 3 – *O* – rhamnopiranosido, 8 – *O* – glucopiranosido y entre su patrón de fragmentación se encuentra en *m/z* 479,1182 [M – glucosa + H]$^+$, 333,0605 [M – rhamnosa + H]$^+$, 317,0655 [M – metilo + H]$^+$ y 301,0336 [M – OH + H]$^+$. La ranupenina es la 7- metil – gosipetina o la 7 – metil – 8 – hidroxi – quercetina [121]. El peso molecular de gosipetina es 318,23 y de la quercetina es 302,236 y son cercanos a los dos últimos fragmentos arriba mencionados. Hiraga et al. [123], en su análisis de la gosipetina (8 – hidroxiquercetina), reportan un fragmento en *m/z* 301,1190 que corresponde a la quercetina; Silva et al. [120] también reportan en modo negativo $[M –H]^-$ para la quercetina (PM = 302) un ion en *m/z* 301, ambos se asemejan en *m/z* 301,0336 de nuestro hallazgo. Su presencia está descrita también en *Atraphaxis pyrifolia* Bunge [88], en la cual se mencionan picos en el UV a 240, 262 y 358 nm en etanol, respectivamente.

A la señal de 3,85 min en *m/z* 353,0880 en modo negativo $[M - H]^-$, se ha identificado tentativamente como el ácido clorogénico y entre sus fragmentos se encuentran en *m/z* 191,0556; 179,0341; 173,0450 y 135,0440, respectivamente. Sun et al. [89], Faraone et al. [3], Krzyzanowska-Kowalczyk et al. [124], Sun et al. [119], Goufo et al. [92] y López – Fernández et al. [91], reportan patrones similares para el ácido clorogénico. El ácido clorogénico está presente en varias especies de este género [3,9,16,33,36,39–41], tal como se muestra en la **Tabla 3**.

A la señal de 4,06 min en *m/z* 239, 0650 en modo negativo $[M - H]^-$, se ha identificado tentativamente como el ácido eucómico, con su correspondiente patrón de fragmentación, el cual se ha detallado anteriormente.

A la señal de 6.03 min en *m/z* 367, 1034 en modo negativo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como el ácido 3 – *O* – feruloilquínico, un derivado del ácido cinámico. Entre sus fragmentos se encuentran en *m/z* 191,0556;173, 0449; 134,0365, 110,0442 y 93,0335; respectivamente. Sun et al. [119], refieren que el fragmento 191 [M – H – feruloil]$^-$

se produce por la pérdida del ácido ferúlico en forma de ion feruloilo. López – Fernández et al. [91] y Hong et al. [125], reportan patrones de fragmentación del ácido 3 – *O* – feruloilquínico similares al nuestro. Se ha reportado que el ácido feruloilquínico se encuentra presente en las partes aéreas de *S. scandens* Buch. -Ham [33,40] (**Tabla 3**).

A la señal 8,81 min en *m/z* 623,1617 en modo negativo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como isorhamnetin 3 – *O* - [glucopiranosil – (1→2) - rhamnopiranosido] y sus fragmentos en *m/z* 445,3145 [M – H - glucopiranosil], 315,0508 [M – H - rhamnopiranosil]. A partir del fragmento en *m/z* 315,0508 corresponde a los fragmentos de la isorhamnetina descrito anteriormente.

A la señal 9.20 min en *m/z* 653,1724 en modo negativo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como siringetin 3 – *O* – rutinósido (isómero 2); asimismo, en la señal 10,10min en *m/z* 653, 1721 en modo negativo $[M - H]^-$, también fue identificado tentativamente como siringetin 3 – rutinósido (isómero 3), cuyas características espectrales fueron descritas anteriormente.

A la señal 10,68 en *m/z* 507,1114 en modo negativo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como siringetin 3 – *O* - glucósido y su fragmento 344,0534 [M – glucosil - H]$^-$ corresponde a la siringetina después de la pérdida de la glucosa. Nuestros datos coinciden con lo reportado por Gutzeit et al. [79]. También, Slimestad y Hostettmann [86], describen sus características espectrales, pero en modo positivo $[M + H]^+$.

A la señal 11,44 en *m/z* 637, 1772 en modo negativo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como ombuin 3 – *O* – rutinósido y sus fragmentos 491,1328 [M - rhamnosil - H]$^-$, 328,0587 [M -glucosil - H]$^-$; el fragmento restante corresponde a la ombuina (7,4′- di – O – metil – quercetina) [126]. Los subsiguientes patrones de fragmentación corresponden a la ombuina y están descritos por Iñigo y Pomilio [95], Miyazawa et al. [96] y Ünlu et al. [97].

A la señal 11,51 en *m/z* 447,0930 en modo negativo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como ácido cimicifúgico A, el cual es un éster del ácido fukiíco (ácido glicoloil – fenil – propanoico) y del ácido ferúlico [127]. Li et al. [98], describen el patrón de fragmentación en modo negativo $[M - H]^-$ del ácido cimicifúgico A y de su isómero el ácido cimicifúgico B (constituido por el ácido fukiíco y ácido iso – ferúlico), muy similar a los resultados hallados en esta investigación.

A la señal 11,64 en *m/z* 637, 1773 en modo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como ombuin 3 – *O* – rutinósido (isómero 2), cuyas características fueron descritas más arriba.

A la señal 11,72 en *m/z* 667,1880 en modo negativo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como jaceidin 7 – neohesperidosido. La neohesperidosa es un disacárido constituido por rhamnosa y glucosa. Los dos primeros fragmentos se producen por la pérdida sucesiva de la rhamnosa y la glucosa en *m/z* 521,1345 $[M – rhamnosil - H]^-$ y 359,0769 $[M – glucosil - H]^-$ y el tercer fragmento 343,0457 corresponde a la jaceidina [128]. La jaceidina es la 3,6,3' – trimetil – quercetagetina (derivado de un flavonol) [99]. Taamalli et al. [128], reportan el patrón de fragmentación de la jaceidina, el mismo que es semejante a lo reportado en este trabajo.

A la señal 12,39 en *m/z* 491,1192 en modo negativo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como ombuin 3 – *O* - glucósido y su patrón de fragmentación entre las cuales se encuentran en *m/z* 329,0663 $[M – glucosil - H]^-$ por la pérdida de la glucosa, quedando la ombuina cuyo patrón de fragmentación ha sido descrito en la literatura [101,102].

A la señal 12,47 en *m/z* 521,1297 en modo negativo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como iridina (isoflavona glicosilada) y entre sus fragmentos se encuentran en *m/z* 359,0876; 343,0455; 329,0299; 316,0582; 301,0349, 284,0318; 95,0289 y 180,0054 respectivamente. Saralamma et al. [104]; y Gharari et al. [103], reportan patrones de fragmentación en modo negativo $[M - H]^-$ similares para este compuesto.

A la señal 12,50 en *m/z* 431,0981 en modo negativo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como ácido 2 – *O* – feruloilpiscídico, un éster del ácido ferúlico y del ácido piscídico (ácido cimicifúgico E) [129], en el cual el primer fragmento en *m/z* 237,0403 $[M – feruloil - H]^-$ se debe a la pérdida del feruloilo y los siguientes fragmentos corresponden al ácido piscídico. El patrón de fragmentación de este compuesto ha sido descrito por Fan et al. [105].

A la señal 12,71 en *m/z* 461,1088 en modo negativo $[M - H]^-$ se ha identificado tentativamente como ácido cimicifúgico G. Nuntanakorn et al. [106], describen en modo negativo $[M - H]^-$ un patrón de fragmentación similar al hallado en este trabajo.

De nuestros resultados, mostramos por primera vez la presencia del ácido eucómico; siringetin 3 – *O* – rutinósido derivado glicosilado de la miricetina; ranupenin 3 – *O* – rhamnopiranósido, 8 – *O* – glucopiranósido; siringetin 3 – *O* – glucósido; ombuin 3 – *O*

– rutinósido; ácido cimicifúgico A; jaceidin 7 – neohesperidosido; ombuin – 3 – *O* – glucósido; iridina; ácido cimicifúgico E y ácido cimicifúgico G en el género *Senecio.*

López – Fernández et al. [91], realizaron una amplia revisión sobre el uso de LC – MS/MS para la identificación de polifenoles en extractos de plantas. Describen que, si bien la cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (LC – DAD) fue empleada inicialmente para la separación individual de dichos compuestos, sin embargo, su principal limitación era que el detector, sólo podía identificar un compuesto en función a su tiempo de retención y su espectro UV y que era necesario contar con estándares para cada compuesto individual para su identificación correspondiente, adicionalmente, presentaba otras limitaciones como la baja detección de compuestos fenólicos en muestras complejas. Estos problemas fueron superados por el LC – MS/MS. Precisan que el uso de una columna C18 es la más adecuada porque se logra una mejor separación de los analitos, formando picos adecuados que permiten una mejor interpretación de los resultados, asimismo, para lograr tiempos de elusión más reproducibles y mayor resolución de los picos, la temperatura de la columna debería ser controlada, siendo lo óptimo entre 25 a 40 °C. También hacen mención que, la separación de compuestos fenólicos se realiza utilizando sistemas de solventes binarios, los cuales, están constituidos por un componente acuoso y un solvente orgánico menos polar tal como el metanol o acetonitrilo y para controlar el pH se utiliza ácido fórmico, a fin de controlar la carga de las moléculas; un pH entre 2 y 4, contribuye a evitar la disociación de los compuestos fenólicos y facilita obtener picos definidos y mejorar la eficiencia de la ionización para la caracterización de la masa. Finalmente, resaltan el uso de la ionización por electropulverización en modo negativo, como el más utilizado para analizar compuestos fenólicos, con la excepción para las antocianinas en las cuales se utilizan modos positivos y negativos. Estas características han sido detalladas en **3.7.8.** Asimismo, la mayoría de los compuestos químicos de naturaleza fenólica (**Tabla 21**), identificados en la presente investigación se han realizado en modo negativo, salvo para ranupenin 3 – *O* – rhamnopiranosil 8 – glucopiranosa que ha sido detectado en modo positivo y jaceidin 7 – neohesperidósido que ha sido detectado tanto en modo negativo y modo positivo, respectivamente.

De lo descrito en la **Tabla 21** y las estructuras químicas que se presentan en las **Figuras 6 y 7**, se puede afirmar que los compuestos fenólicos son flavonoides glicosilados, de los

cuales ocho son flavonoles y una isoflavona; y ácidos fenólicos, de los cuales uno es derivado fenólico del ácido málico y cinco derivados esterificados del ácido cinámico.

En la **Figura 6**, se presentan las estructuras químicas de los flavonoides contenidas en el extracto hidroalcohólico de hojas de *S. rufescens* DC. Los flavonoles son derivados de los núcleos isorhamnetina (**a y d**), miricetina (**b** y **e**), quercetina (**c, f, h**) y quercetagetina (**g**). respectivamente. Los flavonoles derivados de la isorhamnetina y la quercetina, son recurrentes en el género *Senecio* tal como se muestra en las Tablas **8 y 9**. Respecto a los patrones de glicosidación, se observa que la posición 3 de los flavonoles es el lugar predilecto en donde se produce el enlace con el resto azucarado(**a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f** y **h**), excepcionalmente se pueden unir en posición 7 (**g** e **i**) y 8 (**c**); y entre los azúcares con los cuales se forman los restos azucarados están la glucosa y ramnosa, unidos ya sea como monosacárido (**c**, **e, h** e **i**), como disacárido rutinosa (**a**, **b**, **f**) o la neohesperidosa (**g**), respectivamente. La glicosidación en posición 3 es muy común en el género *Senecio* [6,9,33,35,38–40,48]y solo existe un reporte en posición 7 [8]. No existen referencias de glicosilación en posición 8 para este género. Asimismo, este es el primer reporte de presencia de isoflavonas en este género.

En la **Figura 7**, se muestran las estructuras químicas de los ácidos fenólicos presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de *S. rufescens* DC, en las cuales destacan un derivado fenólico del ácido málico (**a**) y cinco derivados esterificados del ácido cinámico (**b**, **c**, **d**, **e** y **f**); de los cuales, uno de ellos es el ácido cafeico (**b**) y los otros son ácido ferúlico (**c**, **d**, **e** y **f**). Dos compuestos forman ésteres con el ácido quínico (**b** y **c**), dos con el ácido fukiíco (**d** y **f**) y uno con el ácido piscídico (**e**). En el género *Senecio*, están presentes los esteres formados por el ácido cafeico o ferúlico con el ácido quínico, más no con el ácido fukiíco y ácido piscídico (**Tabla 3**).

En la **Tabla 22,** se observa que el extracto metanólico obtuvo un rendimiento de 40%; mientras que, la fracción de diclorometano fue la que produjo mayor rendimiento, respectivamente. Asimismo, se observa que, de 5 gramos de extracto sometido al fraccionamiento, se logró recuperar a través de sus fracciones 4,65 g que representa el 95%. El rendimiento obtenido para el extracto metanólico se debería al uso de la extracción dinámica con cuatro extracciones sucesivas con 500 mL de metanol; mientras que, las diferencias en el fraccionamiento del extracto metanólico, se deberían a la polaridad de los compuestos presentes, los mismo que fueron solubilizados en solventes de polaridad creciente empleados en el fraccionamiento. El uso de solventes

hidroalcohólicos para realizar extracciones de metabolitos activos en el género *Senecio* a partir de sus partes aéreas, es recurrente en la bibliografía especializada. El uso de etanol en diferentes concentraciones, por ejemplo, en el caso de *S. clivicolus* Wedd, al 96% [3]; y en *S. scandens* Buch. -Ham., al 80% [9], también, se reporta el uso de metanol al 70 %, como es el caso de *S. glaucus* subsp *coronopifolius* (Maire) C. Alexander, obteniéndose 27,06 %; 6,25 % y 7,50 % de rendimiento, respectivamente. En el primero se utilizó maceración dinámica y en los dos últimos maceración simple por agotamiento durante siete días. Nuestros resultados fueron superiores a los reportados para dichas especies del género *Senecio*, tanto para el extracto metanólico, como para el extracto hidroalcohólico al 80%.

Respecto al elevado porcentaje de rendimiento en la fracción de diclorometano del extracto metanólico, la literatura reporta la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos en especies de este género [20]. Dichos compuestos son solubles en diclorometano y, por tanto, se refleja en su elevado porcentaje en dicha fracción. En otras especies de este género, también se han realizado extracciones con solventes de polaridad creciente. A partir del extracto etanólico de las partes aéreas de *S. glaucus* L., se obtuvieron fracciones *n* – hexánicas (13,33%), clorofórmicas (21.76 %) y *n* – butanólicas (36,67%) [4]; y asimismo, el extracto hidroalcohólico al 96 % de las hojas de *S. clivicolus* Wedd., fue fraccionado con *n* – hexano (8,61 ± 0,75 %), cloroformo (63, 39 ± 5,23 %), acetato de etilo (6,87 ± 0,39 %) y *n* – butanol (13, 53 ± 0,95 %) [3]. Se observa, la existencia de una tendencia en el rendimiento, conforme el solvente va incrementado su polaridad. El segundo caso se asemeja a los resultados reportados en la **Tabla 22**.

En la **Tabla 23**, se observa que existe una variación significativa del contenido de compuestos fenólicos, debido a la polaridad de los solventes empleados. La fracción metanólica tiene el mayor contenido de estos compuestos, probablemente porque se encuentran unidos a azucares en forma de glicósidos, que los hacen más polares y, por ende, más solubles en solventes de mayor polaridad. Asimismo, se demostró que estadísticamente son significativas estas diferencias ($p < 0,05$). Mientras que en la **Tabla 24**, se muestra el contenido de estos compuestos en el extracto hidroalcohólico al 80%, corroborando que en solventes con mayor polaridad se extraen un mayor contenido, aproximadamente el doble de dichos compuestos. Asimismo, si bien es cierto que con el metanol se obtiene un mayor rendimiento de extracto en relación al etanol de 80% (**Tabla 22**), sin embargo, con el extracto hidroalcohólico se obtuvo un mayor contenido de

compuestos fenólicos (**Tabla 24**). López - Fernández et al. [91], precisan que es preferible los extractos hidroalcohólicos para la obtención de compuestos fenólicos que el metanol, dada la naturaleza tóxica de este último.

Existen reportes en la literatura acerca de la variabilidad del contenido de fenoles totales en este género. Por ejemplo, el extracto acuoso de *S. anteuphorbium* (L) Sch. Bip.[18], tuvo un menor contenido respecto a lo reportado en la fracción de acetato de etilo de las partes aéreas de *S. clivicolus* Wedd.[3], respectivamente. En la cual, siempre se resalta que una fracción obtenida a partir de un extracto, tiene un mayor contenido. En el presente estudio, tanto la fracción metanólica del extracto metanólico, como el extracto hidroalcohólico al 80%, tuvieron un alto contenido de fenoles totales. Se demuestra, nuevamente que una fracción, tiene un mayor contenido respecto al extracto.

Por otra parte, en la literatura también se reporta variabilidad en el contenido de flavonoides, por mencionar, en una infusión de hojas de *S. viridis* Phil.[71], su contenido fue inferior a lo encontrado en el extracto metanólico de hojas de *S. glaucus* subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander [36]. Evidentemente, en este caso, las diferencias son notorias, debido al tipo de solvente empleado tanto para la infusión y la extracción con metanol. Comparando, los resultados de la presente investigación con la extracción metanólica arriba mencionada, es de resaltar, que tanto la fracción metanólica del extracto metanólico y el extracto hidroalcohólico al 80 %, poseen un mayor contenido de flavonoides, respecto a dichas especies. Asimismo, se reporta la proporción entre flavonoides y fenoles totales, en la cual, los flavonoides representaron aproximadamente la mitad (50 %), en los extractos metanólicos e hidroalcohólico al 80%.

Asimismo, constituye el primer reporte cuantitativo de flavonoles en especies del género *Senecio*. Como se ha descrito, el extracto hidroalcohólico demostró tener mayor contenido de flavonoles que el extracto metanólico. Los flavonoles proporcionalmente respecto a los flavonoides, constituyeron aproximadamente un tercio. Los flavonoles, tales como quercetina, kaempferol, miricetina y fisetina y sus derivados glicosilados o metoxilados, son recurrentes en este género [3,9,34]. En la literatura se reporta el contenido de flavonoles en diez plantas medicinales en el rango de 0,1 a 1,7 mg equivalentes a rutina/g de extracto [68], si bien es cierto que se utiliza la rutina como patrón de comparación, sin embargo, los valores son bastante inferiores al presente reporte.

La diferencia entre fenoles totales y flavonoides, probablemente está cubierta por derivados del ácido málico (ácido eucómico) y del ácido cinámico (ácido clorogénico,

ácido 3 – feruloilquínico, ácido cimicifúgico A, ácido 2 – feruloilpiscídico y ácido cimicifúgico G), cuya presencia han sido descritos ampliamente en la **Tabla 21**.

