



UNAP



**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

TESIS

**TOXICIDAD AGUDA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS
DE HOJAS Y TALLO DE *Senna quinquangulata***

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

**XUSAN ELMIRA REÁTEGUI NICOLINI
DANIEL ALEXANDER WENINGER PEZO**

ASESORES:

**Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES, Mtro.
Ing. VICTOR ERASMO SOTERO SOLIS, Dr.**

IQUITOS, PERÚ

2023

ACTA DE SUSTENTACION



Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N°060-2023-CGT-FFyB-UNAP

En el caserío de Nina Rumi, distrito de San Juan Bautista, departamento de Loreto, a los 24 días del mes de noviembre de 2023, a horas 10:05, se dio inicio a la sustentación pública de Tesis titulada "TOXICIDAD AGUDA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y TALLO DE *Senna quinquangulata*", aprobada con Resolución Decanal N°262-2023-FFyB-UNAP presentada por los bachilleres: Xusan Elmira Reátegui Nicolini y Daniel Alexander Weninger Pezo, para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico que otorga la Universidad de acuerdo con Ley y Estatuto.

El jurado calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N°173-2023-FFyB-UNAP, está integrada por:

- Q.F. JACQUELINE MARGOT GONZALES DIAZ DE MORA, Mtra. **Presidente**
- Q.F. CLAUDIO ADRIANO APAGÚEÑO ARÉVALO, Mtro. **Miembro**
- Q.F. ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRÍGUEZ, Dra. **Miembro**

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: adecuadamente

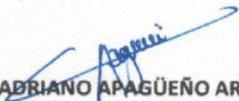
El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública de la tesis ha sido aprobada con la calificación Muy buena

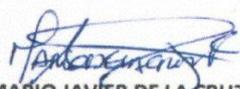
Estando los bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

Siendo las 11:15 se dio por terminado el acto académico


JACQUELINE MARGOT GONZALES DIAZ DE MORA, Mtra.
Presidente


Q.F. CLAUDIO ADRIANO APAGÚEÑO ARÉVALO, Mtro.
Miembro


Q.F. ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRÍGUEZ, Dra.
Miembro

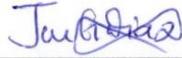

Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES, Mtro.
Asesor


Ing. VÍCTOR ERASMO SOTERO SOLÍS, Dr.
Asesor

Carretera Zungarococha – Nina Rumi
Correo electrónico: farmacia@unaiquitos.edu.pe
San Juan – Loreto – Perú. Celular N°942917936
www.unaiquitos.edu.perú

UNIVERSIDAD
LICENCIADA
RESOLUCIÓN N°012-2019-SUNEDU/CD
Lima, 1 de febrero de 2019

JURADO Y ASESORES



Q.F. Jacqueline Margot Gonzales Diaz de Mora, Mtra.
CQFP N° 12830
Presidenta



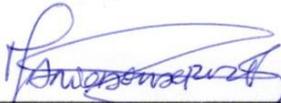
Q.F. Rosa del Carmen Mituska Vargas Rodriguez, PhD.
CQFP N° 13391
Miembro



Q.F. Claudio Adriano Apagüño Arévalo, Mtro.
CQFP N° 16870
Miembro



Ing. Víctor Erasmo Sotero Solís, Dr.
CIP N° 15843
Asesor



Q.F. Mario Javier De la Cruz Flores, Mtro.
CQFP N° 13374
Asesor

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

NOMBRE DEL TRABAJO

**FFB_TESIS_REATEGUI NICOLINI_WENIN
GER PEZO.pdf**

AUTOR

REATEGUI NICOLINI / WENINGER PEZO

RECUENTO DE PALABRAS

5924 Words

RECUENTO DE CARACTERES

31720 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

29 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

1.0MB

FECHA DE ENTREGA

Feb 4, 2024 4:35 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Feb 4, 2024 4:35 PM GMT-5

● 17% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 14% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 9% Base de datos de trabajos entregados
- 0% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

DEDICATORIA

A cada uno de mis seres queridos que me apoyaron moralmente en bienestar de mi profesión, en especial a mi madre y mi abuela Margarita, principal motivo para lograr mis metas y sueños; por haber forjado la persona que soy y quienes de manera incondicional me acompañaron en este camino para convertirme en el profesional que soy hoy.

Xusan Elmira

A mis padres, que siempre fueron mis más grandes ejemplos para seguir adelante, estuvieron siempre a mi lado en los días y noches más difíciles durante mis horas de estudio. Siempre han sido mis mejores guías de vida. Hoy cuando concluyo mis estudios, les dedico a ustedes éste logro amados padres, como una meta más conquistada.

A mi tía Elizabeth Pezo Sánchez sin su apoyo no estuviera donde estoy ahora, por los consejos y enseñanzas que siempre me dio.

Daniel Alexander

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su inmensa gracia y guía en el logro de nuestros objetivos trazados.

A nuestros padres, por sus consejos, palabras de aliento, por creer en nosotros a pesar de todas las adversidades.

Al Q.F. Mario Javier De la Cruz Flores, Mtro. e Ing. Víctor Erasmo Sotero Solís, Dr. quienes en calidad de asesores permitieron la culminación de este trabajo de investigación.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Páginas
Portada	i
Acta de sustentación	ii
Jurado y Asesores	iii
Resultado del Informe de similitud	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Índice del contenido	vii
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Bases teóricas	5
1.3 Definición de términos básicos	13
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	14
2.1 Formulación de hipótesis	14
2.2 Variables y su operacionalización	14
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	16
3.1 Tipo y Diseño	16
3.2 Diseño muestral	16
3.3 Procedimiento de recolección de datos	16
3.4 Procesamiento y análisis de la información	19
3.5 Aspectos Éticos	19
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	20
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	24
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	26
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	27
CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN	28
ANEXOS	35
Anexo 1. Constancia de certificación de la especie vegetal	35
Anexo 2. Instrumento de recolección de datos	36
Anexo 3. Flujoograma de la Actividad Antioxidante <i>in vitro</i>	37

Anexo 4. Flujoograma del ensayo toxicidad aguda	38
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Conteo de nauplios muertos de <i>A. franciscana</i>	20
Tabla 2. Cálculo del porcentaje de efecto, valor probit y CL ₅₀	21
Tabla 3. Prueba de normalidad - porcentaje de inhibición	22
Tabla 4. ANOVA de grupos de estudio - porcentaje de inhibición	23
Tabla 5. IC ₅₀ por cada grupo de estudio	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de <i>A. franciscana</i> madura	7
Figura 2. Diferenciación morfológica de <i>A. franciscana</i> , desde el día 1 al 35	7
Figura 3. Clasificación de antioxidantes	10
Figura 4. Amplia gama de antioxidantes	10
Figura 5. Reacción del radical DPPH con donantes de átomos de hidrógeno	11
Figura 6. Porcentajes de inhibición, según órganos evaluados	22

RESUMEN

Objetivo: Determinar la toxicidad aguda y actividad antioxidante de los extractos de hojas y tallo de *Senna quinquangulata*. **Metodología:** Hojas y tallo recolectados por conveniencia, siendo utilizadas en la preparación de los extractos alcohólico e hidroalcohólico para evaluar toxicidad aguda a 10, 100 y 1000 ppm en nauplios de *Artemia franciscana*; extracto metanólico para evaluar actividad antioxidante por el método de DPPH probada a 1, 10, 25 y 50 mg/mL. **Resultados:** la prueba de toxicidad aguda mostró que todos los extractos evaluados presentan una $CL_{50} > 1000$ ppm y, por lo tanto, no fueron considerados tóxicos. En la actividad antioxidante, los extractos metanólicos de hojas y tallo de *S. quinquangulata* presentan un porcentaje de inhibición superior al 50% a concentraciones de 25 y 50 mg/mL. **Conclusión:** El extracto metanólico de *S. quinquangulata* - hojas obtuvo un $IC_{50}=13,42$ mg, siendo el de mejor actividad antioxidante.