En la **Tabla 25**, se observa que la fracción metanólica tuvo la más alta actividad antioxidante, seguido del extracto metanólico. Asimismo, se evidencian diferencias significativas entre ellas ($p<0,05$). Por tanto, podemos afirmar que los compuestos químicos que tienen capacidad antioxidante, se encuentran presentes en la fracción más polar (fracción metanólica). De los tres ensayos, el DPPH mide la actividad de los antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, el ABTS de los antioxidantes hidrofílicos y el FRAP, la capacidad reductora de los grupos hidroxilos [66]. Existe un solo reporte en el cual se han utilizado los tres ensayos en una especie del género *Senecio*, en el cual, en la fracción de acetato de etilo del extracto etanólico de las partes aéreas de *S. clivicolus* Wedd., tuvo mayor capacidad antioxidante que la fracción butanólica [3,53]. Se obtuvieron mejores resultados con el ensayo de DPPH, que con el ensayo FRAP en la presente investigación, en tanto que, con *S. clivicolus* Wedd., sus resultados fueron opuestos. Por otro lado, los mejores resultados se obtuvieron con la fracción metanólica del extracto metanólico, mientras que, ellos obtuvieron mejores resultados con la fracción de acetato de etilo. Estas diferencias posiblemente se deben al tipo y contenido de compuestos responsables de la actividad antioxidante en ambas especies y, también porque, *S. clivicolus* Wedd., tiene como hábitat el departamento de Potosí (Bolivia) ubicada a 3750 msnm y en el caso de *S. rufescens* DC., proviene del departamento de Ayacucho (Perú) a 4756 msnm.

En las **Tabla 26,** se observa que, a concentraciones crecientes del extracto hidroalcohólico, también contiene concentraciones crecientes de fenoles totales, flavonoides y flavonoles. Asimismo, en la **Tabla 27**, se muestra que la respuesta de estos compuestos frente a DPPH, ABTS y FRAP, también se incrementa en relación a su contenido de compuestos fenólicos. Estos resultados sirvieron para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) y los coeficientes de correlación respectivos para dichos ensayos.

En la **Tabla 28**, se observa que con los flavonoles se obtuvo una menor CI_{50}, tanto para el ensayo del DPPH y del ABTS respecto a fenoles totales y flavonoides. Es decir, los flavonoles tuvieron una mejor eficiencia en secuestrar a estos radicales libre. Sin embargo, el coeficiente de correlación, muestra que los fenoles totales evidenciaron una mayor afinidad en secuestrar ambos radicales libres, mientras que, en el caso del ensayo

FRAP los flavonoides tuvieron mayor afinidad que flavonoles y fenoles totales, quienes tienen una afinidad semejante. Como, se ha precisado más arriba, los fenoles totales están constituidos por flavonoides y ácidos fenólicos, éstos últimos han demostrado tener gran capacidad antioxidante, sobre todo los derivados del ácido cinámico, tal como Ruwizhi et al. [130], han descrito anteriormente, incluso superiores a los derivados del ácido benzoico [131].

Se han reportado ensayos de antioxidantes para los compuestos individuales que se han descrito en la **Tabla 21**. Para la isorhamnetina libre se reportan actividades frente al DPPH, ABTS, radical hidroxilo, radical superóxido, inhibición de la xantina oxidasa, quelación y reducción del hierro superior al kaempferol pero inferior a la quercetina [72]. Por otro lado, la isorhamnetina además de demostrar su actividad *in vitro* frente al DPPH y ABTS, también inhibió la peroxidación lipídica en mitocondrias hepáticas, así mismo, su derivado 3 – glucosilado también demostró tener actividad secuestradora del radical DPPH y disminuyó la formación de ROS a nivel intracelular [132]. Siringetin – 3 – rutinósido ha demostrado su actividad antioxidante frente al radical DPPH y O_2^-; y de inhibir la lipoperoxidación, sin embargo, su actividad no fue tan relevante frente a otros compuestos, tales como la miricetina y el ácido cafeico [133]. El ácido clorogénico y sus ésteres son antioxidantes ampliamente conocidos por su capacidad de inhibir la lipoperoxidación secuestrando radicales libres en la fase lipídica y quelando metales en la fase acuosa [134], también se ha demostrado en ensayos *in vivo* e *in vitro*, que el ácido cafeico, un metabolito producto de la hidrólisis del ácido clorogénico tiene mayor actividad antioxidante [135] y asimismo, se ha demostrado que los ácidos 3 – clorogénico, 4 – clorogénico y 5 – clorogénico, que son isómeros, tienen la misma capacidad en los ensayos de antioxidantes de DPPH, ABTS y FRAP [136]. El ácido 3 – O – feruloilquínico demostró tener actividad antioxidante en los ensayos frente a DPPH, ABTS e hidroxilo (OH^-) y FRAP; y en todos los casos fue superior su actividad frente a sus isómeros ácidos 4 – O – feruloilquínico y 5 – O – feruloilquínico; y también del ácido 3 – O – cumaroilquínico [137]. Siringetin – 3 – O – glucósido ha evidenciado una baja actividad frente a DPPH y ABTS [138]. No existen reportes de capacidad antioxidante de la ombuin – 3 rutinósido, pero se ha reportado que la ombuina libre tiene una actividad débil ante el radical DPPH [139,140] y del radical hidroxilo, pero inferior a kaemperol y quercetina [141]. Tampoco existen reportes de la capacidad antioxidante de la jaceidin 7- neohesperidosa, pero si para jaceidina libre que demostró poseer una modesta actividad frente al radical

DPPH, pero debajo de quercetina [142]. La iridina demostró tener una moderada actividad sobre el DPPH, inferior a la 8 – hidroxiridina[143]. Los ácidos cimicifúgico A y G; y el ácido 2 – feruloilpiscídico han demostrado tener capacidad de secuestrar el radical DPPH [106,116,144], asimismo, tienen una actividad superior a los ácidos cafeico y ferúlico por contener un grupo catecol adicional, pero inferior al ácido gálico [145].

Sin embargo, Xia et al. [146] han demostrado que la glicosilación en posición 3 de los flavonoles podría afectar su capacidad en relación con su aglicón libre en los ensayos de antioxidantes de DPPH y ABTS, mientras que, una 7 - glicosilación no se ve afectada y muestran la misma actividad que sus agliconas. La 3 - glicosilación disminuye la actividad antioxidante en ambos ensayos para kaempferol e isorhamnetina, mientras que, la 3 – glicosilación de la quercetina solamente disminuye su actividad en el ensayo de ABTS y frente al DPPH se incrementa su actividad en relación con la quercetina libre. Utilizando un análisis de LC – MS/MS se ha hallado que la quercetina y su 7 – glucósido experimentan una dimerización durante la reacción antioxidante, potencialmente conduciendo a una declinación en su actividad, sin embargo, esto no ocurre con la quercetin – 3 – glucósido, porque se impide la formación de dímeros conservando su competencia de secuestrar radicales libres.

En la **Tabla 29**, se observa la correlación entre los compuestos fenólicos y los ensayos de su capacidad antioxidante. En el cual, se resalta que los fenoles totales, flavonoides y flavonoles poseen una correlación muy significativa frente a las pruebas de DPPH, ABTS y FRAP. Los flavonoides y los flavonoles tienen la misma correlación frente a los fenoles totales (r = 0,989), corroborando que tanto los flavonoides y flavonoles son un tipo de compuesto fenólico, mientras que, entre flavonoides y flavonoles también tienen una correlación muy alta (r = 0,986), debido a que, los flavonoles son el principal subgrupo de flavonoides presentes en dicho extracto, como ya se ha descrito anteriormente. Los fenoles totales tienen una mejor correlación con el ensayo de poder reductor del FRAP (r = 0,994), en relación a los ensayos de secuestramiento de radicales libres del DPPH (r = 0,983) y ABTS (r = 0,990), respectivamente. De igual manera, los flavonoides tienen una buena correlación con el ensayo de poder reductor del FRAP (r = 0,996), superior a los ensayos de secuestramiento de radicales libres del DPPH (r = 0,975) y ABTS (r = 0,983), respectivamente. Finalmente, se repite esta tendencia con los flavonoles, con una correlación alta con el ensayo de poder reductor del FRAP (r = 0,993), seguido de los ensayos de secuestramiento del radicales libre del DPPH (r = 0,980) y ABTS (r = 0,987),

respectivamente. Asimismo, los resultados muestran que existe afinidad entre las pruebas de DPPH y ABTS (r = 0,972); y entre ABTS y FRAP (r = 0,924), respectivamente.

Por consiguiente, se puede afirmar que el extracto hidroalcohólico de hojas de *S. rufescens* DC, posee compuestos fenólicos que evidencian gran capacidad antioxidante, el cual, se refleja en una correlación que se aproxima a 1. En consecuencia, en esta investigación se confirma la hipótesis, qué los compuestos fenólicos presentes como fenoles totales, flavonoides y flavonoles se correlacionan positivamente con su capacidad antioxidante. En *Senecio clivicolus* Wedd, se ha evidenciado que los fenoles totales se correlacionan con el secuestramiento del DPPH (r = 0,98) y ABTS (r = 0,98); y del FRAP (r = 0,99), respectivamente [3]. Sus resultados fueron ligeramente superiores a lo reportado en la presente investigación, pero se mantiene la tendencia de una mayor correlación con el ensayo FRAP. Aquí también, se ratifica que los compuestos fenólicos son los compuestos mayoritariamente involucrados en la actividad antioxidante. En la literatura se reportan muchos casos de correlación entre fenoles totales y capacidad antioxidante. Li et al., reportan que los fenoles totales contenidos en raíz de *Angelicae sinensis* (Oliv.) Diels, tuvieron una correlación positiva con su actividad antioxidante en el rango de 0,642 a 0,941, con un valor promedio de 0,839, comprobando que los efectos antioxidantes en general, pueden considerarse como resultado de los fenoles presentes, especialmente de los ácidos cafeico y ferúlico [147]. Piluzza y Bullita, evaluaron la correlación entre fenoles totales y flavonoides con los ensayos de DPPH y ABTS de 24 plantas utilizadas tradicionalmente en etnoveterinaria, en la cual, los coeficientes de correlación para fenoles totales fueron para DPPH (r^2 = 0,9152) y ABTS (r^2 = 0,8896), mientras que, para flavonoides con DPPH (r^2 = 0,157) y ABTS (r^2 = 0,212), respectivamente; es decir, en este caso los flavonoides tuvieron una baja afinidad con los dos radicales libres en relación con los fenoles totales con quienes tuvieron una alta afinidad [148]. Turumtay et al. [149], estudiaron la correlación entre fenoles totales presentes en hojas de *Thymus praecox* Opix subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, y su actividad antioxidante, en el cual, identificaron a la quercetina y ácido cafeico como sus compuestos principales, de modo tal que, hallaron una correlación con el ensayo de DPPH para fenoles totales (r^2 = - 0,87) y flavonoides (r^2 = - 0,81). Aryal et al. [150], realizaron también un estudio similar con especies vegetales silvestres del Nepal Occidental, en el cual hallaron una fuerte correlación con el ensayo de DPPH para fenoles totales (r^2 = 0,75) y los flavonoides (r^2 = 0,84), respectivamente; concluyendo que dichas especies vegetales podrían constituir

una potencial fuente de antioxidantes naturales. Finalmente, también Osman et al. [151], evaluaron la correlación entre fenoles totales y poder antioxidante, en el cual, la correlación entre los métodos de DPPH y ABTS (r^2 = 0,79), demostraron que estos ensayos se apoyaban entre sí, como una forma de demostrar la actividad antioxidante, asimismo, entre la actividad antioxidante (IC_{50}) y el contenido de fenoles totales, resultando en una fuerte correlación negativa para DPPH (r^2 = - 0,78) y ABTS (r^2 = - 0,86), respectivamente. De esta forma, se evidenció una vez más, la existencia de una correlación significativa de fenoles totales y flavonoides; y su actividad antioxidante.

La **Figura 8**, en principio muestra que el porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos de los compuestos fenólicos (**Anexo 38**), a las concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 mg/mL; y de los controles dexametasona y diclofenaco, existe una ligera variabilidad de los datos obtenidos para cada uno de ellos, pero no muestran ningún dato atípico, por tanto, todos los datos siguen una distribución aproximadamente normal (**Anexo 39**). Esto permite realizar la prueba de hipótesis de diferencias de medias mediante el ANOVA, el cual resultó significativa ($p < 0,05$), demostrando que existen diferencias entre ellas (**Anexo 40**) y con la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé (**Anexo 41**), se evidenció que con 1 mg/mL de compuestos fenólicos se logró un 46,57% de inhibición de la hemólisis de los glóbulos rojos, mientras que, con la concentración de 5 mg/mL se alcanzó un 87,79% de inhibición de la hemólisis de los glóbulos rojos, superior a la dexametasona (56,81%) cuyo mecanismo antinflamatorio es mediante la unión con el receptor glucocorticoide e inhibición de la transcripción de varias citocinas y quimiocinas pro – inflamatorias y moléculas de adhesión [152] y del diclofenaco (67,43%) inhibir la enzima ciclooxigenasa [15], por tanto, se puede afirmar que los resultados obtenidos se asemejan a los antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

En la **Tabla 30**, se muestra la existencia de correlación con el porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos, siendo para fenoles totales (r = 0,980), flavonoides (r = 0,980) y flavonoles (r = 0,980), respectivamente. Esto implica, que los compuestos fenólicos expresados como fenoles totales, flavonoides y flavonoles, tienen una fuerte asociación (98,0%) en inhibir la hemólisis. Se observa que los valores de correlación son los mismos, por tanto, se puede asumir que los fenoles totales, que incluyen a los flavonoides y flavonoles, tienen la misma potencia inhibitoria de la hemólisis, no existiendo diferencias entre flavonoides o flavonoles, como se observó en la evaluación

de la capacidad antioxidante. En consecuencia, han demostrado tener la capacidad de mantener la estabilidad de la membrana y, por ende, tener actividad antiinflamatoria.

El test de estabilización de membrana de los eritrocitos es una herramienta muy popular para investigar el potencial antiinflamatorio de un extracto vegetal o de un metabolito secundario aislado, en el cual, los eritrocitos son expuestos a medios hipotónicos, calor, salicilato de metilo, fenilhidrazina, etc., produciendo lisis de sus membranas, dando como resultado la fuga de proteínas séricas y fluidos en los tejidos que promueven la inflamación, de tal forma, que los compuestos capaces de estabilizar la membrana podrían ser promisorios agentes antinflamatorios [153]. Asimismo, existen estudios que afirman que los flavonoides metoxilados, como es el caso de los flavonoides identificados en nuestro estudio, tienen una superior estabilidad metabólica, biodisponibilidad y actividad biológica que los flavonoides no metoxilados [138]. Por otro lado, se ha demostrado que los diferentes subgrupos de flavonoides hidrofóbicos son efectivos en proteger a los lípidos de membranas frente a oxidantes hidrosolubles, sin embargo, existen diferencias con los oxidantes liposolubles, en este caso, los flavonoides hidrosolubles podrían establecer enlaces de hidrógeno con el extremo polar de los fosfolípidos en la interface lípido – agua de las membranas, de esa manera, podrían proporcionar un nivel de protección en la bicapa lipídica de las membranas, frente a los agresores internos y externos de la membrana [154,155]. En nuestra investigación, como ya se ha mencionado anteriormente, prevalecen los flavonoides metoxilados, que son considerados como hidrofóbicos.

Como no existen reportes en el género *Senecio* de ensayos de actividad antiinflamatoria *in vitro*, no se pueden hacer comparaciones al respecto. Sin embargo, se han realizado estudios *in vivo*. Como anteriormente se mencionó se ha demostrado que las partes aéreas de *Senecio salignus* Kunth tienen actividad antiinflamatoria en ratones, pero en este caso, se atribuyó dicha actividad a derivados de ácidos grasos saturados e insaturados presentes en el extracto clorofórmico [22]. Por otro lado, también existen reportes que derivados del ácido cinámico como los ácidos *p* – cumarico y cafeico; y los flavonoides como rutina, hesperidina, naringenina, apigenina y kaenpferol tienen actividad antiinflamatoria, inhibiendo los mediadores de la inflamación principalmente el factor nuclear κB (NF – κB), quienes actúan inhibiendo a la proteína óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [156]. Esto ha sido corroborado en un estudio con flores de *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less., utilizando el modelo de inflamación inducido por carragenina en la cavidad pleural, en la

cual una mezcla de ácidos dicafeoilquínicos (derivados del ácido cinámico) lograron inhibir al NF – κB [44]. Por otro lado, en ensayos *in vitro* de actividad antinflamatoria utilizando líneas celulares de macrófagos a los cuales se les indujo una respuesta inflamatoria con lipolisacárido de origen bacteriano (LPS), se demostró que el ácido cinámico y su derivado el ácido *p* – cumárico, tenían la capacidad de inhibir la producción del óxido nítrico [157]. Se ha descrito que ácidos fenólicos y flavonoides presentes en la miel producida por *Melipona beechi* podrían ser parcialmente responsables de la actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro*, este último utilizando los modelos de desnaturalización térmica de albúmina, estabilización de membrana de glóbulos rojos e inhibición a las proteinasas [158].

Se ha evidenciado que la isorhamnetina – 3 - rutinósido tiene la capacidad de reducir la activación de la iNOS y por ende la liberación de óxido nítrico (NO), que es un mediador de la inflamación; y que esta capacidad estaría mediada por la inhibición del NF – κB [132], asimismo, entre los requerimientos estructurales para esta actividad serían un doble enlace en $C_2 – C_3$, un sustituyente voluminoso en C_3 (por ejemplo, un azúcar como la rutinosa) y un grupo hidroxilo en C_3 [159]. La siringetina, químicamente relacionado con la isorhamnetina porque tiene un *O* – metilo adicional en su estructura, muestra un amplio rango de propiedades biológicas, entre las cuales además de ser antiinflamatoria por su capacidad de incrementar las citoquinas y los mediadores pro - inflamatorios, es antioxidante, anticancerígena, antidiabética, asimismo, protege contra las enfermedades degenerativas como el Parkinson y Alzheimer [138].

En la **Tabla 31**, se observa que los compuestos fenólicos muestran una CL_{50} de 123,58 µg/mL, el cual, según los niveles de toxicidad descrito anteriormente [71], serían moderamente tóxicos. Asimismo, se evidencia que existe una correlación directa entre el porcentaje de mortalidad y la concentración de compuestos fenólicos ensayados (r^2 = 0,993). Los estudios de toxicidad de extractos vegetales o de sus compuestos químicos aislados, tienen como objetivo garantizar un tratamiento seguro, a pesar que son considerados de bajo riesgo, sus riesgos potenciales deben evaluarse cuidadosamente, debido a que varios factores pueden ser causantes de toxicidad: componentes vegetales o metabolitos con potencial tóxico, adulteración, contaminantes ambientales (metales pesados, pesticidas) o contaminación por microorganismos (hongos toxigénicos) [160]. Meyer et al., señalan que, en la evaluación de la bioactividad de extractos vegetales por el bioensayo del camarón salino, un valor de $CL_{50} < 1000$ µg/mL se considera como

citotóxico [161]. Se han reportado estudios de toxicidad frente a la *Artemia salina* en varias especies del género *Senecio*. Se evaluaron los extractos acuosos en forma de infusión y cocimiento de hojas en tres especies de este género, en el cual, la infusión y cocimiento de hojas de *S. nutans* Sch.Bip., exhibieron una baja toxicidad, presentando una CL_{50} de 451,3 µg/mL y 437,1 µg/mL, respectivamente; mientras que, el cocimiento de *S. viridis* Phil. var. *viridis* exhibió una muy baja toxicidad (CL_{50} = 833,6 µg/mL, y la infusión no mostró ninguna toxicidad (CL_{50} > 1000 µg/mL) y, finalmente, los extractos acuosos de *S. spegazinii* Cabrera no mostraron ninguna toxicidad [71]. Asimismo, los extractos etanólicos de las partes aéreas de *S. westermanii* Dusen y de las fracciones *n* – hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y la hidroalcohólica restante, no presentaron toxicidad porque se obtuvieron una CL_{50} superior a 1000 µg/mL para todas las muestras analizadas [162]; de modo similar, el extracto metanólico de hojas de *S. jacobaea* [163], los extractos clorofórmicos y metanólicos de hojas de *S. leucostachys* Baker quienes tuvieron una CL_{50} > 1000 µg/mL[164]. Sin embargo, también existen reportes que extractos clorofórmicos y metanólicos de hojas y flores de *S. santelisis* Phil., tuvieron una alta toxicidad con una CL_{50} = 49,0 µg/mL y 1,0 µg/mL, respectivamente; de la misma forma, los extractos clorofórmicos y metanólicos de hojas y flores de *S. puchii* Phil., también tuvieron una moderada toxicidad con una CL_{50} = 109,0 µg/mL y 202,0 µg/mL, respectivamente [164]. Asimismo, un extracto liofilizado obtenido de hojas de *S. formosus* Kunth mostró una CL_{50} < 100 µg/mL, atribuyéndose en este caso la toxicidad a los alcaloides pirrolizidínicos que están presentes en la mayoría de especies de este género [165]; el mismo que fue corroborado en un ensayo con alcaloides aislados de las partes aéreas de *S. vernalis* Waldst. & Kit., el cual mostró una CL_{50} de 131,22 µg/mL, dicha toxicidad se explica porque los nauplios de *Artemia salina* poseen la enzima citocromo P450, el cual transforma a los alcaloides pirrolizidínicos en derivados pirrólicos altamente tóxicos [166]. En una investigación realizada para determinar la toxicidad de plantas medicinales en el norte del Perú, estudiaron entre otras especies a *S. canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec., y otras cinco especies de *Senecio* a las cuales solamente las consignaron como *Senecio sp.*, evaluando la toxicidad de sus extractos acuosos y etanólicos con el modelo de *Artemia salina* reportando que los extractos acuosos tenían una CL_{50} > 1000 µg/mL, mientras que, los extractos etanólicos tenían una CL_{50} < 1000 µg/mL, categorizados entre extremadamente tóxicos y moderadamente tóxicos, concluyendo que la toxicidad está influenciada por el tipo de extracto, época y lugar de colecta o la parte de la planta

utilizada, sobre todo porque el uso tradicional tiende a utilizar agua como solvente de extracción [167]. También, se han reportado ensayos frente a *Artemia salina* de flavonoides aislados de la raíz de *Lonchocarpus montanus* AMG Azevedo identificados como pongamol, *E* – 7 – *O* – metoxipongamol y derriobtusona A (furanochalconas); y lanceolatina B (furanoflavona), los cuales demostraron ser extremadamente tóxicos con $CL_{50} < 10$ µg/mL[168]. Asimismo, dos flavonas metoxiladas aisladas de las partes aéreas de *Satureja atropatana* Bonge tuvieron un efecto moderadamente tóxico, mientras que, la luteolina 7 – *O* – glucósido, que es un flavonol tuvo un efecto extremadamente tóxico, concluyendo que la metoxilación de los flavonoides podrían reducir el efecto citotóxico frente a la *Artemia salina* [169].

En consecuencia, podemos afirmar que los compuestos fenólicos, tienen una moderada toxicidad debido primero a la ausencia de alcaloides pirrolizidínicos en dicho extracto debido a que éstos son los compuestos altamente tóxicos en las especies de este género y, por otro lado, porque los flavonoides están metoxilados, una condición química que las hace que se reduzcan sus efectos tóxicos.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos fueron identificados como nueve flavonoides glicosilados, de los cuales, ocho son flavonoles (isorhamnetin 3 – *O* – rutinósido, siringetin 3 – *O* – rutinósido, ranupenin 3 – *O* – rhamnopiranósido, 8 – *O* – glucopiranósido, isorhamnetin 3 – *O* - [glucopiranosil – (1 →2) – rhamnopiranósido], siringetin 3 – *O* – glucósido, ombuin 3 – *O* – rutinósido, jaceidin 7 – neohesperidosa y ombuin 3 – *O* – glucósido) y una isoflavona (iridina); y seis ácidos fenólicos, de los cuales, uno es derivado del ácido málico (ácido eucómico) y cinco derivados del ácido cinámico (ácido clorogénico, ácido 3 – feruoilquínico, ácido cimifúgico A, ácido 2 . feruloilpiscidico y ácido cimicifúgico G).
2. Se demostró la correlación entre la capacidad antioxidante *in vitro* y los compuestos fenólicos expresados como fenoles totales (DPPH, $r = 0,983$; ABTS, $r = 0,990$; FRAP, $r = 0,994$), flavonoides (DPPH, $r = 0,975$; ABTS, $r = 0,983$; FRAP, $r = 0,996$) y flavonoles (DPPH, $r = 0,980$; ABTS, $r = 0,987$; FRAP, $r = 0,993$), respectivamente.
3. Se evidenció una correlación entre actividad antiinflamatoria *in vitro* del modelo de estabilización de la membrana y los compuestos fenólicos expresados como fenoles totales ($r = 0,980$), flavonoides ($r = 0,980$) y flavonoles ($r = 0,980$), respectivamente.
4. Los compuestos fenólicos tuvieron una moderada toxicidad en el ensayo de *Artemia salina* ($CL_{50} = 123,58$ µg/mL) y existió una correlación directa ($r = 0,993$).

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grace SC. Phenolic as antioxidants. In: Smirnoff N, editor. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. India: Blackwell Publishing; 2005. page 141–68.

2. Pietrellini F. Las Plantas Medicinales en un piso alto y mesoandino. Estudio etnobotánico en la zona de Puquio (Ayacucho). Huamanga - Perú: Graficenter Perú EIRL; 2007.

3. Faraone I, Rai DK, Chiummiento L, Fernandez E, Choudhary A, Prinzo F, et al. Antioxidant activity and phytochemical characterization of *Senecio clivicolus* Wedd. Molecules 2018;23(10):1–17.

4. Alqahtani AS, Herqash RN, Noman OM, Nasr FA, Alyhya N, Anazi SH, et al. *In vitro* antioxidant, cytotoxic activities, and phenolic profile of *Senecio glaucus* from Saudi Arabia. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2020;9.

5. Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. J Agric Food Chem 2009;57(5):1768–74.

6. Hammoda H, Kassem F, Radwan M, Darwish R, Habib AA. Phytochemical Investigation of *Senecio vulgaris* L. Growing in Egypt. Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences 2018;1(2):7–12.

7. Rehab M.S. Ashour, Abeer M. El Sayed, Mohamed F. Elyamany DR abou H. Chemical Profile and Biological Activities of the Aerial Parts of *Senecio acaulis* (L.f.) Sch.Bip. Pharmacognosy Res [Internet] 2018;10(2, April-June):130–6. Available from: http://www.phcogres.com

8. Hassan W, Al-youssef H, Al-Gendy A, El-Shazely A. Chemical Constituents and Biological Activities of *Senecio aegyptius* var. *discoideus* Boiss. Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences 2012;67(3–4):144–50.

9. Tan D peng, Chou G xin, Wang Z tao. Phenolic compounds from *Senecio scandens*. Biochem Syst Ecol 2010;38(1):122–4.

10. Biswas S, Das R, Ray Banerjee E. Role of free radicals in human inflammatory diseases. AIMS Biophys 2017;4(4):596–614.

11. Rainsford KD. Anti-Inflammatory Drugs in the 21st Century. In: Randall E. Harris, editor. Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases. The COX - 2 Controversy. 2007. page 3–27.

12. Morton D. The Importance of Nonstatistical Experimental Design in Refining Animal Experiments for Scientists, IACUCs, and Other Ethical Review Panels. In: Gluck J, DiPasquale T, Orlans B, editors. Applied Ethics In Animal Research. West Lafayette, Indiana: Purdue University Press; 2002.

13. Logarto Parra A., Silva Yhebra R., Guerra Sardiñas I., Iglesias Buela L. Comparative study of the assay of and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomedicine 2001;8(5):395–400.

14. Biswas S, Das R, Ray Banerjee E. Role of free radicals in human inflammatory diseases. AIMS Biophys 2017;4(4):596–614.

15. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. Biochem Pharmacol 2020;180:114147.

16. Albayrak S, Aksoy A, Yurtseven L, Yaşar A. A comparative study on phenolic components and biological activity of some *Senecio* species in Turkey. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2014;66(11):1631–40.

17. Albayrak S, Aksoy A, Yurtseven L, Yaşar A. A Comparative Study on Antioxidant and Antibacterial Activities of Four Senecio Species From Turkey. International Journal of Secondary Metabolite 2016;2(2):26–36.

18. Lahlou F, Hmimid F, Loutfi M, Bourhim N. Antioxidant Activity Phenolics Flavonoids and Proanthocyanidins Content of *Senecio anteuphorbium*. Int J Biochem Res Rev 2014;4(6):550–8.

19. Chirinos R, Pedreschi R, Rogez H, Larondelle Y, Campos D. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. Ind Crops Prod [Internet] 2013;47:145–52. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.025

20. Alvarado B, Reyes A, Castillo J, Maldonado M. Evaluación del efecto antiinflamatorio de *Senecio confusus* [Internet]. In: Ramos M, Aguilera V, editors. Congreso Interdisciplinario de Cuerpos Académico. Valle de Santiago, Guanajato: ECORFAN - MÉXICO; 2014. page 163–70.Available from: www.ecorfan.org

21. Mfengwana Polo-Ma-Abiele H, Mashele Samson S, Manduna Idah T. *In vitro* Antibacterial, Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Senecio asperulus* and *Gunnera perpensa* from Mohale's Hoek, Lesotho. Pharmacognosy Journal 2019;11(4):730–9.

22. Pérez González C, Serrano Vega R, González-Chávez M, Zavala Sánchez MA, Pérez Gutiérrez S. Anti-Inflammatory Activity and Composition of *Senecio salignus* Kunth. Biomed Res Int 2013;2013:1–4.

23. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 2007;39(1):44–84.

24. Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. Medicinal prospects of antioxidants: A review. Eur J Med Chem 2019;178:687–704.

25. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem 2005;53(6):1841–56.

26. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standarized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolic in Foods and Dietary Supplements. J Agric Food Chem 2005;53:4290–302.

27. Sarma JC. Naturally ocurring polyphenols and their utility. In: Baruah JB, editor. Chemistry of Phenolic Compounds: State of the Art. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2011. page 19–29.

28. Lattanzio V. Phenolics Compound: Introduction. In: Ramawat KG, Mérillon JM, editors. Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Heidelberg: Springer - Verlag; 2013. page 1543–80.

29. Das S, Bhattacharya SS. Environmental Stress and Stress Biology in Plants. In: Siddiqui MW, Bansal V, editors. Plant Secondary Metabolites: Their Role in Stress Ecophysiology. Apple Academic Press; 2017. page 10–258.

30. Markhan Ken, Mabry Tom. Ultraviolet - Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. In: The Flavonoids. Springer US; 1975. page 45–77.

31. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific World Journal [Internet] 2013;16. Available from: https://doi.org/10.1155/2013/162750

32. Kyselova Z. Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. Interdiscip Toxicol 2011;4(4):173–83.

33. Wang D, Huang L, Chen S. *Senecio scandens* Buch.-Ham.: A review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and toxicity. J Ethnopharmacol [Internet] 2013;149(1):1–23. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.048

34. Yang Y, Zhao L, Wang YF, Chang ML, Huo CH, Gu YC, et al. Chemical and pharmacological research on the plants from Genus *Senecio*. Chem Biodivers 2011;8(1):13–72.

35. Ma HY, Wang CH, Yang L, Zhang M, Wang ZT. Chemical Constituents of *Senecio cannabifolius* var.*integrilifolius*. Chin J Nat Med [Internet] 2009;7(1):28–30.

36. Shaza M. Phytochemical and Biological Study of *Senecio glaucus* subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander Growing in Egypt. J Pharm Sci 2015;52:283–98.

37. Lienou LL, Telefo PB, Rodrigues GQ, Donfack JN, Araújo RA, Bruno JB, et al. Effect of different extracts and fractions of *Senecio biafrae* (Oliv. &Hiern) J. Moore on *in vivo* and *in vitro* parameters of folliculogenesis in experimental animals. J Ethnopharmacol [Internet] 2020;251(January):112571. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112571

38. Ren H, Yu C, Yang Q, Chen H, Chen G. Chemical Constituents of *Senecio obtusatus*. Chem Nat Compd 2013;49(4):753–4.

39. He ZM, Zong Y, Sun JM, Xiao FY. Isolation and Identification of Several Flavonoids and Phenolic Acids from *Senecio scandens* Buch.-Ham. Chinese Journal of Applied Chemistry 2010;27(12):1486–8.

40. Yang X, Yang L, Xiong A, Li D, Wang Z. Authentication of *Senecio scandens* and *S. vulgaris* based on the comprehensive secondary metabolic patterns gained by UPLC-DAD/ESI-MS. J Pharm Biomed Anal [Internet] 2011;56(2):165–72. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2011.05.004

41. Odubanjo VO, Oboh G, Oyeleye SI, Adefegha SA. Anticholinesterase activity and phenolic profile of two medicinal plants (*Quassia undulata* and *Senecio abyssinicus*) used in managing cognitive dysfunction in Nigeria. J Food Biochem 2018;42(4):1–7.

42. Tundis R, Lozzo M, Statti G, Deguin B, Amissah R, Houghton P, et al. Chemical Composition and Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme by *Senecio samnitum* Huet. Pharm Biol 2005;43(7):605–8.

43. Arciniegas A, Pérez-castorena AL, Villaseñor L, Vivar R De. Chemical Constituents of *Senecio procumbens*. J Mex Chem Soc 2005;49(3):284–6.

44. de Souza RR, Bretanha LC, Dalmarco EM, Pizzolatti MG, Fröde TS. Modulatory effect of *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less. in a murine model of inflammation induced by carrageenan into the pleural cavity. J Ethnopharmacol 2015;168:373–9.

45. Mandić B, Godevac D, Vujisić L, Trifunović S, Tesević V, Vajs V, et al. Semiquinol and phenol compounds from seven *Senecios* species. Chemical Papers 2011;65(1):90–2.

46. Ruiz-Vásquez L, Reina M, López-Rodríguez M, Giménez C, Cabrera R, Cuadra P, et al. Sesquiterpenes, flavonoids, shikimic acid derivatives and pyrrolizidine alkaloids from *Senecio kingii* Hook. Phytochemistry 2015;117:245–53.

47. Urzúa A, Andrade L, Mendoza L, Bustos F. Comparative leaf surface chemistry from *Senecio cerberoanus* and *Senecio viscosissimus*. Biochem Syst Ecol 2000;28(4):399–401.

48. Zhong-Mei H, Ying1 Z, Jia-Ming S, Feng-Yan X, Zhong-Mei1 H, Ying Z, et al. Isolation and Identification of Several Flavonoids and Phenolic acids from *Senecio scandens* Buch.-Ham. Chinese Journal of Applied Chemistry [Internet] 2010 [cited 2020 Jul 23];27(12):1486–8.

49. Suleimenov EM, Jose RA, Rakhmadieva SB, De Borggraeve W, Dehaen W. Flavonoids from *Senecio viscosus*. Chem Nat Compd 2009;45(5):731–2.

50. Bohlmann F, Kramp W, Robinson H, Kings RM. A Norsesquiterpene From *Senecio humillimus*. Phytochemistry 1981;20(7):1739–40.

51. Parra C, Soto E, León G, Salas CO, Heinrich M, Echiburú-Chau C. Nutritional composition, antioxidant activity and isolation of scopoletin from *Senecio nutans* : support of ancestral and new uses. Nat Prod Res [Internet] 2018;32(6):719–22. Available from: http://doi.org/10.1080/14786419.2017.1335726

52. Beltrán H, Roque J. El género *Senecio* L. (Asteraceae-Senecioneae) en el departamento de Lima, Perú. Arnaldoa 2015;22(2):395–412.

53. Aguilar Felices EJ, Bonilla Rivera PE, Enciso Roca ER. Capacidad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de *Senecio rufescens* DC. Revista de la Sociedad Química del Perú 2021;86(4):374–85.

54. Restrepo L, González J. De Pearson a Spearman. Rev Col Cienc Pec [Internet] 2007;20:183–92.

55. Fina BL, Lombarte M, Rigalli A. Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios *in vivo*, *in vitro* o *in silico*? Actualizaciones en Osteologia 2013;9(3):294–9.

56. Cai L. Thin Layer Chromatography. In: Current Protocols Essential Laboratory Techniques. John Wiley & Sons, Inc.; 2014.

57. Kondeti RR, Mulpuri KS, Meruga B. Advancements in column chromatography: A review. World Journal of Pharmaceutical Sciences 2014;2(10):1375–83.

58. Taleuzzaman M, Ali S, Gilani S, Imam S, Hafeez A. Ultra performance liquid chromatography (UPLC): A Review. Austin J Anal Pharm Chem [Internet] 2015;2(6):1056. Available from: https://austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/fulltext/ajapc-v2-id1056.php

59. Rathod RH, Chaudhari SR, Patil AS, Shirkhedkar AA. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. Futur J Pharm Sci 2019;5(1).

60. Urban PL. Quantitative mass spectrometry: an overview. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 2016;374(2079):20150382.

61. Hernández - Siampetri R, Mendoza C. Metodología de la Investigación: Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. México: Mc Graw Hill Education; 2018.

62. Naviglio D, Scarano P, Ciaravolo M, Gallo M. Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques. Foods [Internet] 2019;8(245):1–22. Available from: http://www.mdpi.com/journal/foods

63. Miranda M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos [Internet]. 2002 [cited 2022 Oct 6];16–23. Available from: https://fdocuments.es/document/metodos-de-analisis-de-drogas-y-extractos-de-dra-migdalia-miranda-martinez.html?page=1

64. Bajpai VK, Majumder R, Park JG. Isolation and purification of plant secondary metabolites using column-chromatographic technique. Bangladesh J Pharmacol 2016;11:844–8.

65. Wagner H, Bladt S. Plan Drug Analysis. 2da. Ed. Berlin: Springer - Verlag; 1996.

66. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis 2006;19(6–7):669–75.

67. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 1999;64:555–9.

68. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem 2004;85(2):231–7.

69. Shinde UA, Phadke AS, Nair AM, Mungantiwar AA, Dikshit VJ, Saraf MN. Membrane stabilizing activity - A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. Fitoterapia 1999;70(3):251–7.

70. Pino Pérez O, Jorge Lazo F. *Artemia* Bioassay: Useful Working Tool for Ecotoxicologists and Chemists of Natural Products. Rev Prot Veg 2010;25(1):34–43.

71. Lizarraga E, Castro F, Fernández F, De Lampasona MP, Catalán CAN. Antioxidant, hemolytic and cytotoxic activities of Senecio species used in traditional medicine of northwestern Argentina. Nat Prod Commun 2012;7(5):607–8.

72. Arimboor R, Arumughan C. HPLC-DAD-MS/MS profiling of antioxidant flavonoid glycosides in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Seeds. Int J Food Sci Nutr 2012;63(6):730–8.

73. Pianoski KE, Turco JF, Soares KCN, Mokochinski JB, Caetano IK, Da Silva FR, et al. Identification and characterization of bauhinia species by spectroscopic and spectrometric fingerprints identification and characterization of bauhinia species by spectroscopic and spectrometric fingerprints. Revista Virtual de Quimica 2020;12(5):1222–35.

74. Ghareeb MA, Sobeh M, Rezq S, El-Shazly AM, Mahmoud MF, Wink M. HPLC-ESI-MS/MS Profiling of Polyphenolics of a Leaf Extract from *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) and Its Anti-Inflammatory, Anti-Nociceptive, and Antipyretic Activities In Vivo. Molecules [Internet] 2018;23:2328. Available from: www.mdpi.com/journal/molecules

75. Brito A, Ramirez JE, Areche C, Sepúlveda B, Simirgiotis MJ. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. Molecules 2014;19(11):17400–21.