Palabras clave: Actividad antioxidante, *Senna quinquangulata*, *Artemia franciscana*.

ABSTRACT

Objective: Determine the acute toxicity and antioxidant activity of the leaf and stem extracts of *Senna quinquangulata*. **Methodology:** Leaves and stem collected for convenience, being used in the preparation of alcoholic and hydroalcoholic extracts to evaluate acute toxicity at 10, 100 and 1000 ppm in nauplii of *Artemia franciscana*; methanolic extract to evaluate antioxidant activity by the DPPH method tested at 1, 10, 25 and 50 mg/mL. **Results:** the acute toxicity test showed that all the extracts evaluated have an $LC_{50} > 1000$ ppm and, therefore, were not considered toxic. In antioxidant activity, the methanolic extracts of leaves and stem of *S. quinquangulata* present a percentage of inhibition greater than 50% at concentrations of 25 and 50 mg/mL. **Conclusion:** The methanolic extract of *S. quinquangulata* - leaves obtained an $IC_{50}=13.42$ mg, being the one with the best antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant activity, *Senna quinquangulata*, *Artemia franciscana*.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, el 80 por ciento de las personas carecen de acceso a servicios en atención primaria en salud, ya sea porque están lejos de los centros médicos o porque no pueden adquirir los medicamentos recetados (1). Para estas poblaciones, las terapias alternativas son la principal forma de tratamiento y los principales fármacos (2-4).

El conocimiento de las plantas conlleva a que a menudo sean el único recurso terapéutico para muchas comunidades y pueblos rurales. Aún hoy, en las zonas periurbanas y urbano marginales más pobres del Perú, las plantas medicinales se venden en mercados abiertos, mercados populares y hasta se cultivan en los patios residenciales; por lo que, la especie elegida necesita ser valorada en la actividad que se dice poseer y que a su vez no sea tóxica (5).

El Perú alberga gran variedad de plantas medicinales y muchas de ellas requieren estudios científicos para respaldar sus usos tradicionales. La distribución y abundancia de las especies vegetales se ha visto alterada por el cambio climático, que prevé el riesgo de extinción de algunas de las mismas (6), esto se traduce en una pérdida del potencial etnofarmacológico, que es la comprensión de sus metabolitos. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo investigaciones fitoquímicas y evaluar los beneficios y principios activos que poseen para beneficio del ser humano (7).

El género *Senna* perteneciente a la familia Fabaceae presenta alrededor de 14 especies. La especie *Senna quinquangulata* habita en sitios húmedos y sombríos y presenta escasos estudios sobre sus efectos biológicos atribuidos, destacándose su uso como purgante, astringente, expectorante (8), sífilis, fiebre, gripe, infecciones oculares (9), bronquitis, asma, acné, eczema, diurético. Por lo tanto, determinar su actividad antioxidante es importante por ser una actividad conexas a otras actividades biológicas (10).

De acuerdo con los antecedentes químicos de las especies del género *Senna*, se conoce por su quimiotaxonomía que poseen flavonas y compuestos relacionados

(11) cuyo contenido es abundante; junto con alcaloides (12,13), cromonas (14), tetrahidroantracenos (15), lactonas (16), estilbenos (17-19) y triterpenos. Todos estos tipos de compuestos tienen representantes bioactivos.

Las actividades podrían estar relacionadas con la presencia de antioxidantes; porque son moléculas que interactúan antes o durante la reacción radicalaria en cadena, ya sea en la fase de inicio, propagación o finalización, entre otros; de ahí radica su importancia de estudio (20-21).

Es interesante para la comunidad científica determinar la actividad antioxidante, así como la toxicológica de la especie vegetal *S. quinquangulata* de la región Loreto; de manera que, su conocimiento tradicional empírico cuando quede demostrado, dará valor a la actividad farmacológica atribuida a especies del género *Senna* y abrirá la posibilidad de ser utilizada en la medicina convencional. Pero primero debe investigarse si los extractos de origen vegetal son inocuos.

Los nauplios de *Artemia franciscana*, son ampliamente utilizados para ensayos de toxicidad inicial en extractos y productos de origen natural con potencial biológico y su viabilidad es justificable debido a que los límites de los efectos tóxicos producidos en *A. salina* Leach son similares a los producidos en humanos (22).

Por otro lado, no se evidencia estudios reportados sobre toxicidad aguda en larvas de *Artemia*, ni de actividad antioxidante por el método 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) referidas a la especie estudiada, siendo esta la razón que nos motivó a determinar la toxicidad aguda y actividad antioxidante de los extractos de hojas y tallo de *Senna quinquangulata*.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

En 2022, se documentó miotoxicidad relacionada al consumo de *Senna cobanensis* en terneros. La investigación reveló una actividad elevada de Aspartato aminotransferasa (AST) y Creatina quinasa (CK-NAC) con daño del tejido muscular, así como con problemas motores como la paraplejía. La necrosis y la degeneración de las fibras musculares fueron evidentes a partir del análisis histológico. Se descartaron la intoxicación por ionóforos y otros factores miopáticos como la deficiencia de selenio. La investigación concluyó que *S. cobanensis* es otra especie que causa miotoxicidad en bovinos (23).

En 2021, se describieron los resultados clínicos y patológicos de un caso de intoxicación experimental por *Senna occidentalis* en cerdos alimentados con una dieta que contenía un 10 por ciento de vainas y semillas de *S. occidentalis* por un mes. La investigación determinó que los animales intoxicados presentaban letargia, ataxia, temblores musculares, pérdida de peso y decúbito. Los cerdos que recibieron *S. occidentalis* tenían significativamente más probabilidades de tener niveles elevados de la enzima creatina fosfoquinasa ($p < 0,05$). El trabajo concluyó que la intoxicación crónica por *S. occidentalis* en cerdos tiene un efecto miotóxico (24).

En 2019, se realizaron estudios de seguridad y capacidad para disminuir la inflamación aguda en ratones, a partir del extracto hidroalcohólico de hojas de *Senna alata* (L.) Roxb (EHSA) a concentraciones de 500, 1000, 2000, 5000 y 7500 mg/kg. La investigación determinó DL₅₀ en ratones y actividad antiinflamatoria en ratas; asimismo, se identificaron taninos, aminoácidos, alcaloides, flavonoides, azúcares reductores, esteroides y/o triterpenoides; la DL₅₀=7500 mg/kg. El trabajo concluyó que EHSA no era tóxico (19).