76. Rini Vijayan KP, Raghu A V. Tentative characterization of phenolic compounds in three species of the genus Embelia by liquid chromatography coupled with mass spectrometry analysis. Spectroscopy Letters 2019;52(10):653–70.

77. Chen Y, Yu H, Wu H, Pan Y, Wang K, Jin Y, et al. Characterization and quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in Pollen typhae for transformation rule exploration. Molecules 2015;20(10):18352–66.

78. Schieber A, Keller P, Streker P, Klaiber I, Carle R. Detection of Isorhamnetin Glycosides in Extracts of Apples (*Malus domestica* cv. "Brettacher") by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS. Phytochemical Analysis [Internet] 2002;13:87–94.

79. Gutzeit D, Wray V, Winterhalter P, Jerz G. Preparative isolation and purification of flavonoids and protocatechuic acid from sea buckthorn juice concentrate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. rhamnoides) by high-speed counter-current chromatography. Chromatographia 2007;65(1–2):1–7.

80. Okada M, Park S, Koshizawa T, Ueda M. (R)-Eucomic acid, a leaf-opening factor of the model organism, *Lotus japonicus*. Tetrahedron 2009;65(10):2136–41.

81. Mun'im A, Negishi O, Ozawa T. Antioxidative compounds from *Crotalari sessiliflora*. Biosci Biotechnol Biochem 2003;67(2):410–4.

82. Aremu AO, Masondo NA, Rengasamy KRR, Amoo SO, Gruz J, Bíba O, et al. Physiological role of phenolic biostimulants isolated from brown seaweed *Ecklonia maxima* on plant growth and development. Planta 2015;241(6):1313–24.

83. Llorach R, Favari C, Alonso D, Garcia-Aloy M, Andres-Lacueva C, Urpi-Sarda M. Comparative metabolite fingerprinting of legumes using LC-MS-based untargeted metabolomics. Food Research International 2019;126.

84. Chahdoura H, Barreira JCM, Barros L, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR, Achour L. Phytochemical characterization and antioxidant activity of the cladodes of *Opuntia macrorhiza* (Engelm.) and *Opuntia microdasys* (Lehm.). Food Funct 2014;5(9):2129–36.

85. Parker WH, Bohm BA. Flavonol glycosides of *Limnanthes douglasiz*. Phytochemistry 1975; 14:553–5.

86. Slimestad R, Hostettmann K. Characterisation of Phenolic Constituents from Juvenile and Mature Needles of Norway Spruce by Means of High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Phytochemical Analysis 1996; 7:42–8.

87. El-Aasr M, Kabbash A, Abo El-Seoud KA, Al-Madboly LA, Ikeda T. Antimicrobial and Immunomodulatory Activities of Flavonol Glycosides Isolated From *Atriplex halimus* L. Herb. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2016;8(10):1159–68.

88. Chumbalov TK, Omurkamzinova VB. Flavonoids of *Atraphaxis pyrifolia*. IV. Chem Nat Compd 1976;12(5):593–4.

89. Sun J, Liang F, Bin Y, Li P, Duan C. Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. Molecules [Internet] 2007; 12:679–93. Available from: http://www.mdpi.org

90. Yuzuak S, Ballington J, Xie DY. HPLC-qTOF-MS/MS-based profiling of flavan-3-ols and dimeric proanthocyanidins in berries of two muscadine grape hybrids FLH 13-11 and FLH 17-66. Metabolites 2018;8(4).

91. López-Fernández O, Domínguez R, Pateiro M, Munekata PES, Rocchetti G, Lorenzo JM. Determination of Polyphenols Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Technique (LC-MS/MS): A Review. Antioxidants [Internet] 2020;9(479). Available from: www.mdpi.com/journal/antioxidants

92. Goufo P, Singh RK, Cortez I. A reference list of phenolic compounds (Including stilbenes) in grapevine (*Vitis vinifera* L.) roots, woods, canes, stems, and leaves. Antioxidants 2020;9(5).

93. Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. J Agric Food Chem 2003;51(10):2900–11.

94. Zhang SH, Hu X, Shi SY, Huang LQ, Chen W, Chen L, et al. Typical ultraviolet spectra in combination with diagnostic mass fragmentation analysis for the rapid and comprehensive profiling of chlorogenic acids in the buds of *Lonicera macranthoides*. Anal Bioanal Chem 2016;408(13):3659–72.

95. Iñigo R, Pomilio A. Flavonoids from *Erythroxylon argentinum*. Phytochemistry 1985;24(2):347–9.

96. Miyazawa M, Okuno Y, Nakamura S ichi, Kosaka H. Antimutagenic Activity of Flavonoids from *Pogostemon cablin*. J Agric Food Chem 2000;48(3):642–7.

97. Ünlü A, Teralı K, Aydın ZU, Dönmez AA, Yusufoğlu HS, Çalış İ. Isolation, Characterization and In Silico Studies of Secondary Metabolites from the Whole Plant of *Polygala inexpectata* Peşmen & Erik. Molecules 2022;27(3).

98. Li W, Sun Y, Liang W, Fitzloff JF, Van Breemen RB. Identification of caffeic acid derivatives in *Actea racemosa* (*Cimicifuga racemosa*, black cohosh) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom [Internet] 2003; 17:978–82. Available from: www.interscience.wiley.com

99. Long C, Sauleau P, David B, Lavaud C, Cassabois V, Ausseil F, et al. Bioactive flavonoids of *Tanacetum parthenium* revisited. Phytochemistry 2003;64(2):567–9.

100. Williams CA, Hoult JRS, Harborne JB, Greenham J, Eagles'~ J. A biologically active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. Phytochemistry 1995;38(1):267–70.

101. Jian-yong S, Di-hua C, Qi C, Liang-gan S, Zhaoi-yi Z. Isolation and identification of flavonoids from *Gynostema yixingense*. Acta Bot Sin 1994;36(3):239–43.

102. Zhao YL, Wang XY, Sun LX, Fan RH, Bi KS, Yu ZG. Cytotoxic constituents of *Viscum coloratum*. Z Naturforsch C J Biosci 2012;67(3–4):129–34.

103. Gharari Z, Bagheri K, Derakhshani B, Sharafi A. HPLC-DAD-ESI/MS analysis of phenolic components of *Scutellaria araxensis* , *S. bornmuelleri* and *S. orientalis*. Nat Prod Res 2022;36(9):2440–5.

104. Saralamma VGV, Lee HJ, Hong GE, Park HS, Yumnam S, Raha S, et al. Korean *Scutellaria baicalensis* Georgi flavonoid extract induces mitochondrially mediated apoptosis in human gastric cancer AGS cells. Oncol Lett 2017;14(1):607–14.

105. Fan M, Qin K, Ding F, Huang Y, Wang X, Cai B. Identification and differentiation of major components in three different "Sheng-ma" crude drug species by UPLC/Q-TOF-MS. Acta Pharm Sin B 2017;7(2):185–92.

106. Nuntanakorn P, Jiang B, Einbond LS, Yang H, Kronenberg F, Weinstein IB, et al. Polyphenolic constituents of *Actaea racemosa*. J Nat Prod [Internet] 2006 [cited 2022 Oct 28];69(3):314–8.

107. Hariprasath L, Jegadeesh R, Arjun P, Raaman N. In vitro propagation of *Senecio candicans* DC and comparative antioxidant properties of aqueous extracts of the in vivo plant and in vitro-derived callus. South African Journal of Botany [Internet] 2015;98:134–41. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2015.02.011

108. Joshi S, Shrestha K, Bajracharya DM. Secondary Metabolite variation in some species of *Senecio* L. from Nepal Himalaya. Pharma Innovation J [Internet] 2013;2(1):70–6.

109. Amar Z, Soukayna T, Noureddine G, Salah R. Phytochemical Screening and Evaluation of Antibacterial Activity of Alkaloids Extract of *Senecio delphinifolius* Vahl [Internet]. 2012. Available from: www.derpharmachemica.com

110. Lock de Ugaz Olga. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2a ed. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú; Fondo Editorial; 1994.

111. Belay A, Gholap A V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. African Journal of Pure and Applied Chemistry [Internet] 2009;3(11):234–40. Available from: http://www.academicjournals.org/ajpac

112. Tomac I, Jakobek L, Šeruga M. Chromatographic and Voltammetric Characterization of Chlorogenic Acids in Coffee Samples. Croat Chem Acta 2018;91(4):501–11.

113. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer Berlin Heidelberg; 1970.

114. Liu S, Marsol-Vall A, Laaksonen O, Kortesniemi M, Yang B. Characterization and Quantification of Nonanthocyanin Phenolic Compounds in White and Blue Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) Juices and Wines Using UHPLC-DAD−ESI-QTOF-MS and UHPLC-DAD. J Agric Food Chem [Internet] 2020 [cited 2022 Oct 30];68:7734–44. Available from: https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02842

115. Takahira M, Kusano A, Shibano M, Kusano G, Sakurai N, Nagai M, et al. Three New Fukiic Acid Esters, Cimicifugic Acids A, B and C, from *Cimicifuga simplex* Wormsk. ChemPharmBull [Internet] 1998 [cited 2022 Oct 13];46(2):361–5.

116. Jahn A, Petersen M. Fukinolic acid and cimicifugic acids: a review. Phytochemistry Reviews 2022;21(4):1247–71.

117. Malek MA, Hoang MH, Jia Y, Lee JH, Jun HJ, Lee DH, et al. Ombuin-3-O-β-d-glucopyranoside from Gynostemma pentaphyllum is a dual agonistic ligand of peroxisome proliferator-activated receptors α and δ/β. Biochem Biophys Res Commun 2013;430(4):1322–8.

118. Zhang YY, Wang Q, Qi LW, Qin XY, Qin MJ. Characterization and determination of the major constituents in Belamcandae Rhizoma by HPLC–DAD–ESI-MS. J Pharm Biomed Anal 2011;56(2):304–14.

119. Sun L, Tao S, Zhang S. Characterization and quantification of polyphenols and triterpenoids in thinned young fruits of ten pear varieties by UPLC-Q TRAP-MS/MS. Molecules 2019;24(1).

120. Silva S, Matias AA, Nunes A, Duarte C, Coelho A V, Rosário Bronze M. Identification of flavonol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and hyphenated with mass spectrometry. Ciência Téc Vitiv 2005;20(1):17–33.

121. Razgonova M, Zakharenko A, Pikula K, Manakov Y, Ercisli S, Derbush I, et al. LC-MS/MS Screening of Phenolic Compounds in Wild and Cultivated Grapes *Vitis amurensis* Rupr. Molecules [Internet] 2021 [cited 2022 Sep 2];26(12):3650. Available from: https://www.mdpi.com/1420-3049/26/12/3650

122. Castillo-Muñoz N, Gómez-Alonso S, García-Romero E, Hermosín-Gutiérrez I. Flavonol Profiles of *Vitis vinifera* Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines. J Agric Food Chem 2007;55(3):992–1002.

123. Hiraga Y, Shimada N, Nagashima Y, Suda K, Kanamori T, Ishiguro K, et al. Identification of a Flavin Monooxygenase-Like Flavonoid 8-Hydroxylase with Gossypetin Synthase Activity from *Lotus japonicus*. Plant Cell Physiol 2021;62(3):411–23.

124. Krzyzanowska-Kowalczyk J, Pecio Ł, Mołdoch J, Ludwiczuk A, Kowalczyk M. Novel phenolic constituents of *Pulmonaria officinalis* L. LC-MS/MS comparison of spring and autumn metabolite profiles. Molecules 2018;23(9).

125. Hong Y, Wang Z, Barrow CJ, Dunshea FR, Suleria HAR. High-Throughput Screening and Characterization of Phenolic Compounds in Stone Fruits Waste by

LC-ESI-QTOF-MS/MS and Their Potential Antioxidant Activities. Antioxidants 2021;10(2):234.

126. Silva T, de Carvalho M, Braz-Filho R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. Quim Nova [Internet] 2009 [cited 2022 Oct 22];32(5):1119–28. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000500008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

127. Kusano A, Seyama Y, Nagai M, Shibano M, Shibano M, Kusano G. Effects of Fukinolic Acid and Cimicifugic Acids from *Cimicifuga* Species and Collagenolytic Activity. Biol Pharm Bull [Internet] 2001 [cited 2022 Oct 26];24(10):1198–201.

128. Taamalli A, Arráez-Román D, Abaza L, Iswaldi I, Fernández-Gutiérrez A, Zarrouk M, et al. LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. Phytochemical Analysis [Internet] 2015 [cited 2022 Oct 26];26(5):320–30.

129. Kruse S, Löhning A, Pauli G, Winterhoff H, Nahrstedt A. Fukiic and Piscidic Acid Esters from the Rhizome of *Cimicifuga racemosa* and the *in vitro* Estrogenic Activity of Fukinolic Acid. Planta Med 1999;65(08):763–4.

130. Ruwizhi N, Aderibigbe BA. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. Int J Mol Sci2020;21(16).

131. Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure- activity relation. J Agric Food Chem 1999;47(4).

132. Gong G, Guan YY, Zhang ZL, Rahman K, Wang SJ, Zhou S, et al. Isorhamnetin: A review of pharmacological effects. Biomedicine & Pharmacotherapy 2020; 128:110301.

133. Na M, Min BS, Bae K. Antioxidant Compounds from *Cercis chinensis* Bunge. Bull Korean Chem Soc 2009;30(11):2765–8.

134. Santana-Gálvez J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. Chlorogenic Acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. Molecules2017;22(3).

135. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. Int J Pharm 2011;403(1–2).

136. Xu JG, Hu QP, Liu Y. Antioxidant and DNA-Protective Activities of Chlorogenic Acid Isomers. J Agric Food Chem 2012;60(46):11625–30.

137. Ao X, Yan J, Liu S, Chen S, Zou L, Yang Y, et al. Extraction, isolation and identification of four phenolic compounds from *Pleioblastus amarus* shoots and their antioxidant and anti-inflammatory properties in vitro. Food Chem 2022;374.

138. Chmiel M, Stompor-Gorący M. The Spectrum of Pharmacological Actions of Syringetin and Its Natural Derivatives—A Summary Review. Nutrients 2022;14(23):5157.

139. Salem M, Hussein S, El-Sharawy R, El-Khateeb A, Ragab E, Dawood K, et al. Antioxidant and antiviral activities of the aqueous alcoholic leaf extract of *Boscia angustifolia* A. Rich. (Capparaceae) and its major component "ombuin." Egyptian Pharmaceutical Journal 2016;15(1).

140. Nooreen Z, Singh S, Singh DK, Tandon S, Ahmad A, Luqman S. Characterization and evaluation of bioactive polyphenolic constituents from *Zanthoxylum armatum* DC., a traditionally used plant. Biomedicine and Pharmacotherapy 2017;89.

141. Pan C, Lü H. Preparative separation of quercetin, ombuin and kaempferide from *Gynostemma pentaphyllum* by high-speed countercurrent chromatography. J Chromatogr Sci 2019;57(3):265–71.

142. Aljancić I, Stanković M, Tesević V, Vujisić L, Vajs V, Milosavljević S. Protective effect on human lymphocytes of some flavonoids isolated from two Achillea species. Nat Prod Commun 2010;5(5):729–32.

143. Ibrahim S, Al-Ahdal A, Khedr A, Mohamed G. Antioxidant α-amylase inhibitors flavonoids from *Iris germanica* rhizomes. Revista Brasileira de Farmacognosia 2017;27(2).

144. Qin R, Zhao Y, Zhao Y, Zhou W, Lv C, Lu J. Polyphenolic compounds with antioxidant potential and neuro-protective effect from *Cimicifuga dahurica*(Turcz.) Maxim. Fitoterapia 2016; 115:52–6.

145. Burdette JE, Chen S nong, Lu ZZ, Xu H, White BEP, Fabricant DS, et al. Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) Protects against Menadione-Induced DNA Damage through Scavenging of Reactive Oxygen Species: Bioassay-Directed Isolation and Characterization of Active Principles. J Agric Food Chem 2002;50(24):7022–8.

146. Xiao Z, He L, Hou X, Wei J, Ma X, Gao Z, et al. Relationships between Structure and Antioxidant Capacity and Activity of Glycosylated Flavonols. Foods 2021;10(4):849.

147. Li X, Wu X, Huang L. Correlation between Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Radix Angelicae Sinensis (Danggui). Molecules 2009;14(12):5349–61.

148. Piluzza G, Bullitta S. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. Pharm Biol 2011;49(3):240–7.

149. Turumtay EA, İslamoğlu F, Çavuş D, Şahin H, Turumtay H, Vanholme B. Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*). Ind Crops Prod 2014; 52:687–94.

150. Aryal S, Baniya MK, Danekhu K, Kunwar P, Gurung R, Koirala N. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. Plants 2019;8(4):96.

151. Osman M, Mahmoud G, Shoman S. Correlation Between Total Phenols Content, Antioxidant Power and Cytotoxicity. Biointerface Res Appl Chem 2020;11(3):10640–53.

152. Noreen S, Maqbool I, Madni A. Dexamethasone: Therapeutic potential, risks, and future projection during COVID-19 pandemic. Eur J Pharmacol 2021; 894:173854.

153. Chaity FR, Khatun M, Rahman MS. *In vitro* membrane stabilizing, thrombolytic and antioxidant potentials of *Drynaria quercifolia* L., a remedial plant of the Garo tribal people of Bangladesh. BMC Complement Altern Med 2016;16(1):184.

154. Erlejman AG, Verstraeten SV, Fraga CG, Oteiza PI. The Interaction of Flavonoids with Membranes: Potential Determinant of Flavonoid Antioxidant Effects. Free Radic Res 2004;38(12):1311–20.

155. Oteiza PI, Erlejman AG, Verstraeten S V., Keen CL, Fraga CG. Flavonoid-membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface? Clin Dev Immunol 2005;12(1):19–25.

156. Shahidi F, Yeo J. Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. Int J Mol Sci 2018;19(6):1573.

157. Taofiq O, Calhelha RC, Heleno S, Barros L, Martins A, Santos-Buelga C, et al. The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. Food Research International 2015; 76:821–7.

158. Ruiz-Ruiz JC, Matus-Basto AJ, Acereto-Escoffié P, Segura-Campos MR. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds isolated from *Melipona beecheii* honey. Food Agric Immunol 2017;28(6):1424–37.

159. Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF- κB Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-κB Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. Mediators Inflamm 2007; 2007:1–10.

160. Jităreanu A, Trifan A, Vieriu M, Caba IC, Mârțu I, Agoroaei L. Current Trends in Toxicity Assessment of Herbal Medicines: A Narrative Review. Processes 2022;11(1):83.

161. Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D, McLaughlin J. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Planta Med 1982;45(05):31–4.

162. Merino FJZ, Oliveira VB, Paula CS, Cancian FC, Souza AM, Zuchetto M, et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. Revista Brasileira de Plantas Medicinais [Internet] 2015 [cited 2023 Mar 7];17(4 suppl 3):1031–40.

163. Karchesy YM, Kelsey RG, Constantine G, Karchesy JJ. Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. Springerplus 2016;5(1):510.

164. Bardón A, Borkosky S, Ybarra MI, Montanaro S, Cartagena E. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. Fitoterapia 2007;78(3):227–31.

165. Salama A, Hinestroza A, Chávez M. Fito y bioanálisis de algunas plantas utilizadas en medicina popular con posible actividad farmacológica. Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas [Internet] 1996 [cited 2023 Mar 7];25(1):44–51.

166. Seremet O, Olaru O, Gutu C, Nitulescu G, Ilie M, Negres S, et al. Toxicity of plant extracts containing pyrrolizidine alkaloids using alternative invertebrate models. Mol Med Rep 2018;

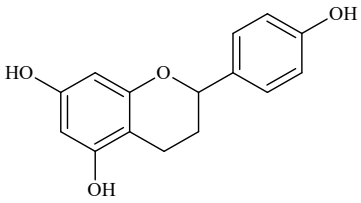
167. Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. J Ethnopharmacol 2011;137(1):121–40.

168. Magalhães AF, Tozzi AMGA, Magalhães EG, Sannomiya M, Soriano M del PC, Perez MAF. Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. An Acad Bras Cienc 2007;79(3):351–67.

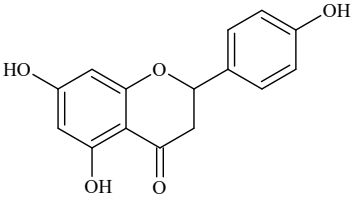
169. Gohari AR, Saeidnia S, Gohari MR, Moradi-Afrapoli F, Malmir M, Hadjiakhoondi A. Bioactive flavonoids from *Satureja atropatana* Bonge. Nat Prod Res 2009;23(17):1609–14.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

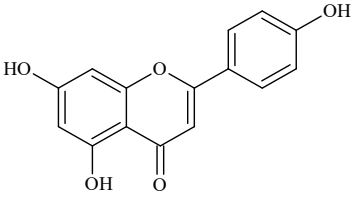
Anexo 1. Subgrupos de flavonoides [28]



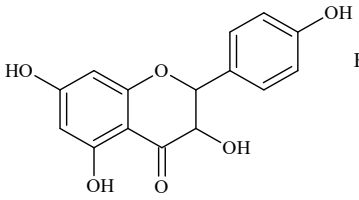
Flavano



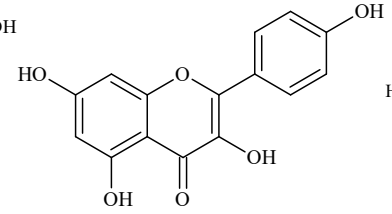
Flavanona



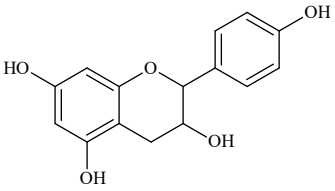
Flavona



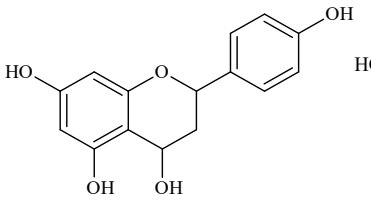
Dihidroflavonol



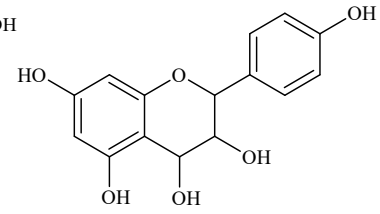
Flavonol



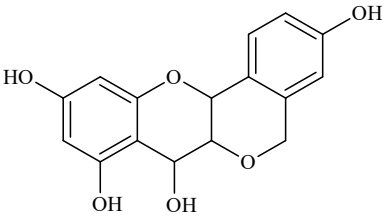
Flavan – 3 – ol



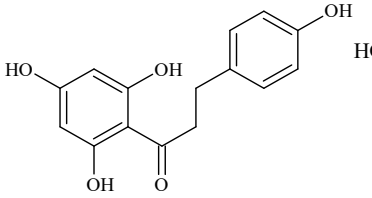
Flavan – 4 – ol



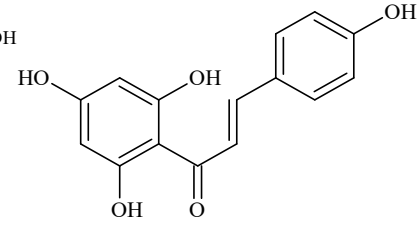
Flavan – 3,4 – diol



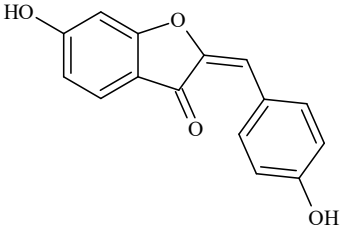
Peltoginoide



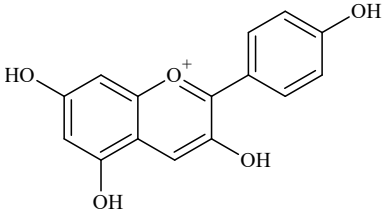
Dihidrochalcona



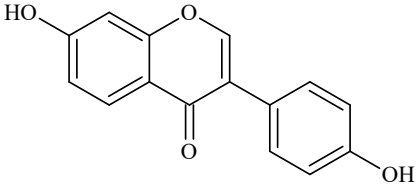
Chalcona



Aurona



Antocianina



Isoflavona

Anexo 2. Lugar y ubicación del lugar de colecta con ayuda de GPS Garmin



Anexo 3. Muestra herborizada para certificación botánica.



Anexo 4. Constancia de certificación botánica.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA Nº 301-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta estéril), recibida de Enrique Javier Aguilar Felices;estudiante del Programa de Doctorado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Senecio rufescens*** DC.; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GENERO: *Senecio*

ESPECIE: *Senecio rufescens* DC,

Nombre vulgar: "Inca taya"
Determinado por: Mag. Hamilton Wilmer Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 24 de agosto de 2018

MUSEO DE HISTORIA NATURAL – Herbario San Marcos – USM – JEFE

Mag. ASUNCION A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/cdb

Anexo 5. Hojas desecadas, seleccionadas y conservadas en una caja de cartón.



Anexo 6. Concentración del extracto hidroalcohólico





Anexo 7. Screening fitoquímico según Miranda [63].

N°	**Metabolito Secundario**	**Ensayo**	**Observación**
1	Fenoles y/o taninos	Cloruro Férrico 10%	Coloración azul o precipitado azul negruzco.
2	Flavonoides	Shinoda	Coloración naranja pálido a rojo intenso
3	Triterpenosy/o esteroides	Liebermann Burchard	Coloración roja – rosada para triterpenos y verde – azulado para esteroides
4	Lactonas y/o cumarinas	Baljet	Coloración rojo vino
5	Cardenólidos	Kedde	Coloración violácea
8	Saponinas	Espuma	Espuma abundante y persistente
9	Grupos amino y/o aminoácidos libres	Ninhidrina	Coloración violácea
10	Azúcares reductores	Benedict	Precipitado naranja
11	Alcaloides	Mayer	Precipitado blanco cremoso
		Dragendörff	Precipitado naranja
		Wägner	Precipitado marrón
12	Resinas	Solubilidad en agua	Precipitado naranja

Anexo 8. Cromatografía en columna

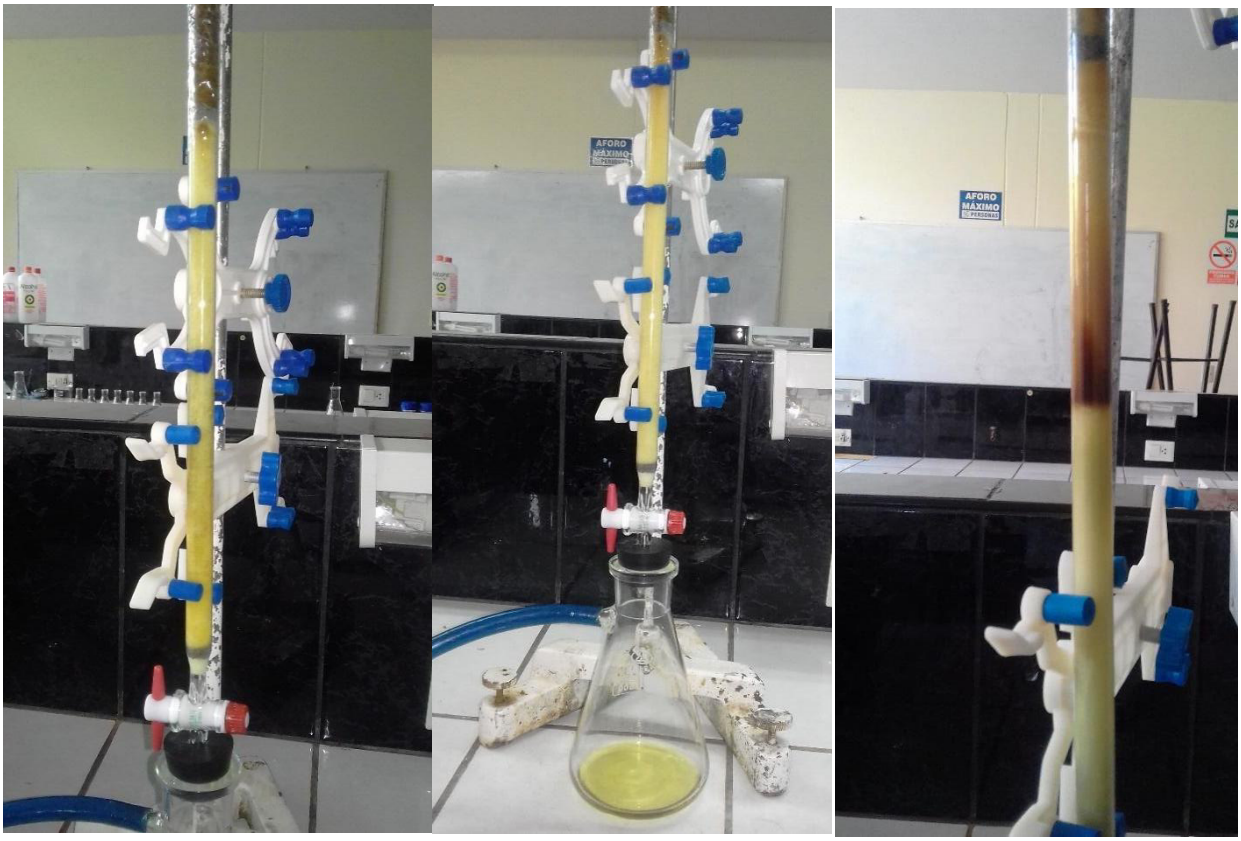


Anexo 9. Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto metanólico.

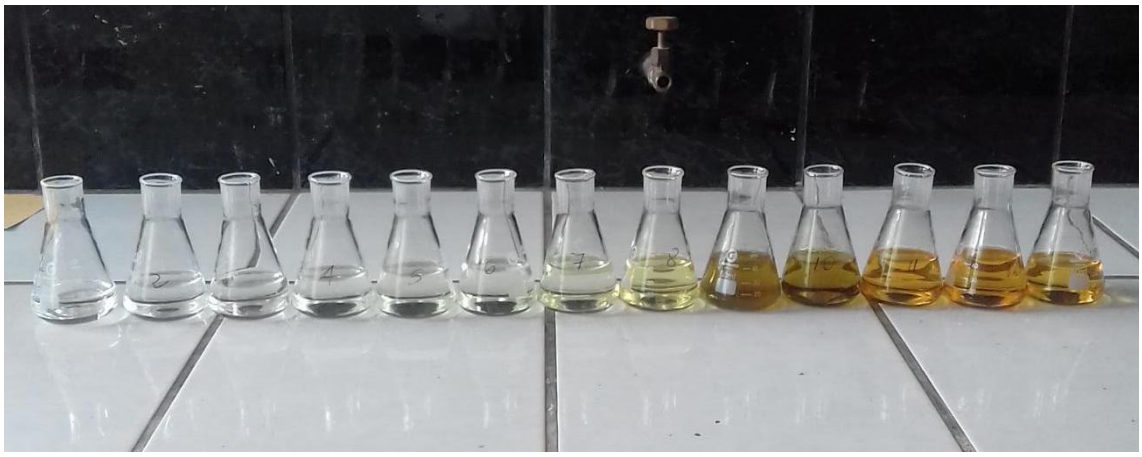


Fracciones: 1) *n* – hexano; 2) Diclorometano; 3) Acetato de etilo y 4) Metanólica

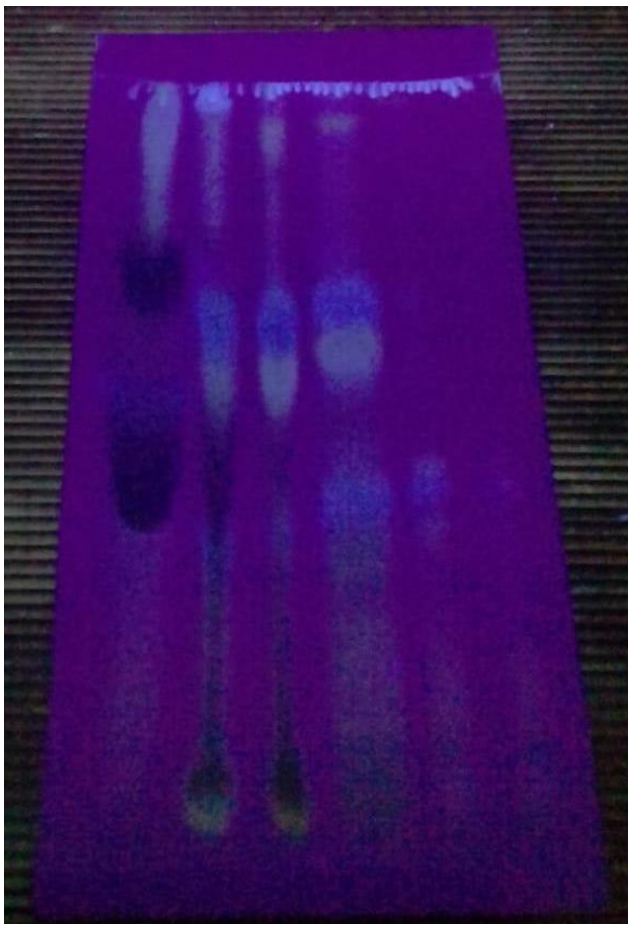
Anexo 10. Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hidroalcohólico.



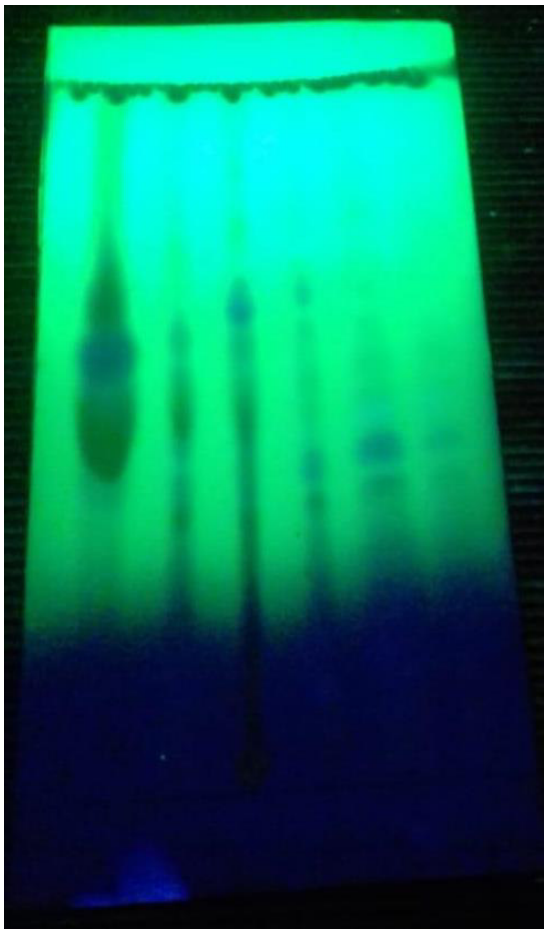
Anexo 11. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna.



Anexo 12. Cromatografía en capa fina de las fracciones 9, 10, 11, 12 y 13.

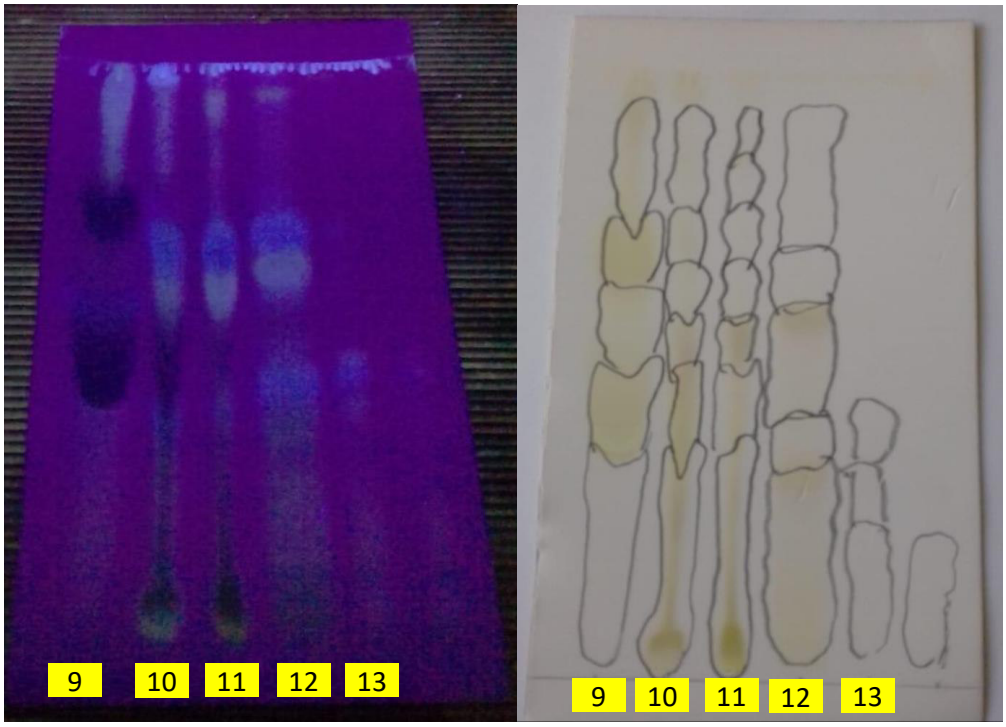


λ = 366 nm

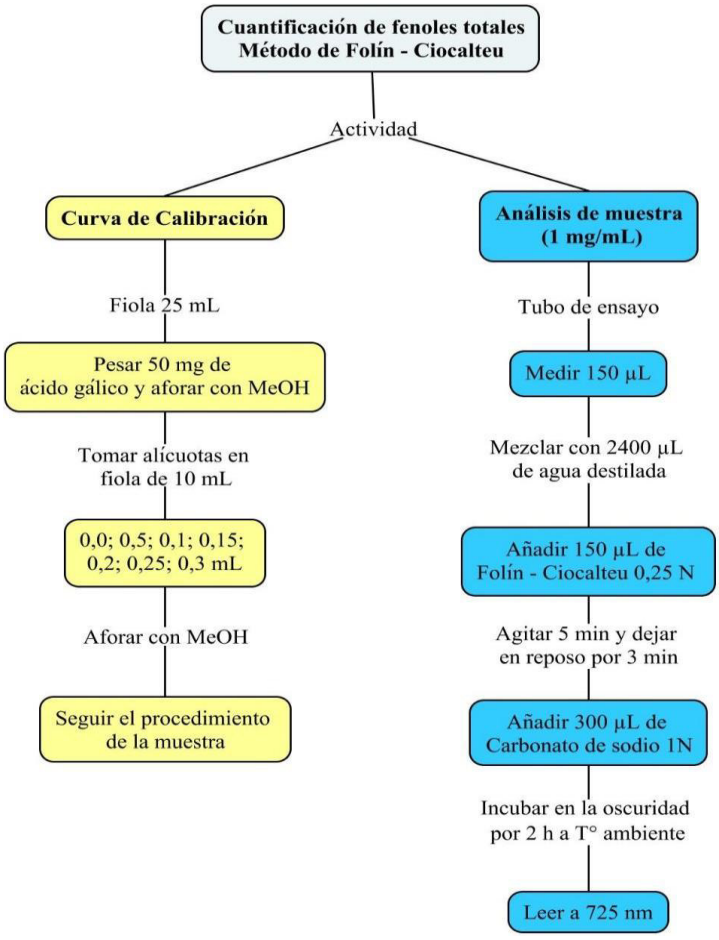


λ = 254 nm

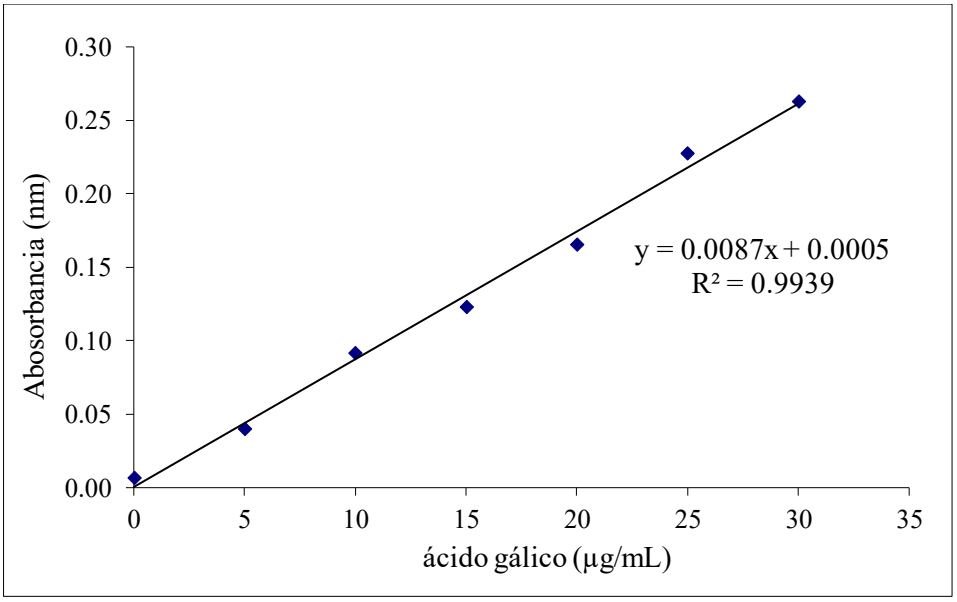
Anexo 13. Delimitación de zonas evidenciadas por luz UV (366 nm) de la cromatografía en capa fina de las fracciones 9, 10, 11, 12 y 13.