En 2019, se estudiaron los efectos tóxicos de la administración aguda y subaguda del extracto etanólico del fruto de *Cassia fistula* L. (CFE) en ratas Wistar macho. El estudio determinó toxicidad aguda a dosis única oral de CFE (1000, 3000 y 5000 mg/kg), determinando el comportamiento y la mortalidad de los animales hasta los

14 días; de manera similar, un estudio subagudo con dosis orales de CFE a 250, 500 y 1000 mg/kg durante 28 días. En sus resultados, la toxicidad aguda a 5000 mg/kg no indujo mortalidad ($DL_{50} > 5000$ mg/kg), mientras que la toxicidad subaguda a 1000 mg/kg no causó mortalidad. El trabajo concluyó que el fruto de *C. fistula* no produjo ningún efecto tóxico significativo en ratas macho, siendo una sustancia natural segura para uso terapéutico (25).

En 2018, se estudió envenenamiento por *Senna obtusifolia* en ovejas. La investigación determinó que 10 de 60 ovejas mostraron debilidad muscular y 9 murieron tras un periodo de manifestación clínica de 24-76 horas; las actividades de la creatina quinasa sérica aumentaron en todas las ovejas examinadas. Se observó degeneración necrosis muscular segmentaria y polifásica en los músculos esquelético; el trabajo concluyó que, aunque la planta es una mala hierba común en el noreste de Brasil, el envenenamiento es raro, probablemente porque los animales no lo ingieren debido a las variaciones en la toxicidad (26).

En 2017, se identificaron las principales especies tóxicas para la ganadería en el estado de Colima, México. La investigación identificó 62 especies, distribuidas en 57 géneros y 24 familias botánicas, principalmente las fabáceas con 11 especies y solanáceas con siete, los alcaloides se distribuyen con mayor presencia en las semillas. El trabajo concluyó que en todos los tipos de vegetación se presentan plantas tóxicas y estas causan mayores pérdidas en la ganadería colimense (27).

En 2017, se evaluaron la composición fitoquímica y capacidad antioxidante por DPPH de hojas de *Senna reticulata*. La investigación identificó eritritol, acetato de isoamilo y ácido L-piroglutámico como una mezcla, así como aislaron quercetina, hiperósido y camferol (informado por 1ra vez en ella). Los resultados en capacidad antioxidante establecieron para el extracto etanólico un $IC_{50}=96,1$ ppm, las fracciones de diclorometano un $IC_{50}=183,80$ ppm y acetato de etilo un $IC_{50}=265,10$ ppm, además del camferol un $IC_{50}=130$ ppm. El trabajo concluyó que el extracto, las fracciones y compuesto se consideran activos (28).

1.2 Bases teóricas

1.2.1 Familia Fabaceae

También conocida como leguminosas (Leguminosae) (29), es miembro del orden Fabales, que incluye árboles, arbustos y hierbas que son perennes y se reconocen fácilmente por sus frutos tipo legumbre. Esta familia, que consta de unos 730 géneros y 19480 especies, es la tercera más numerosa seguida de Asteraceae y Orchidaceae (30-31). Un 16 por ciento de las especies arbóreas en bosques neotropicales pertenecen a esta familia y son las más representativas de los bosques tropicales húmedos, secos de América y África (32).

Hasta hace poco había cierto debate sobre si la familia Fabaceae debían considerarse como una sola formada por tres subfamilias o como tres familias separadas. Se tiene información y pruebas moleculares como morfológicas que respaldan a las leguminosas como una sola familia (33).

Actividad farmacológica y biológica: La hoja de *Senna occidentalis* Link. presenta efecto depurativo, colagogo y laxativo, dado su composición química (34-35). La decocción de las hojas presenta actividad inhibitoria sobre *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes* (35). La hoja es el órgano con mayor actividad antimicrobiana (36) y antiinflamatorio a 1,000 mg/kg (37). El polvo administrado por vía intragástrica a una persona adulta a 10 mg/mL inhibe la hemólisis (36).

Toxicidad y estudios clínicos: Las hojas demuestran poseer actividad cardiotoxica en conejos, administrada por vía oral. Las vainas frescas son tóxicas para los cerdos y el ganado, mostrando síntomas de toxicidad hepática y renal (37-39). Contiene heterósidos antracénicos que son oxicóticos, razón por la que no deben administrarse en mujeres embarazadas (35), a menos que el objetivo sea facilitar el parto (34). El uso de esta planta requiere extrema precaución (34).

1.2.2 Toxicidad

Se refiere a la actividad tóxica específica de una sustancia, que está relacionada con su composición química y se vuelve exógena para un organismo (los llamados xenobióticos) debido a su interacción con moléculas endógenas (los llamados receptores) (40). Puede ser:

- Directo: la estructura primaria del xenobiótico provoca directamente efectos tóxicos.
- Indirecta: toxicidad provocada por el metabolito producido durante la metabolización (40).

Toxicidad aguda

Se define como una exposición a una sustancia química durante 24 horas (41).

La toxicidad aguda se refiere a las reacciones adversas que ocurren poco después de recibir una dosis única o varias dosis dentro de un período de 24 horas. En casos de ingestión accidental o envenenamiento, se usa una sola dosis para evaluar la potencia de una sustancia y se usan dosis múltiples para evaluar los efectos acumulativos de la sustancia (42).

El objetivo de la investigación de toxicidad aguda, es definir la relación dosis/respuesta que subyace en el cálculo de DL_{50} . La DL_{50} ayuda a determinar la toxicidad relativa de una sustancia al indicar la probabilidad estadística de que una dosis tenga un efecto letal en el 50 % de los animales de una población. El CL_{50} se utiliza para probar la letalidad en individuos sometidos a experimentación (42).

1.2.3 Artemia

Artemia (conocida como camarón de salmuera, monos marinos) es un grupo genérico de pequeños crustáceos marinos que incluyen varias especies de tamaño similar y morfología (43). *A. salina* es la especie más popular de este

tipo, encontrado por primera vez en la costa de Inglaterra y descrito por Carl Linnaeus en su *Systema Naturae* en 1758. En los EE.UU., dos especies son ubicuas: *A. franciscana* y *A. gracilis* (llamada “salmuera de Nueva Inglaterra”, “camarones”) (43). Estos organismos son cultivados industrialmente, exportado a todo el mundo; tiene un tamaño de 0,5 mm hasta 15 mm.