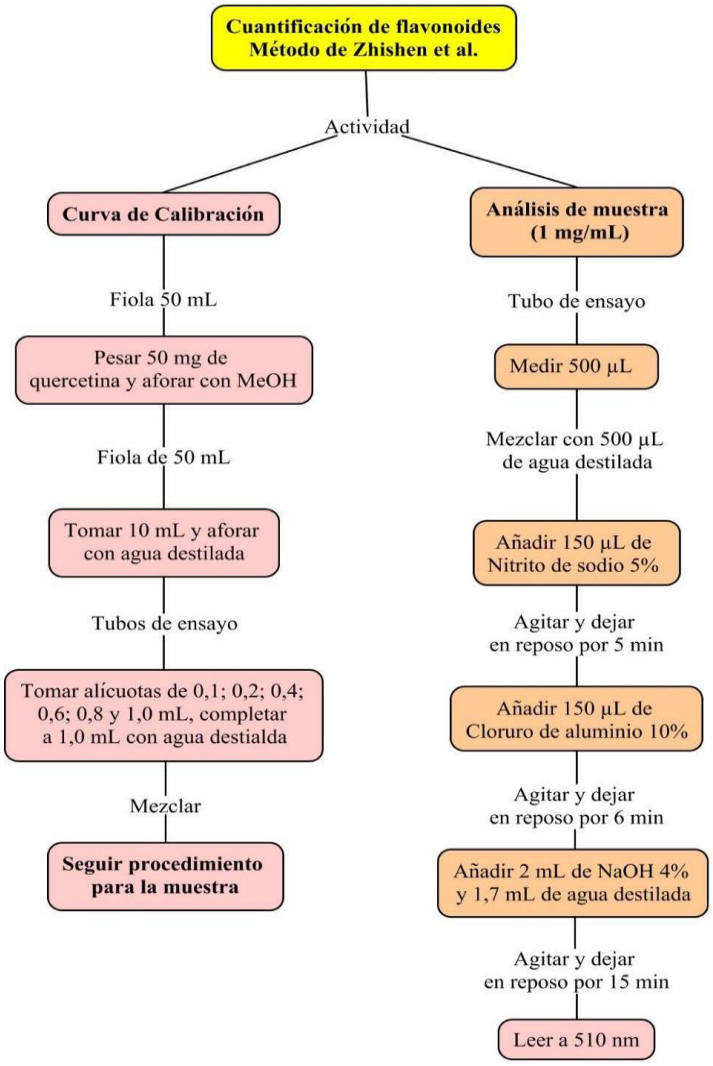
Anexo 14. Flujograma para la cuantificación de fenoles totales [66].



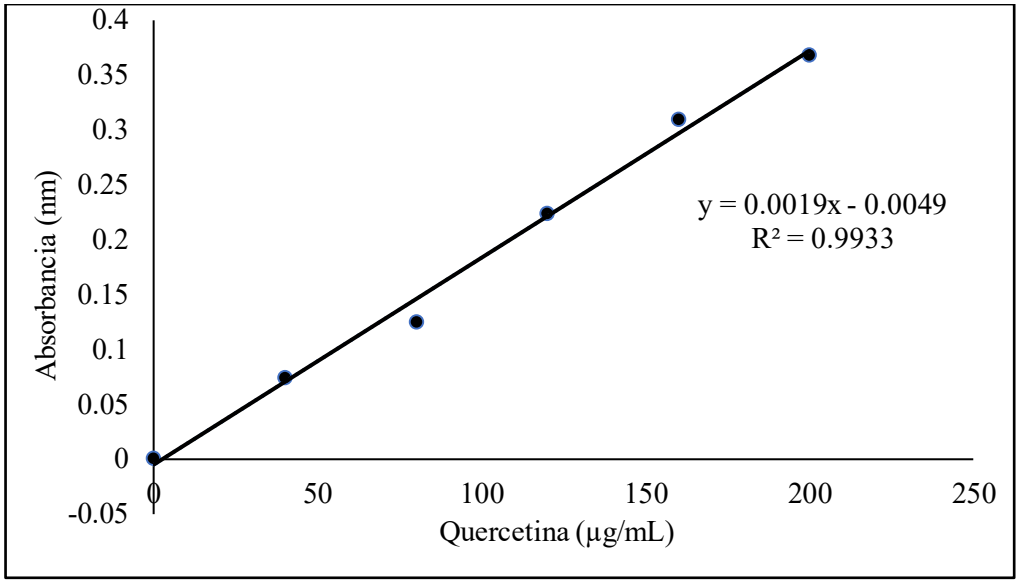
Anexo 15. Curva de calibración del ácido gálico.



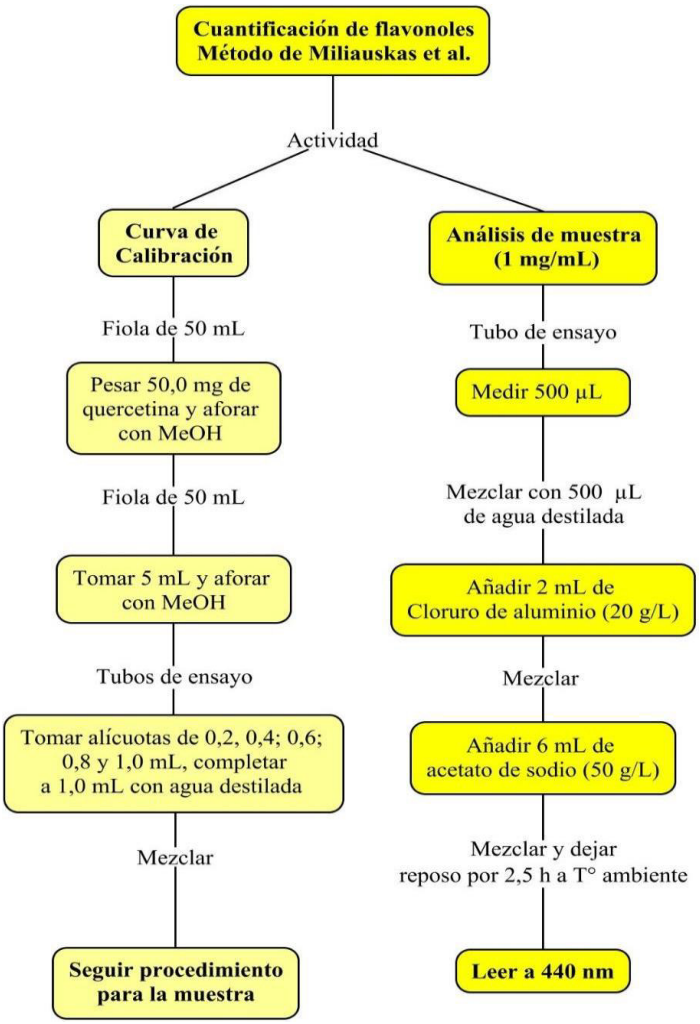
Anexo 16. Flujograma para la cuantificación de flavonoides [67].



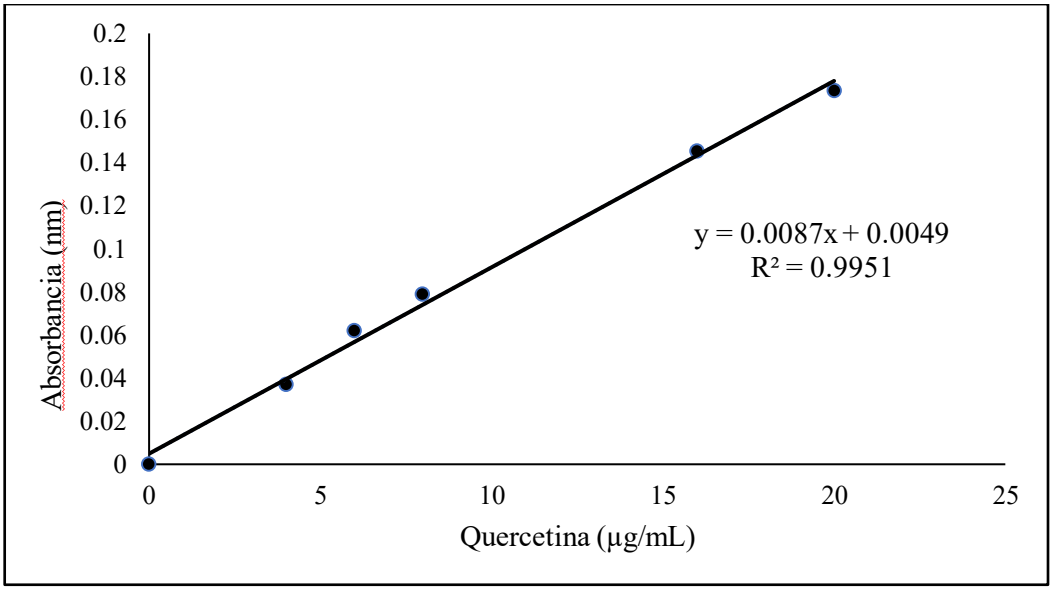
Anexo 17. Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides.



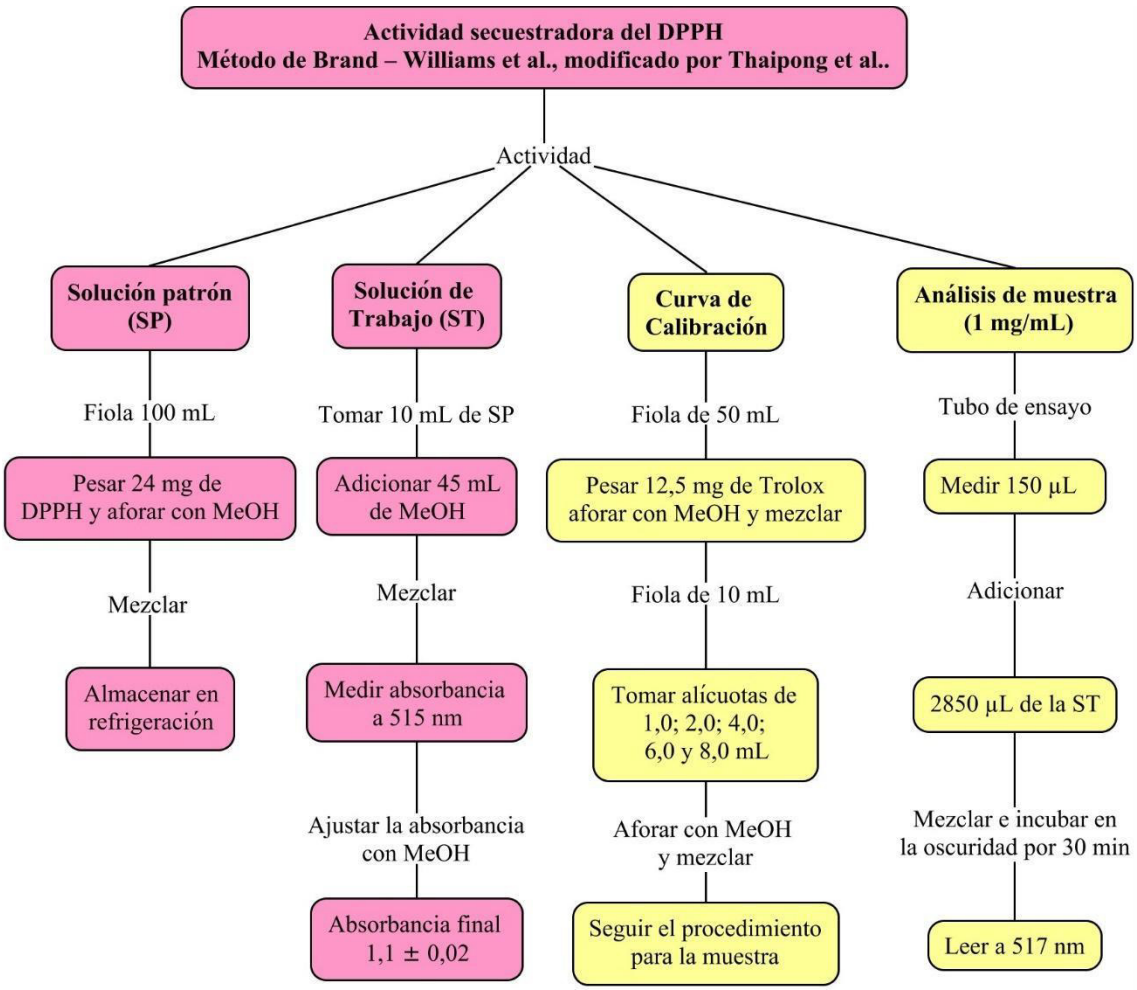
Anexo 18. Flujograma para la cuantificación de flavonoles [68].



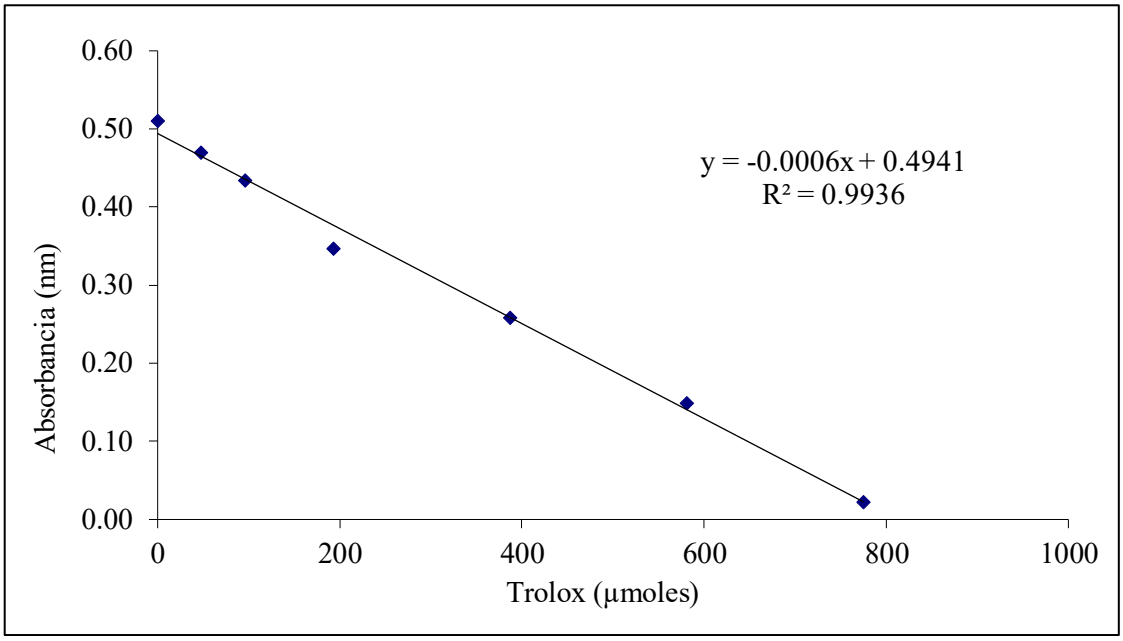
Anexo 19. Curva de calibración para la cuantificación de flavonoles.



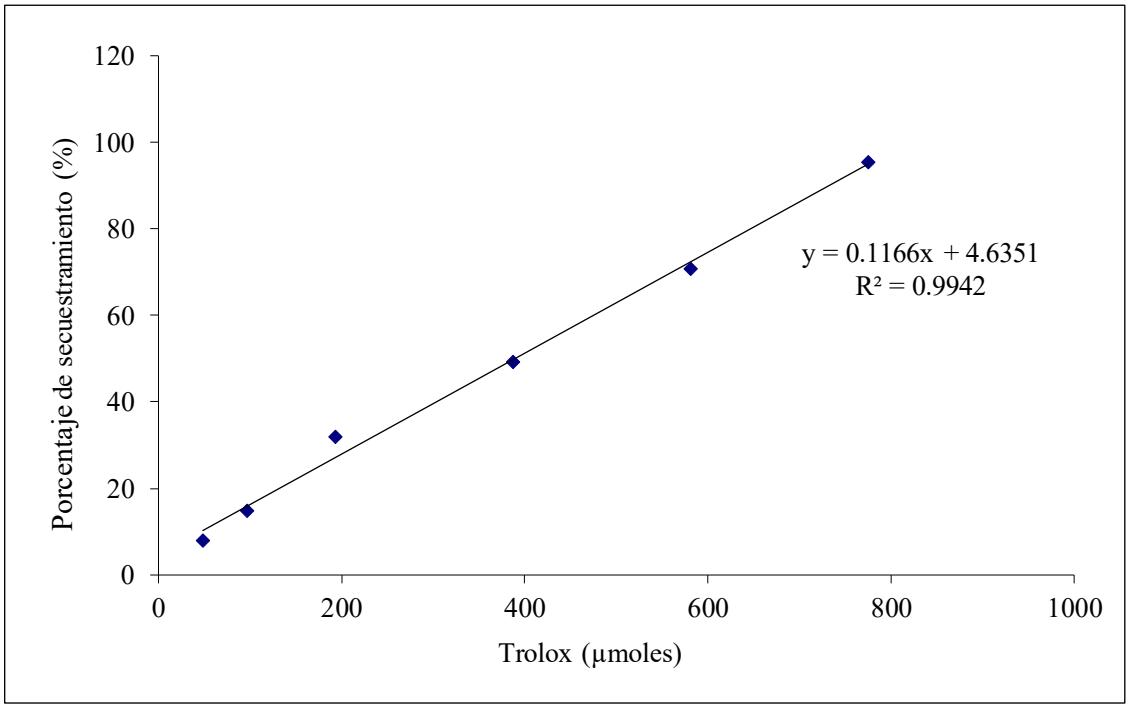
Anexo 20. Flujograma para la determinación de la actividad secuestradora del DPPH [66].