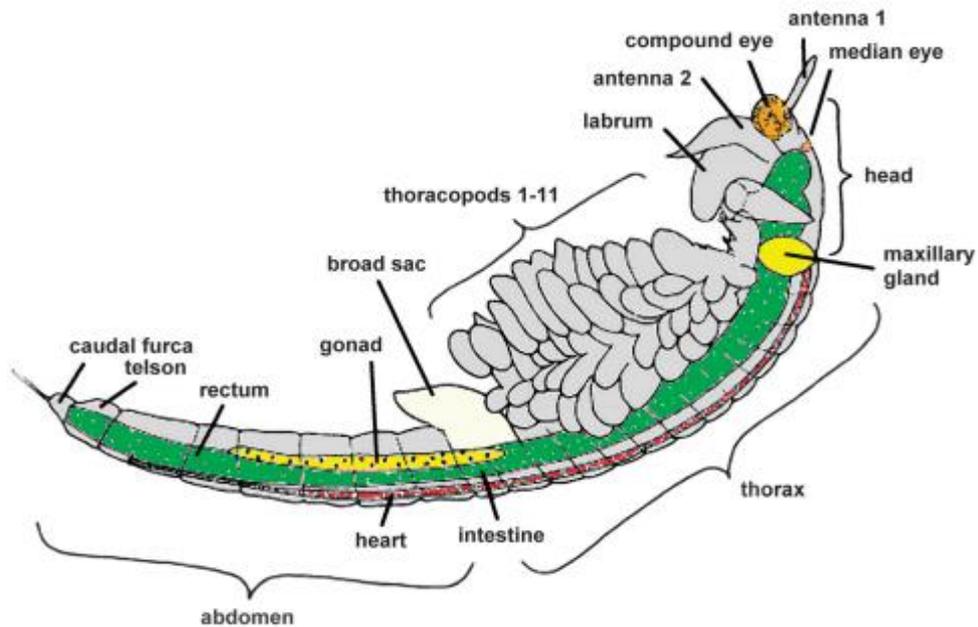


Figura 1. Anatomía de *A. franciscana* madura (43)

Reproducción y maduración de *Artemia*: se propaga por partenogénesis o reproducción sexual. En ambos casos, los embriones permanecen dentro de la hembra adulta (43).



Figura 2. Diferenciación morfológica de *A. franciscana*, desde el día 1 al 35 (43)

Artemia, es un grupo primitivo de artrópodos con tamaños entre 8 y 12 mm. Son endémicas de Asia, Europa, África y Australia. Son especies de reproducción sexual o bisexuales; pocas son poblaciones que se reproducen partenogenéticamente (44).

Artemia franciscana

Es la especie de camarón de salmuera dominante y más estudiada en el Nuevo Mundo, se encuentra en el noreste de Brasil como resultado de inoculaciones realizadas en estanques de sal de Macao (Rio Grande do Norte) en abril de 1977 con quistes de un stock de la Bahía de San Francisco (45).

Estado de conservación:

Los "monos marinos" ampliamente distribuidos (a nivel mundial) de las tiendas de acuarios con alta tolerancia a la salinidad y la calidad del agua (45).

Clasificación:

Pertenece al reino Animalia, clase Branquiópodos, familia Artemiidae, género *Artemia* (45).

Ecología y ciclo de vida:

Puede reproducirse sexualmente (xygogenéticamente) con sexos separados y apareamiento obligado entre hembra y macho, o partenogenéticamente donde las hembras no se aparean con sus machos y las crías son casi exclusivamente hembras. Campos-Ramos y colaboradores en el año 2003, encontraron lotes comerciales de quistes de Great Salt Lake (Utah) que contenían dos especies diferentes de camarones en salmuera; una partenogenética (60%) y una zigogénica (*A. franciscana*) (40%); lo que implica que la *Artemia* partenogenética es nativa de Great Salt Lake o se introdujo en Great Salt Lake (45).

1.2.4 Antioxidantes

Son sustancias, ya sean orgánicas o sintéticas, que pueden detener o posponer ciertos tipos de daño celular (46).

Clasificación:

Existen diferentes atributos para clasificar los antioxidantes. En mérito a su función:

- Antioxidantes primarios: son antioxidantes que interactúan con los radicales lipídicos y rompen las cadenas que los convierten en productos más estables. Los fenoles pertenecen a este grupo; según su estructura incluyen: minerales antioxidantes, vitaminas antioxidantes y fitoquímicos que incluyen: flavonoides, catequinas, carotenoides, β -caroteno, licopeno, diterpeno, pimienta negra, tomillo, ajo y sus derivados (47).
- Antioxidantes secundarios: son compuestos fenólicos que sirven para atrapar los radicales libres y detener las reacciones en cadena. Los compuestos incluyen: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y galato de propilo (PG).

El segundo atributo se basa en: (48)

- Antioxidantes enzimáticos: se producen internamente e incluyen enzimas, moléculas cuyo peso molecular es bajo, además de cofactores de enzimas.
- Antioxidantes no enzimáticos: muchos provienen de fuentes dietéticas. La clase más grande de antioxidantes dietéticos son los polifenoles, consistente en ácidos fenólicos y flavonoides. Otros antioxidantes dietéticos incluyen: vitaminas, carotenoides, organosulfurados y minerales.

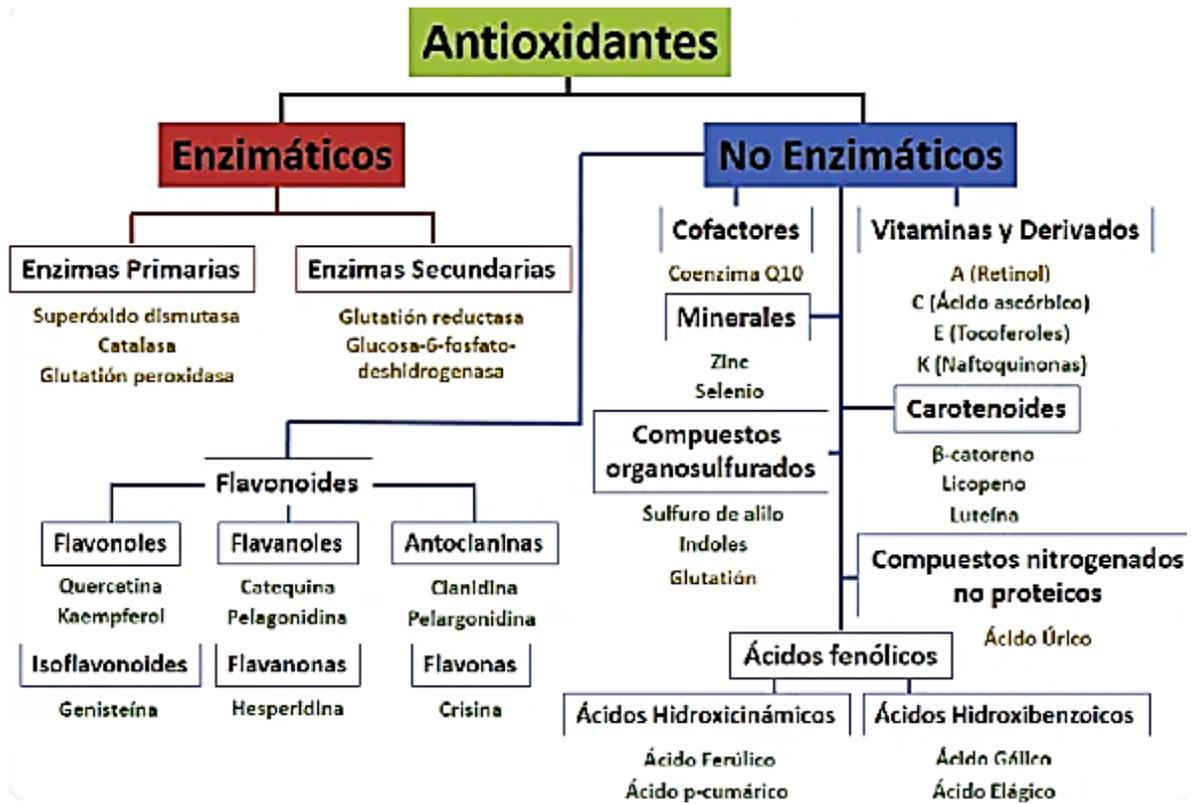


Figura 3. Clasificación de antioxidantes (49)

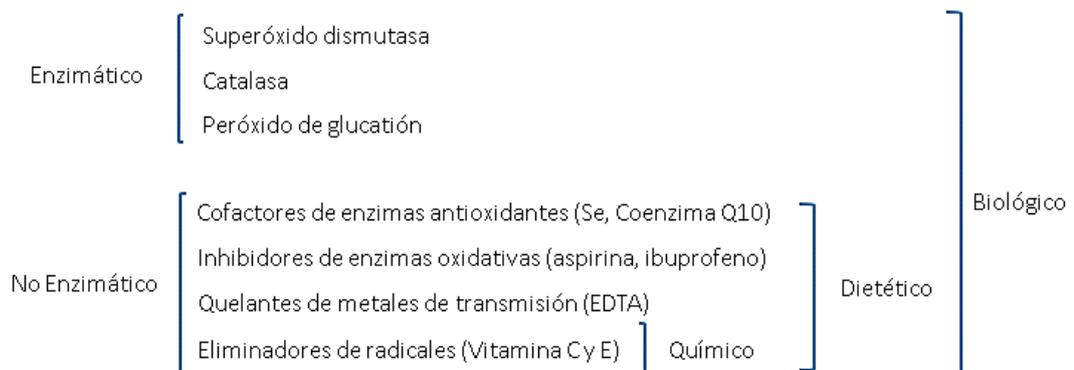


Figura 4. Amplia gama de antioxidantes (50)

Radicales libres:

Moléculas altamente inestables formadas naturalmente al hacer ejercicio y cuando su cuerpo convierte los alimentos en energía. Los radicales libres proceden de diversas fuentes ambientales: humo de cigarro, contaminación del aire y la luz solar. El "estrés oxidativo" es el resultado de los radicales libres (46).

Estrés oxidativo:

Es el proceso que tiene el potencial de causar deterioro celular. Entre las enfermedades afectadas por el estrés oxidativo, se encuentran el cáncer, afecciones cardiovasculares, diabetes, Alzheimer, Parkinson y afecciones oculares (cataratas y degeneración macular) relacionadas con la edad (46).

Métodos para determinar actividad antioxidante:

- **Métodos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)**

Ensayo de DPPH: es uno de los métodos más fáciles y más utilizados. Ha sido desarrollado para medir la capacidad antioxidante principalmente en extractos de plantas y alimentos (51). Este método utiliza un compuesto orgánico comercialmente disponible: DPPH, este es un radical cromógeno estable causado por la deslocalización de electrones en todas las moléculas. Esta deslocalización de electrones se manifiesta en violeta en solución etanólica/metanol que absorbe radiación con la misma longitud de onda que emite el radical DPPH (517 nm) (52-53). El ensayo está basado en donar un átomo de hidrógeno de antioxidantes al radical DPPH para transformarlo en una forma no radical.

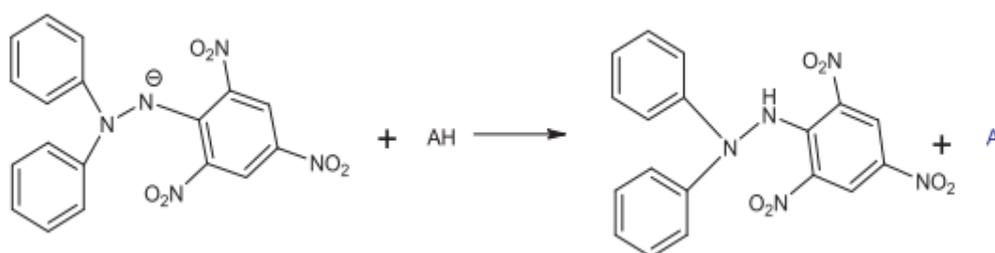
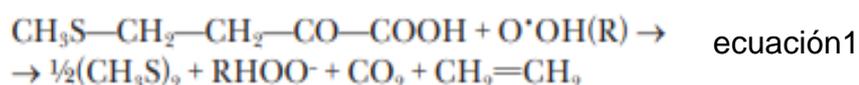


Figura 5. Reacción del radical DPPH con donantes de átomos de hidrógeno (54)

La reacción se asocia con la decoloración de una solución de color azul a amarillo pálido como señal de la actividad antioxidante potencial de la muestra (54).

Fundamento de la técnica DPPH: molécula estable soluble en metanol, presenta color violeta intenso con un máximo de absorción a 515 nm. Los antioxidantes (AH) u otras especies de radicales (R radical punto) puede reaccionar con este radical estable (DPPH radical punto) al proporcionar un electrón o un átomo de hidrógeno, reduciéndolo a 2,2-difenil-1-hidrazina (DPPH-H) o una hidracina análoga sustituida (DPPH-R) caracterizada por un color incoloro o amarillo pálido que puede monitorearse con facilidad en espectrofotómetro UV-Visible. Este ensayo se usa ampliamente para determinar la actividad antioxidante de extractos crudos o compuestos purificados de plantas (55).

Ensayo TOSC (Total Oxyradical Acavenging Capacity): este método se puede utilizar para monocomponentes antioxidantes y también en complejos como tejidos o fluidos biológicos en el cuerpo. La prueba TOSC se basa en la reacción entre radicales libres, especialmente oxirradicales (peroxilo, radicales hidroxilo y peroxinitrito) (56), y ácido α -ceto- γ -metilbutírico (KMBA) para formar el compuesto orgánico más simple conocido como eteno (ecuación 1):

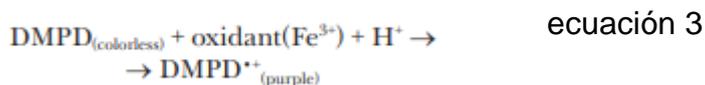


Cada radical se obtiene en una manera diferente, mientras que la generación de radicales peroxilo y peroxinitrito requiere el procesamiento térmico del dicloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (ABAP) y 3-morfolinosidnonimina N-etilcarbamida, respectivamente, la formación de hidroxilo radicales se ejecuta a través de la reacción de Fenton (57).

Ensayo DMPD (N1, N1-dimetil-1,4-fenilendiamina): como en el caso del ensayo DMPD, se reducen los oxidantes en las muestras y se evalúa el cambio de color espectrofotométricamente (ecuación 2).



Primero el radical DMPD•+ se forma mezclando una solución de DMPD en tampón de acetato y férrico cloruro FeCl₃ (ecuación 3) (58).



La solución preparada de color rojo del catión DMPD se deja reposar a temperatura de 20 – 25°C durante 12 horas antes de ser utilizado para evaluar la actividad antioxidante de la muestra (59-60), siendo legible a 515 nm (61).