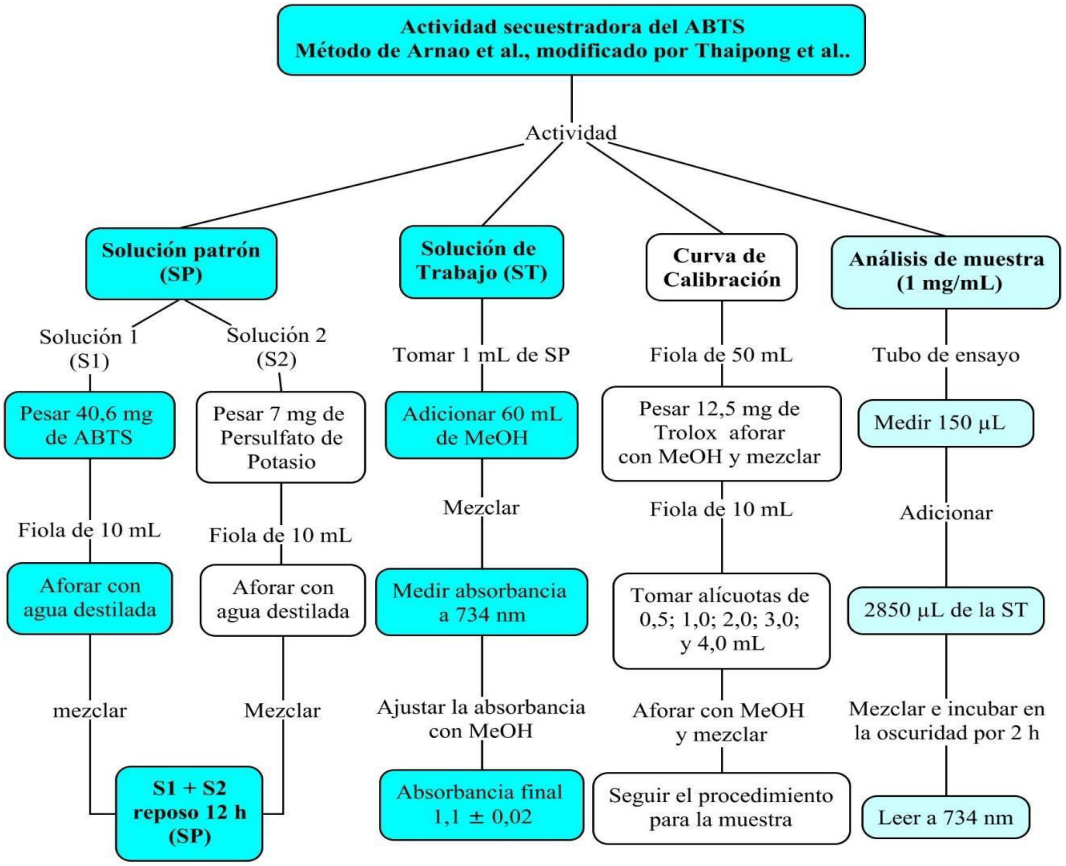
Anexo 21. Curva de calibración del Trolox para la evaluación de la actividad secuestradora del radical libre DPPH.



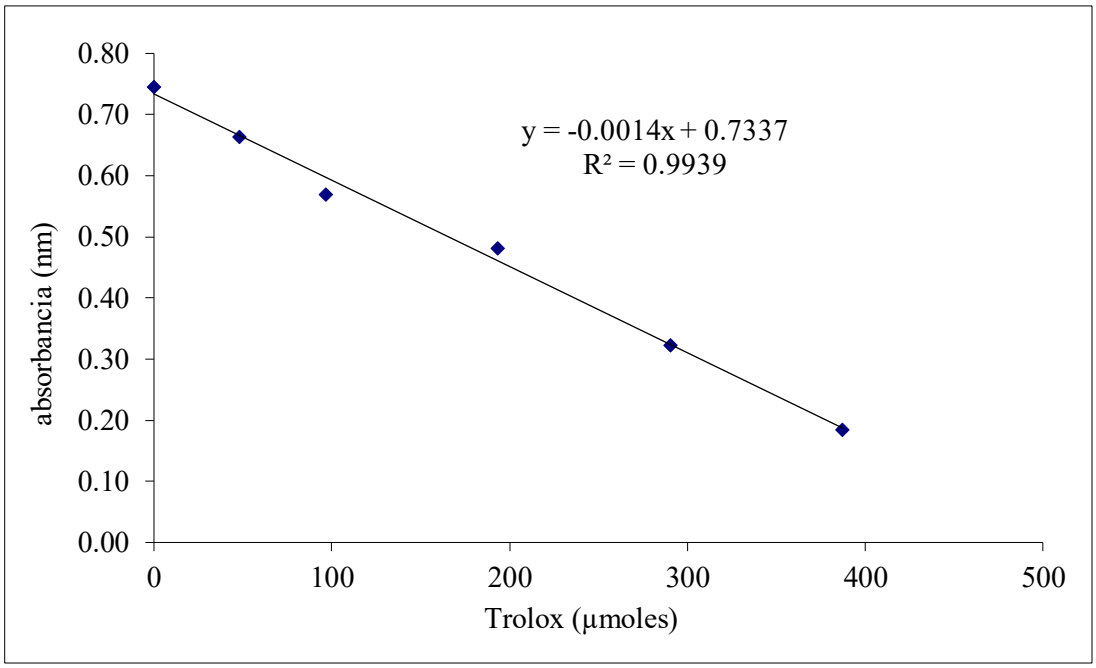
Anexo 22. Curva de calibración del Trolox para la cuantificación del porcentaje de secuestramiento del radical libre DPPH.



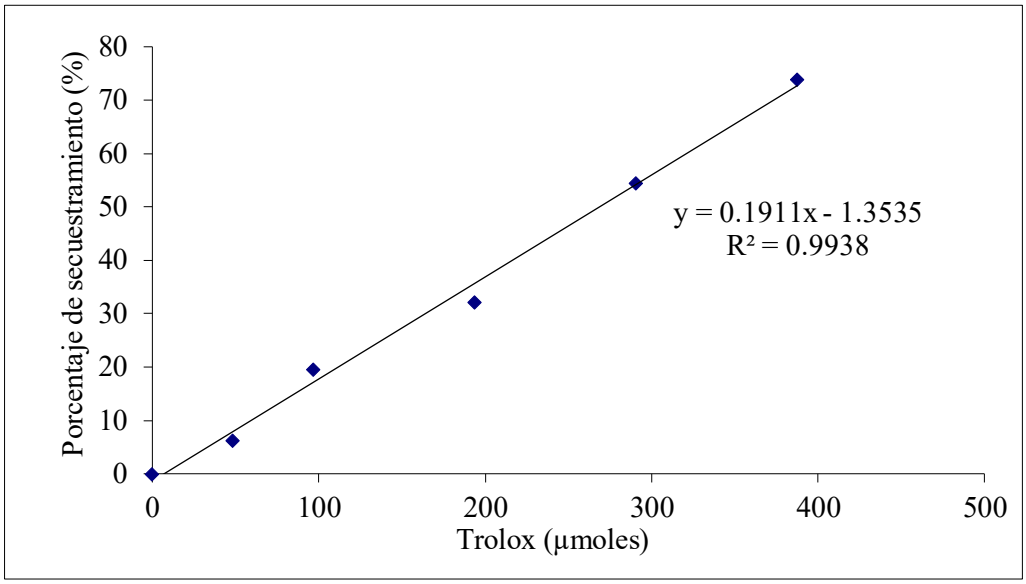
Anexo 23. Flujograma para la determinación de la actividad secuestradora del ABTS•+ [66].



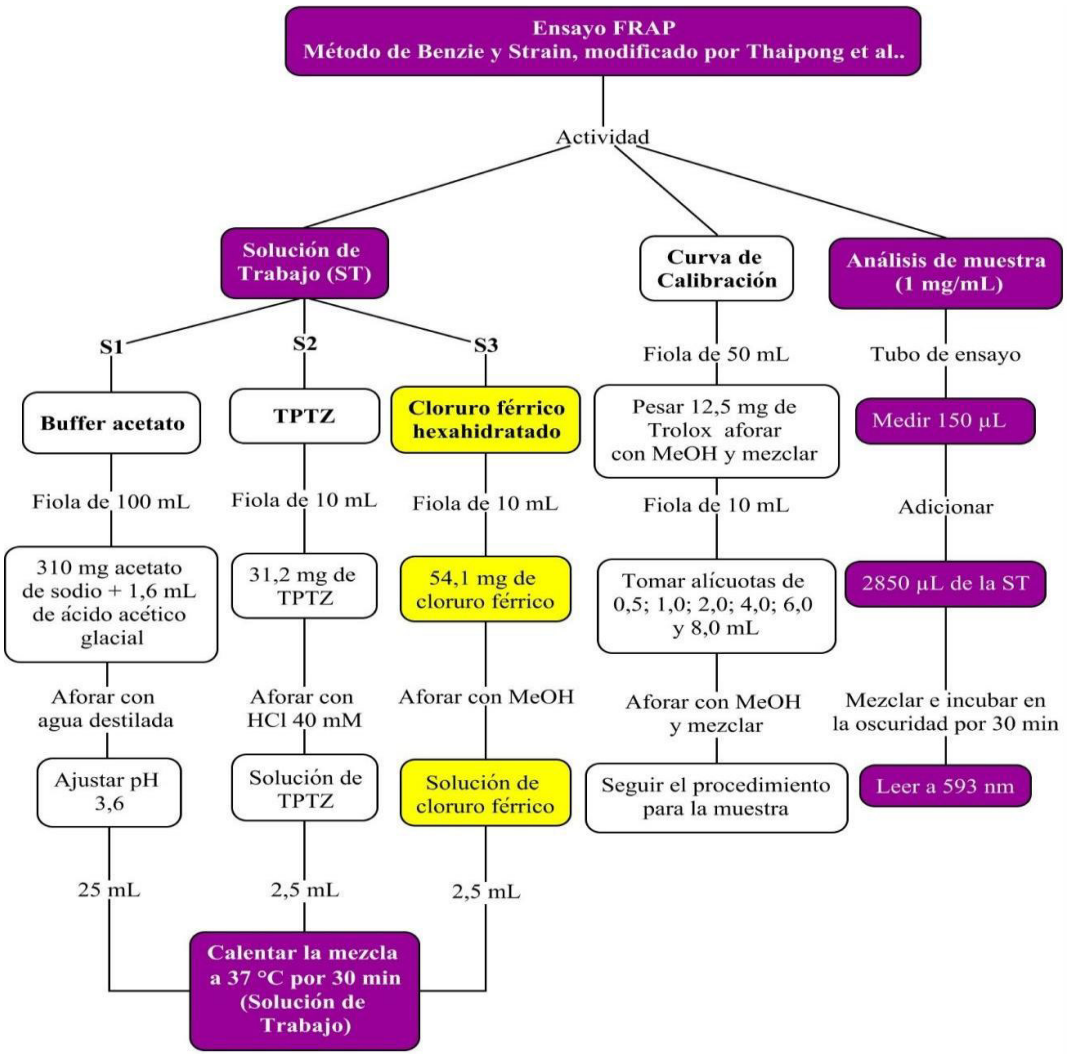
Anexo 24. Curva de calibración del Trolox para la evaluación de la actividad secuestradora del radical libre ABTS•+.



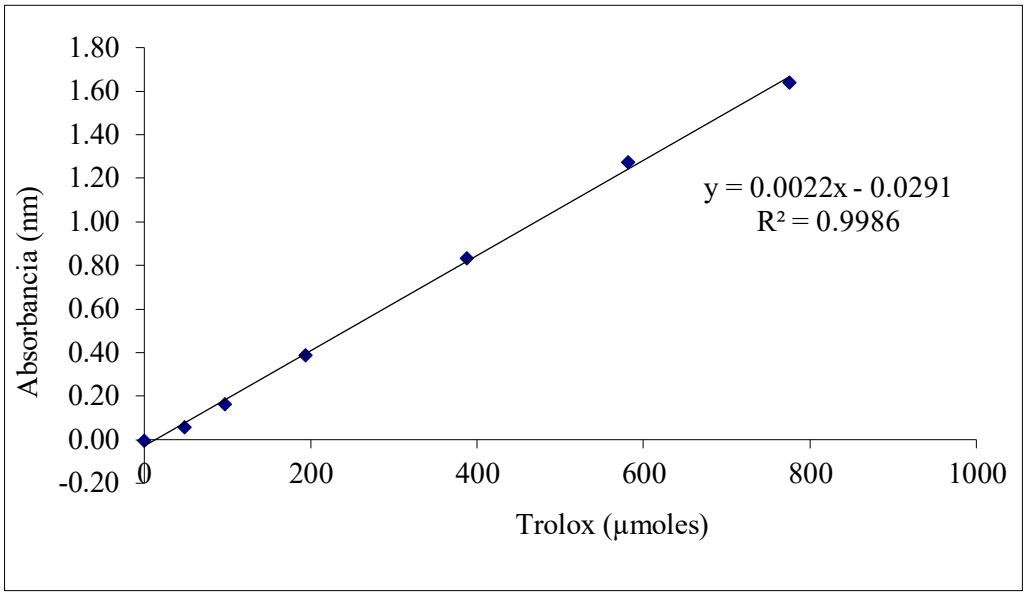
Anexo 25. Curva de calibración del Trolox para la cuantificación del porcentaje de secuestramiento del radical libre ABTS•$^{+}$.



Anexo 26. Flujograma para el ensayo FRAP [66].



Anexo 27. Curva de calibración del Trolox para la evaluación del potencial reductor antioxidante del hierro (FRAP).



Anexo 28. Materiales y diluciones utilizados en el ensayo antiinflamatorio *in vitro*.



Anexo 29. Protocolo del ensayo antiinflamatorio *in vitro*[69]

1. Colectar muestra de sangre venosa de un voluntario sano
2. Mezclar con igual volumen de la solución de Alsever®
3. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos
4. Lavar el paquete celular por tres veces con solución salina isotónica
5. Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 10% (p/v) en solución salina isotónica
6. Seguir el siguiente esquema

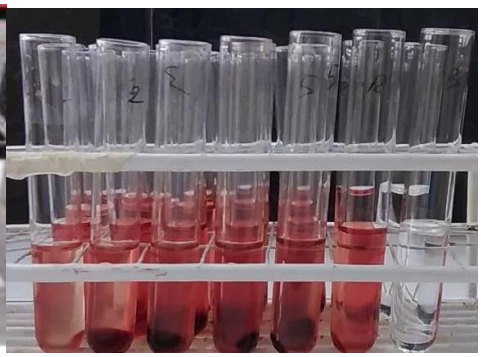
Reactivos	Blanco	Control	Muestra y/o fármaco de referencia
Buffer fosfato pH 7.4	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Solución hiposalina (ClNa 0,45%)	0,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Solución salina isotónica (ClNa 0,9%)	3,5 mL	1,0 mL	
Muestra y/o fármaco de referencia (en ClNa 0,9%)	0,0 mL	0,0 mL	1,0 mL
Suspensión de Glóbulos rojos 10% p/v	0,0 mL	0,5 mL	0,5 mL

7. El blanco, la muestra problema y el control, fueron incubados a 37 °C por 30 minutos
8. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.
9. Leer el contenido de hemoglobina en el sobrenadante a 560 nm.

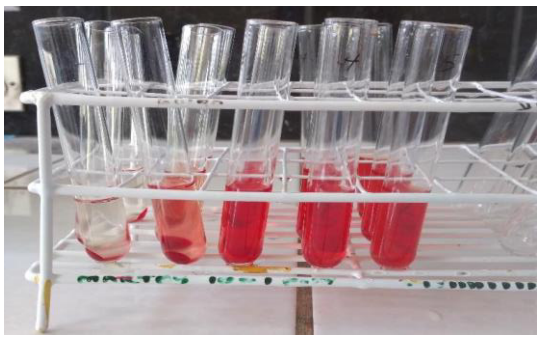
Anexo 30. Procedimiento y resultados del ensayo antiinflamatorio *in vitro*.



a) Dilución de la muestra



b) Muestra conteniendo la suspensión de glóbulos rojos antes de la incubación



c) Muestra después de la incubación.

Anexo 31. Materiales y equipos utilizados en el bioensayo de *Artemia salina.*



(a) (b) (c)

(a) Obtención de nauplios de *Artemia salina*.
(b) Exposición de los nauplios de *Artemia salina*, a los extractos conteniendo compuestos fenólicos a 10, 100 y 1000 µg/mL.
(c) Recuento del número de nauplios de *Artemia salina* sobrevivientes.

Anexo 32. Declaración Jurada de Consentimiento informado

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

ESCUELA DE POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

DOCTORADO EN FARMACIA Y BIOQUIMICA

DECLARACION JURADA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, **Huber QUISPE ARIAS**, identificado con DNI 46801606, a través del presente documento, expreso mi voluntad de participar en la investigación titulada: **"Actividad antiinflamatoria, capacidad antioxidante y toxicidad de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de hojas de *Senecio rufescens* D.C."**

Habiendo sido informado del propósito de la misma, así como de los objetivos y teniendo la confianza de que la información recogida, será única y exclusivamente para fines de la investigación en mención. Además, se me ha explicado que los resultados obtenidos serán totalmente confidenciales, y que se guardará el anonimato de mi identidad.

Por lo tanto, en forma consciente y voluntaria doy mi consentimiento para ser parte del presente estudio.

Ayacucho, 13 de abril de 2020

Firma del participante
DNI:46801606

Firma del investigador
DNI: 06918713

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

ESCUELA DE POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

DOCTORADO EN FARMACIA Y BIOQUIMICA

DECLARACION JURADA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, **Rocío CISNEROS VÁSQUEZ**, identificado con **DNI N° 70759551**, a través del presente documento, expreso mi voluntad de participar en la investigación titulada: **"Actividad antiinflamatoria, capacidad antioxidante y toxicidad de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de hojas de *Senecio rufescens* D.C."**

Habiendo sido informada del propósito de la misma, así como de los objetivos y teniendo la confianza de que la información recogida, será única y exclusivamente para fines de la investigación en mención. Además, se me ha explicado que los resultados obtenidos serán totalmente confidenciales, y que se guardará el anonimato de mi identidad.

Por lo tanto, en forma consciente y voluntaria doy mi consentimiento para ser parte del presente estudio.

Ayacucho, 13 de abril de 2020

Firma del participante
DNI: 70759551

Firma del investigador
DNI: 06918713

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

ESCUELA DE POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

DOCTORADO EN FARMACIA Y BIOQUIMICA

DECLARACION JURADA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, **Rosilda Rocío ORE ESPINO**, identificado con **DNI N° 77237125**, a través del presente documento, expreso mi voluntad de participar en la investigación titulada: **"Actividad antiinflamatoria, capacidad antioxidante y toxicidad de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de hojas de *Senecio rufescens* D.C."**

Habiendo sido informada del propósito de la misma, así como de los objetivos y teniendo la confianza de que la información recogida, será única y exclusivamente para fines de la investigación en mención. Además, se me ha explicado que los resultados obtenidos serán totalmente confidenciales, y que se guardará el anonimato de mi identidad.