1.3 Definición de términos básicos

- Nauplio: larvas recién nacidas que se pueden distinguir por la falta de segmentos corporales y por presentar gran cantidad de reservas vitelinas (62).
- *Artemia*: diminutos camarones con un cuerpo marrón suave que es transparente a la luz. En inglés, también se los conoce como "monos marinos" o "camarones de salmuera" (62).
- CL₅₀: se basa en encontrar la concentración en la cual bajo ciertas condiciones, el 50 % de las larvas de *Artemia* mueren en 24 horas (63).
- Toxicidad aguda: se define como un efecto desfavorable (letal o subletal) causado por exposición a una sustancia de prueba en un determinado tiempo, generalmente unos pocos días (64).
- Extracto alcohólico: sustancia creada a partir de materia vegetal deshidratada por maceración en etanol, seguida de la eliminación física del solvente (65).
- Extracto hidroalcohólico: solución a base de materia vegetal deshidratada que se obtiene por percolación con etanol y agua, seguida de la eliminación física del disolvente (65).

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. Formulación de hipótesis

Los extractos alcohólico e hidroalcohólico de hojas y tallo de *S. quinquangulata* no presentan toxicidad aguda en nauplios de *Artemia franciscana*, además el extracto metanólico presenta actividad antioxidante por DPPH.

2.2. Variables y su operacionalización

2.2.1 Variable independiente:

Extracto alcohólico e hidroalcohólico: solución rica en compuestos extraídos a partir de material botánico.

2.2.2 Variable dependiente:

Toxicidad aguda en nauplios de *A. franciscana*: efecto adverso (letal o subletal) causado por una sustancia sobre los organismos de prueba durante un periodo de exposición normalmente de pocos días.

Actividad antioxidante *in vitro*: prueba aplicada para determinar el potencial antioxidante que presentan los extractos de las especies vegetales.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Tipo por su naturaleza	Indicador	Escala de medición	Categorías	Valores de las categorías	Medio de verificación
<u>Independiente</u> Extracto alcohólico e hidroalcohólico de hojas y tallo de <i>S. quinqueangulata</i>	Proceso de maceración en etanol, etanol: agua, durante siete días; se obtiene una solución que contiene metabolitos secundarios, la misma que es filtrada, concentrada y secada en estufa antes de evaluarla.	Cuantitativa	Concentración de extractos	Razón			Hoja de reporte analítico
<u>Dependiente</u> Toxicidad aguda en nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	Ensayo que determina el efecto letal o sub letal de exposición a una sustancia de prueba en un determinado tiempo (CL ₅₀).	Cuantitativa	CL ₅₀	Razón	Tóxico No tóxico	1-1000 ppm > 1000 ppm	Hoja de reporte analítico
<u>Dependiente</u> Actividad antioxidante <i>in vitro</i> .	Ensayo dirigido a medir la inhibición de radicales libres que presenta una muestra y es expresada como IC ₅₀ .	Cuantitativa	Capacidad de inhibición de radicales libres al 50%	Razón	Presenta actividad No presenta actividad	>50% <50%	Hoja de reporte analítico

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Tipo y Diseño

Tipo de estudio: experimental, porque las variables fueron controladas deliberadamente para delimitar relaciones entre ellas.

Diseño: analítico, dado que se puso a prueba una hipótesis. El área de estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, calle Pevas cuadra cinco, ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto.

3.2 Diseño muestral

La población de estudio: constituida por todos los arbustos *S. quinquangulata* presentes en el km. 24 de la carretera Iquitos – Nauta. Tamaño de la muestra: dos kilogramos de hojas y tallo de la especie vegetal en buen estado de conservación. Muestreo: por conveniencia y geo-referenciado (3°57'46" S 73°24'54" O). Los criterios de inclusión, consideraron arbustos de *S. quinquangulata* con hojas enteras y sanas; tallo en buen estado de conservación; se excluyeron hojas rotas y agrietadas, además de aquellas que evidenciaron contaminación.

3.3 Procedimiento de recolección de datos

A) Obtención de la muestra vegetal

- a.1) La recolección de especies vegetales, se llevó a cabo con tijeras de podar; se cortaron cantidad suficiente de los órganos (hojas, tallos) de las especies vegetales, se almacenaron en sobres manila con su respectivo identificativo.
- a.2) Limpieza y preparación: se limpiaron el tallo y las hojas, antes de cortarlas en trozos pequeños. Para la identificación y certificación, se eligieron al mismo tiempo hojas y tallos en buen estado.

- a.3) El Herbario Amazonense de la UNAP, certificó la especie vegetal y entregó un certificado de identificación.
- a.4) Secado y micropulverización: una vez limpia la especie vegetal, se llevó a un ambiente de secado a 40 °C por una semana. Después, se realizó la molienda quedando en polvo. El material micropulverizado se mantuvo en frascos de vidrio ámbar.

B) Obtención de extractos

- b.1) Extracto alcohólico: se agregaron 100 mL de etanol de 96° a 10 g de material vegetal. Posteriormente, se sometió a maceración por siete días. Luego, se filtró el extracto macerado y se concentró en rota vapor a 40° C por 40 rpm. El extracto obtenido, se colocó en estufa a 40°C hasta sequedad y luego se refrigeró para su uso en las pruebas pertinentes (65).
- b.2) Extracto hidroalcohólico: se pesó 10 g de material vegetal, se agregó 70mL de alcohol de 96° más 30 mL de agua destilada (7:3). Después, se maceró por 7 días, posterior a ello se filtró y se concentró en rota vapor a 40° C, a 40 rpm. El extracto obtenido, se mantuvo en estufa a 40°C hasta sequedad y posteriormente refrigerado para su uso en los respectivos ensayos (65).

C) Toxicidad aguda en nauplios de *A. franciscana*

c.1) Proceso de experimentación

Huevos de *A. franciscana*, eclosionaron hasta su estadio de nauplios.

Condiciones de mantenimiento de los camarones de experimentación: se preparó una solución Instant Ocean (IO) al 3 por ciento. De esta solución preparada, se extrajo 30 mL, se agregaron 100 mg de huevos de *A. franciscana*, dejándose reposar por 15 minutos. Después, se agregó 370 mL de solución IO para su hidratación a 25°C durante una hora. Luego, se colocó un pelele acuario (motor que da aireación) dentro del vaso de precipitado; además se colocaron 02 lámparas de 20 watts a menos de 5 cm de cada

lado del frasco para una iluminación uniforme. Incubación a temperatura de 25°C durante 48 horas (66).

c.2) Condiciones ambientales para los quistes de experimentación

Fueron monitoreados a través de un medidor de T° en el laboratorio entre 22 y 25° C con iluminación continua.

c.3) Tratamiento y evaluación de grupos experimentales

Se apagó el peleele y una de las lámparas de luz a fin de que los nauplios se congreguen para el lado iluminado del vaso precipitado. Después, se etiquetaron 05 columnas de tubos de ensayos: A, B, C, D, E respectivamente. Cada columna, tuvo tres filas de tubos: A1-A3, B1-B3, C1-C3 conteniendo los nauplios con el extracto a evaluar (son los grupos experimentales a diferentes concentraciones 10, 100 y 1000 ppm). Los tubos de ensayos D1-D3 fueron los controles negativos con presencia de nauplios e IO 3% agregada; los tubos de ensayos E1-E3 fueron controles positivos en el que se añadieron una solución de 400 ppm de $K_2Cr_2O_7$. Cada tubo de ensayo contuvo 6 mL de las soluciones correspondientes. Luego, se pipeteó del vaso de precipitado 25 nauplios y colocados en cada tubo de ensayo, posteriormente se cubrió con papel de aluminio (a todos los tubos de ensayo) y se colocó lámparas de 20W a ambos costados por 24 horas (66).

c.4) Determinación cuantitativa de supervivencia de nauplios

Después de la exposición de los nauplios frente al extracto evaluado durante 24 horas, estos se contaron. Se transfirió el contenido de todos los tubos de ensayo (de uno en uno) a una placa de cultivo de tejidos de 12 pocillos, después se enjuagó el tubo con una pequeña cantidad de agua (si es necesario) para garantizar que todos los camarones son transferidos. Los nauplios se contaron bajo un equipo de video de alta resolución; se registró el número de nauplios vivos y muertos (66) (Anexo 2).

D) Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*

Se llevó a cabo la técnica descrita por Villaño *et al.* (67), utilizándose el radical libre DPPH con una pureza del 99,9%.

Se preparó 10 mL de solución DPPH a 1mMol usando metanol puro, con posterior homogenización en baño maría con sonicador, de donde se obtuvo una solución madre de 1 mM de DPPH. A partir de esta última, se preparó una solución de trabajo a 0,1 mM de DPPH (67).

Luego de la pesada de 5 g de muestra, se agregaron 100 mL de metanol, obteniéndose una solución madre a 50 mg/mL. A partir de esta solución se crearon soluciones de trabajo a 1, 10, 25 y 50 mg/mL, con posterior reposo por 30 minutos antes del análisis. Después, se agregó en cubetas de poliestireno 0,025 mL de los extractos por cada concentración evaluada más 0,975 mL de DPPH 0,1 mMol. Las lecturas de las absorbancias se realizaron en un espectrofotómetro UV/Vis a una λ de 517 nm. Cada absorbancia fue leída cada 30 s por 5 minutos. La inhibición del secuestro radical DPPH por soluciones crecientes de los extractos, se determinó por la expresión siguiente: (67)

$$(\%Inh\ DPPH) = \frac{Abs\ control - Abs\ muestra}{Abs\ control} \times 100$$

Instrumento: Hoja de reporte analítico

3.4 Procesamiento y análisis de la información

Con la herramienta de análisis Probit con intervalos de confianza (IC) del 95 por ciento, la mortalidad de los nauplios de salmuera se representó frente a los logaritmos de las concentraciones (66,68). Cuando el 50% de los nauplios perecieron dentro de las 24 horas de entrar en contacto con el extracto evaluado, se registró como actividad biológica presente. Para la actividad antioxidante, los datos fueron presentados en gráfico y tablas obtenidos del programa SPSS versión 24. Para determinar diferencias significativas entre tratamientos se aplicó ANOVA.

3.5 Aspectos éticos

No es aplicable porque esta investigación no involucra a ningún sujeto humano.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

Toxicidad aguda

Tabla 1. Conteo de nauplios muertos de *A. franciscana*

Especie vegetal	Tipo de extracto	[]	Nauplios de Artemia	
			Total	Muertos
<i>S. quinquangulata</i> - hojas	Alcohólico	10 ppm	75	11
		100 ppm	75	8
		1000 ppm	75	6
		I.O. 3% (-)	75	0
		K ₂ Cr ₂ O ₇ 400 ppm (+)	75	75
<i>S. quinquangulata</i> - hojas	Hidroalcohólico	10 ppm	75	10
		100 ppm	75	7
		1000 ppm	75	3
		I.O. 3% (-)	75	0
		K ₂ Cr ₂ O ₇ 400 ppm (+)	75	75
<i>S. quinquangulata</i> – tallo	Alcohólico	10 ppm	75	12
		100 ppm	75	10
		1000 ppm	75	2
		I.O. 3% (-)	75	0
		K ₂ Cr ₂ O ₇ 400 ppm (+)	75	75
<i>S. quinquangulata</i> – tallo	Hidroalcohólico	10 ppm	75	14
		100 ppm	75	8
		1000 ppm	75	5
		I.O. 3% (-)	75	0
		K ₂ Cr ₂ O ₇ 400 ppm (+)	75	75

Tabla 1, muestra la cantidad de nauplios muertos por cada órgano (hoja y tallo), según el extracto evaluado.

Tabla 2. Cálculo del porcentaje de efecto, valor probit y CL₅₀

Espece vegetal según tipo de extracto	[] ppm	Log []	% efecto	Probit	CL ₅₀
<i>S. quinquangulata</i> – hojas (alcohólico)	10	-2,00	15	3,96	> 1000 ppm
	100	-1,00	11	3,77	
	1000	0,00	8	3,59	
<i>S. quinquangulata</i> – hojas (hidroalcohólico)	10	-2,00	13	3,87	
	100	-1,00	9	3,66	
	1000	0,00	4	3,25	
<i>S. quinquangulata</i> – tallo (alcohólico)	10	-2,00	16	4,01	
	100	-1,00	13	3,87	
	1000	0,00	3	3,12	
<i>S. quinquangulata</i> – tallo (hidroalcohólico)	10	-2,00	19	4,12	
	100	-1,00	11	3,77	
	1000	0,00	7	3,52	

Tabla 2, muestra que todos los extractos evaluados presentan una CL₅₀ > 1000 ppm, es decir, no son considerados tóxicos.

Actividad antioxidante

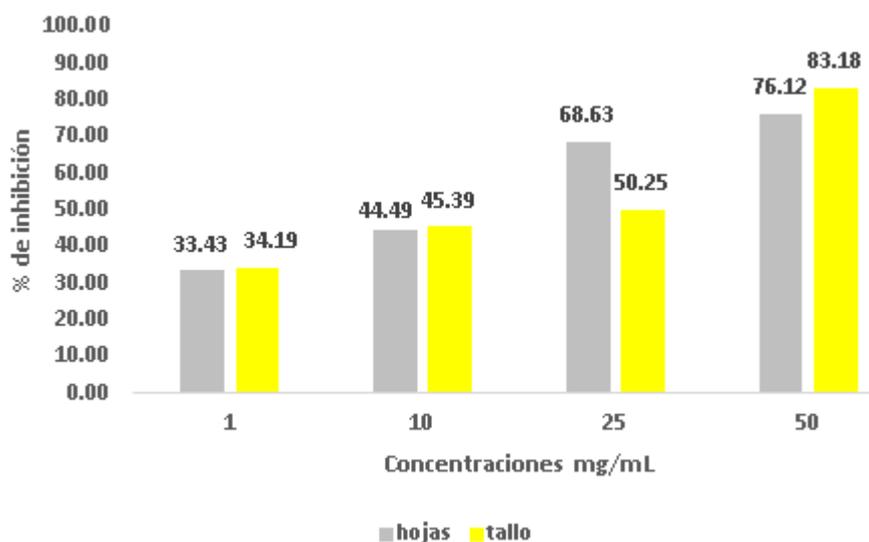


Figura 6. Porcentajes de inhibición, según órganos evaluados

La Figura 6 demuestra que tanto las hojas como el tallo de *S. quinquangulata* presentan un porcentaje de inhibición superior al 50% a concentraciones de 25 y 50 mg/mL. Se considera que estos valores tienen actividad antioxidante.