Por lo tanto, en forma consciente y voluntaria doy mi consentimiento para ser parte del presente estudio.

Ayacucho, 13 de abril de 2020

Firma del participante
DNI: 77237125

Firma del investigador
DNI: 06918713

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

ESCUELA DE POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

DOCTORADO EN FARMACIA Y BIOQUIMICA

DECLARACION JURADA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, **Romer CHIMAICO QUISPE**, identificado con **DNI 70270958** a través del presente documento, expreso mi voluntad de participar en la investigación titulada: **"Actividad antiinflamatoria, capacidad antioxidante y toxicidad de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de hojas de *Senecio rufescens* D.C."**

Habiendo sido informado del propósito de la misma, así como de los objetivos y teniendo la confianza de que la información recogida, será única y exclusivamente para fines de la investigación en mención. Además, se me ha explicado que los resultados obtenidos serán totalmente confidenciales, y que se guardará el anonimato de mi identidad.

Por lo tanto, en forma consciente y voluntaria doy mi consentimiento para ser parte del presente estudio.

Ayacucho, 13 de abril de 2020

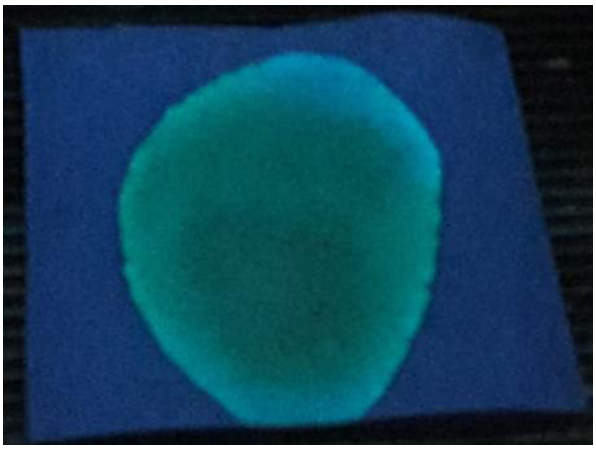
Firma del participante
DNI:70270958

Firma del investigador
DNI: 06918713

Anexo 33. Screening fitoquímico del extracto hidroalcohólico

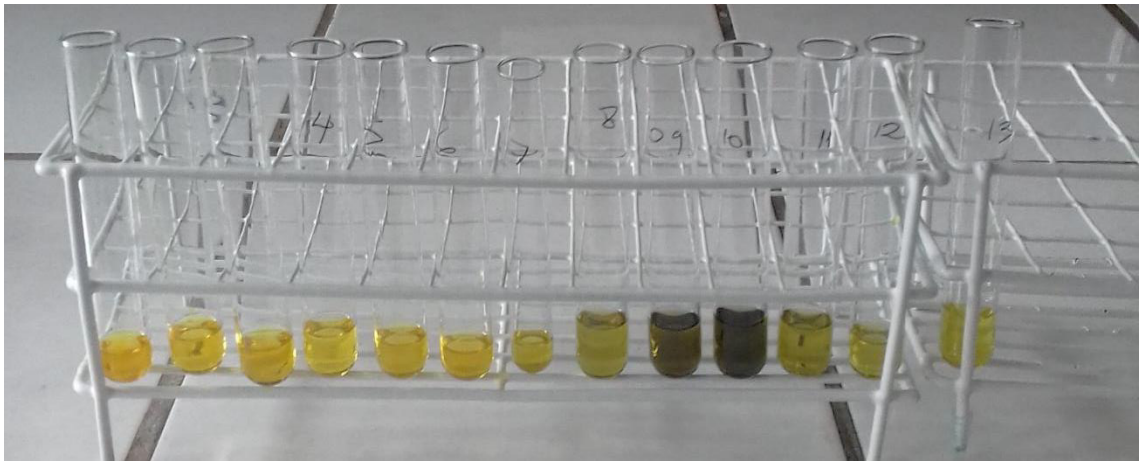


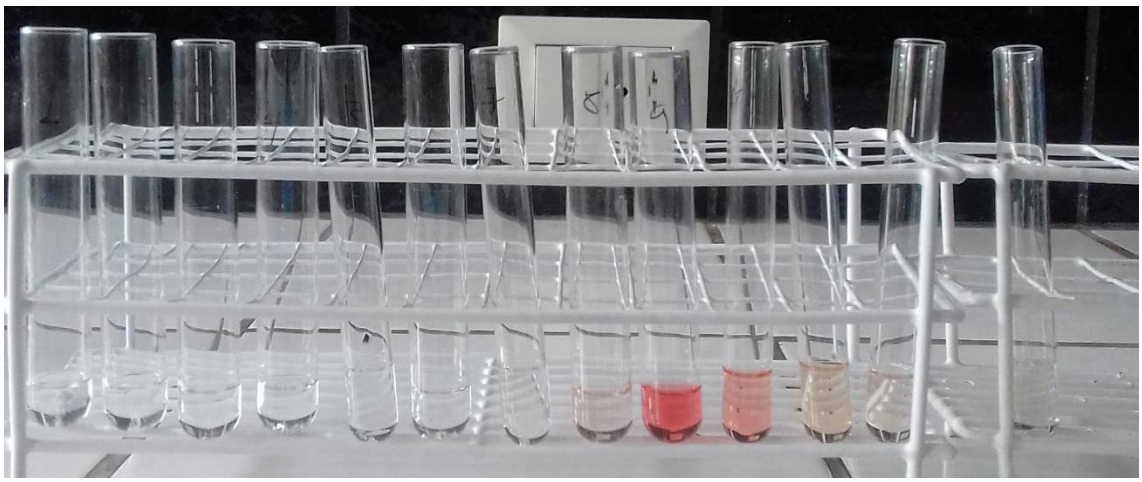
1) Extracto hidroalcohólico;
2) Ensayo con $FeCl_3$ 10%;
3) Ensayo de Shinoda;
4) Ensayo con NaOH 10%;
5) Ensayo de Baljet
6) Ensayo de Kedde
7) Ensayo de Mayer
8) Ensayo de Ninhidrina
9) Ensayo de Wägner
10) Ensayo de Dragendörff
11) Ensayo de Lieberman – Buchardat

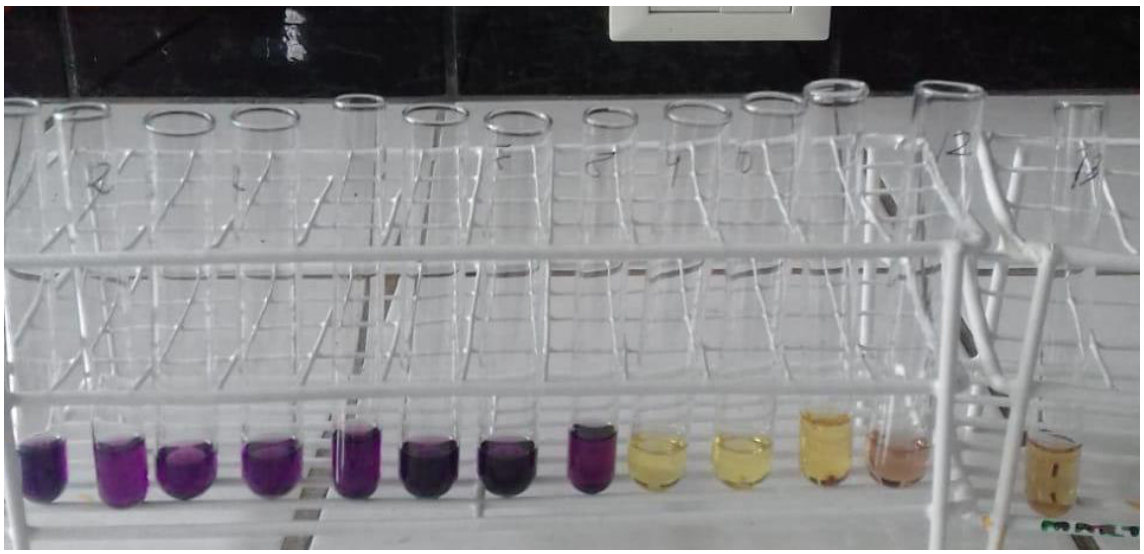


12) Ensayo de catequinas (Luz UV 366 nm)

Anexo 34. Ensayos con cloruro férrico al 10%, Shinoda y el radical libre DPPH de las fracciones.







Anexo 35. Curva espectral de la fracción 9,2 recuperada de la cromatografía en capa fina.

Barrido_16_07_2020_11:13:33 1 / 1

16-jul.-2020 11:17 a. m. N.º serie del instrumento: 9A5X221017

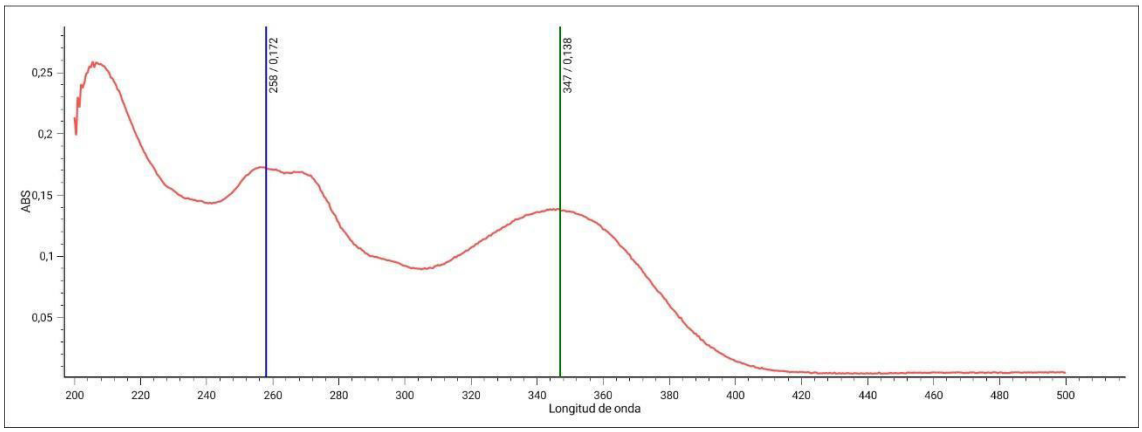
Nombre del método: Barrido 16-jul.-2020 Modelo instrumento: GENESYS 150

Método creado: 16-jul.-2020 11:12 a. m. Versión de paquete de software: 2.3 Firma:

Método actualizado: 16-jul.-2020 11:12 a. m.

Barrido:parámetros de método

Intervalo de longitudes de	**200 - 500 nm**
Intervalo	**0,5 nm**
Velocidad	**Lenta**



Anexo 36. Curva espectral de la fracción 9,4 recuperada de la cromatografía en capa fina.

Barrido_16_07_2020_11:53:55 1 / 1

16-jul.-2020 11:58 a. m. N.º serie del instrumento: 9A5X221017

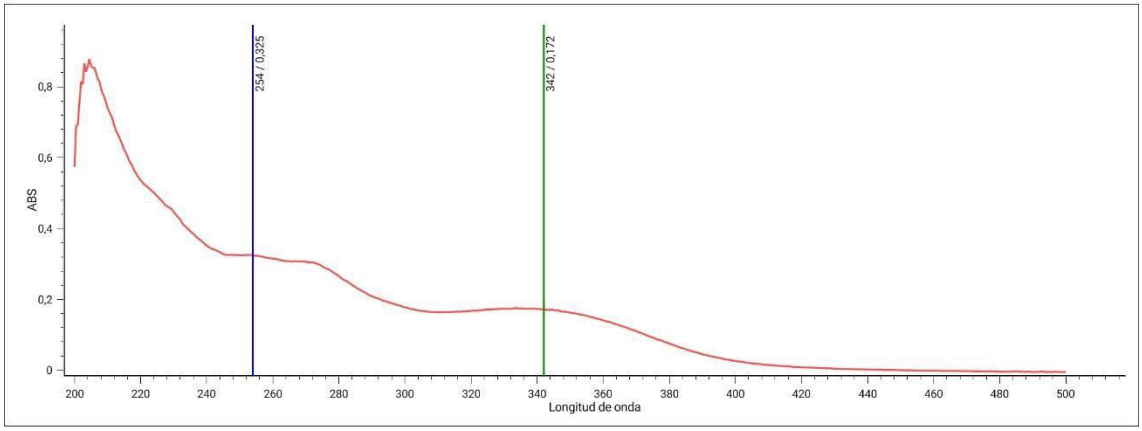
Nombre del método: Barrido 16-jul.-2020 Modelo instrumento: GENESYS 150

Método creado: 16-jul.-2020 11:53 a. m. Versión de paquete de software: 2.3 Firma:

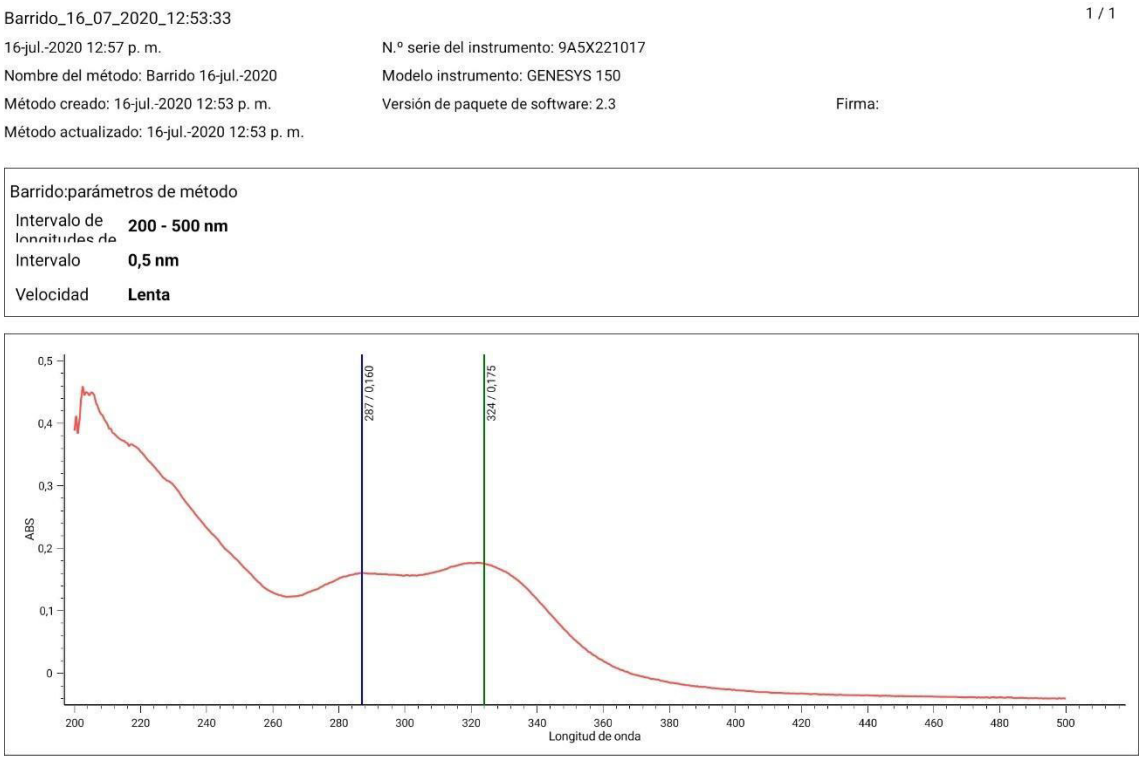
Método actualizado: 16-jul.-2020 11:53 a. m.

Barrido:parámetros de método

Intervalo de longitudes de	**200 - 500 nm**
Intervalo	**0,5 nm**
Velocidad	**Lenta**



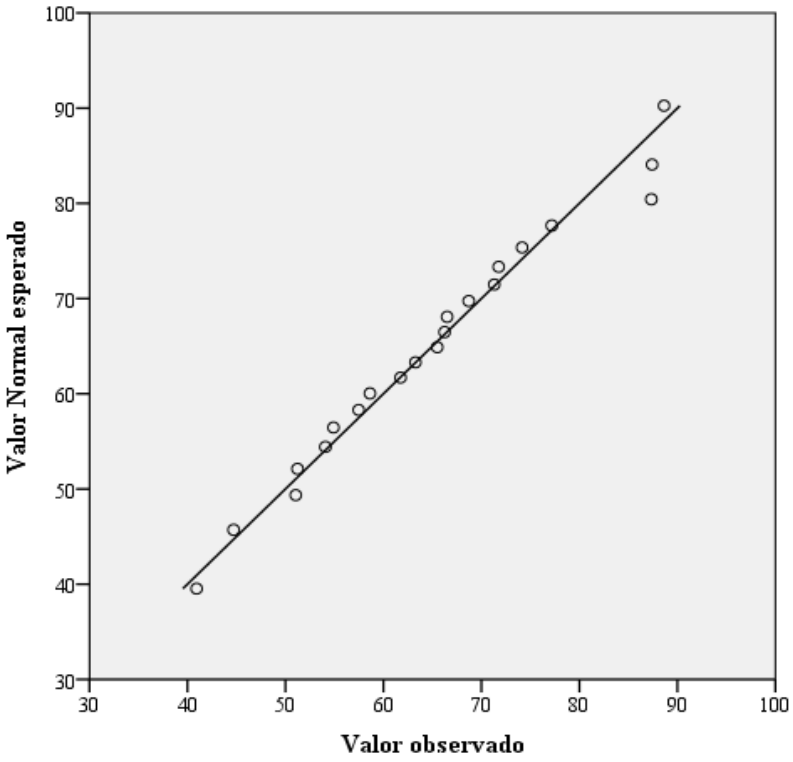
Anexo 37. Curva espectral de la fracción 11,4 recuperadas de la cromatografía en capa.



Anexo 38. Porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos.

Ensayos	Compuestos fenólicos					Control	
	1 mg/mL	2 mg/mL	3 mg/mL	4 mg/mL	5 mg/mL	Dexametasona (1 mg/mL)	Diclofenaco (1 mg/mL)
1	44,71	54,90	65,49	71,76	88,63	57,47	42,20
2	54,08	63,27	68,71	74,15	87,41	61,74	77,18
3	40,93	51,05	66,24	71,31	87,34	51,23	66,50
Promedio	47,07	56,87	66,92	72,52	87,79	56,81	61,96
D.E.	6,77	6,24	1,68	1,53	0,72	5,29	17,92

Anexo 39. Gráfico Q – Q de la inhibición de hemólisis de glóbulos rojos.



Anexo 40. ANOVA del porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos.

Inhibición de hemólisis de glóbulos rojos (%)

	SC	GL	MC	F	Sig.
Entre grupos	3191,791	6	531,965	18,140	0,000
Dentro de grupos	410,549	14	29,325		
Total	3602,340	20			

Anexo 41. Prueba de comparaciones múltiples de Scheffé del porcentaje de inhibición de hemólisis de glóbulos rojos.

Inhibición de hemólisis de glóbulos rojos (%)

Scheffé[a]

		Subconjunto para α = 0.05		
Tratamientos	N	a	b	c
CF (1 mg/mL)	3	46,57		
CF (2 mg/mL)	3	56,41	56,41	
Dexametasona (1mg/mL)	3	56,81	56,81	
CF (3 mg/mL)	3		66,81	
Diciclofenaco (1 mg/mL)	3		67,43	
CF (4 mg/mL)	3		72,41	72,41
CF (5 mg/mL)	3			87,79
Sig.		,525	,107	,131

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

CF: Compuestos fenólicos