Tabla 3. Prueba de normalidad - porcentaje de inhibición

Grupo de estudio	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.
<i>S. quinquangulata</i> - hojas	0,923	4	0,552
<i>S. quinquangulata</i> - tallo	0,894	4	0,401

La tabla 3 demuestra que todos los grupos exhiben normalidad, luego de comparar los valores de sig = 0,552 (55,20%) y sig= 0,401 (40,10%) ambos mayores que el valor de $\alpha = 0,05$ (5%).

Tabla 4. ANOVA de grupos de estudio - porcentaje de inhibición

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	11,664	1	11,664	0,028	0,874
Dentro de grupos	2535,642	6	422,607		
Total	2547,307	7			

La tabla 4, muestra que sig.=0,874 siendo mayor al valor $\alpha=0,05$, el porcentaje de inhibición no presenta una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio.

Tabla 5. IC₅₀ por cada grupo de estudio

Grupos de estudio	IC ₅₀
<i>S. quinquangulata</i> - hojas	13,42 mg
<i>S. quinquangulata</i> - tallo	24,23 mg

La Tabla 5 muestra que *S. quinquangulata* - hojas obtuvo un IC₅₀=13,42 mg considerándose activo y el de mejor actividad antioxidante.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

El género *Senna* pertenece a la familia de las Fabaceae y comprende alrededor de 250 a 300 especies aceptadas ampliamente dispersas en las regiones tropicales y subtropicales; se usa ampliamente en África, Asia, Europa y América Latina, algunas especies de *Senna* son bien conocidas por sus actividades antimicrobianas y antiinflamatorias con base en la medicina tradicional para tratar la diabetes, las infecciones microbianas, la malaria y otras dolencias (69).

Un grupo crucial de crustáceos es la *Artemia*, que se utiliza en la acuicultura como alimento vivo y como modelo de prueba de toxicidad (44). *Artemia* se ha investigado en una variedad de campos, incluida en la producción de alimentos para peces o mariscos (61-62), como organismo modelo para las evaluaciones de toxicidad (70-73) y para determinar los efectos de varios factores ambientales (74).

El conteo de nauplios muertos de *A. franciscana* por cada órgano evaluado (hoja y tallo) se muestra en la tabla 1. La tabla 2 demuestra que ninguno de los extractos evaluados es considerado tóxico, debido a que presentan una $CL_{50} > 1000$ ppm. En este sentido, la presente investigación guarda relación con el trabajo realizado en 2019 (19), en el que la muestra hidroalcohólica de hojas de *Senna alata* (L.) Roxb presentó una $DL_{50}=7500$ mg/kg, considerándose como no tóxico. De igual manera, se relaciona con la investigación del 2019 (25), donde el extracto etanólico del fruto de *Cassia fistula* L. evaluada en ratas Wistar macho mostró un $DL_{50} > 5000$ mg/kg, siendo una sustancia natural segura para uso terapéutico.

Senna está evolucionando como una de las plantas importantes que han sido ampliamente estudiadas por sus efectos beneficiosos. Varias partes de las especies de *Senna*, incluidas la raíz, el tallo, las hojas y la flor, se encuentran ricas en numerosos fitoquímicos. Los experimentos *in vitro*, *in vivo* y clínicos establecen que los extractos de las plantas de *Senna* tienen diversos efectos beneficiosos al actuar como un fuerte agente antioxidante y antimicrobiano (69).

La representación de la figura 6 de los resultados de la actividad antioxidante, demuestra que a concentraciones de 25 y 50 mg/mL, las hojas y el tallo de *S. quinquangulata* muestran un porcentaje de inhibición superior al 50%. El análisis ANOVA del porcentaje de inhibición de los grupos de estudio, que se presenta en la tabla 4, demuestra que sig.=0,874 es mayor al valor $\alpha=0,05$; por tanto, no presenta una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio. Los resultados de *S. quinquangulata* - hojas obtuvieron una $IC_{50}=13,42$ mg se diferencia del estudio realizado en el 2017 (28), donde el extracto etanólico obtuvo un $IC_{50}=96,1$ ppm considerándose activo.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

- El ensayo de toxicidad aguda, descrita en la tabla 2, muestra que todos los extractos evaluados presentan una $CL_{50} > 1000$ ppm, es decir, no fueron considerados tóxicos.
- La figura 6 demuestra que tanto las hojas como el tallo de *S. quinquangulata* presentan un porcentaje de inhibición superior al 50% a concentraciones de 25 y 50 mg/mL. Se considera que estos valores presentan actividad antioxidante.
- La tabla 5 muestra que *S. quinquangulata* - hojas muestra una menor $IC_{50}=13,42$ mg considerándose el de mejor actividad antioxidante.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Será de vital importancia realizar estudios de toxicidad crónica *in vivo* a fin de determinar la seguridad e inocuidad de ambos extractos.
- Para encontrar el principio activo responsable de la actividad antioxidante, según el método DPPH, también será conveniente fraccionar los extractos de *S. quinquangulata* (hojas).
- A la comunidad loreтана, concientizando sobre el uso correcto de los diferentes órganos de la especie vegetal, la misma que evitará posibles intoxicaciones a concentraciones mayores a lo evaluado en esta investigación.
- A la Facultad de Farmacia y Bioquímica, cuyo grupo de investigadores pueda realizar estudios adicionales sobre la especie mediante el uso de técnicas analíticas, que permitan la identificación y/o aislamiento de metabolitos secundarios con potencial farmacológico.

CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Damechki M, Sotiropoulou S, Tsimidou M. Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils. *Grasas y aceites*. 2007; 52:207–213.
2. Oroian M, Escriche I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res Int*. 2015; 74:10–36.
3. Hayes AW. *Principes and methods of toxicology*. 3ra edición. New York: Raven Press.1994.
4. Rafecas M. Antioxidantes para una mejor calidad de vida. *Acofar*. 2006; 454:28-30.
5. Berdahl DR, Nahas RI, BarrenJP. *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*; Elsevier, 2010.
6. Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, *et al*. Extinction risk from climate change. *Nature*. 2004; 427:145-148.
7. Barrón R. García M, Soto M, Colinas T, Geoffrey K. Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Rev. Fitotec. Mex*. 2011;34(3):151-157.
8. Duke JA, Ayensu ES, *Medicinal Plants of China*. Referen. Publications. 1985; (1):221-223.
9. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*, Berne Convention. E.&S. Livingstone Ltd. (1962), pp.566-574.
10. Albert Y. Leung. (1980) *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetic*, John Wiley & Song, New York.
11. Wagner H, El-Sayyad SM, Seligmann O, Chari VM. Chemical constituents of *Cassia siamea* Lam. *Planta Médica*. 1978; 33(3): 258-261.
12. El-Sayyad SM, Ross SA. A phytochemical study of some *Cassia species* cultivated in Egypt. *Journal of natural products*. 1983; 46(3):431-432.
13. Valencia E, Valenzuela E, Barros E, Hernandez M, Lazo C, Gutierrez C, Gonzalez-coloma A, Gonzalez AG, Bermejo J. Estudio fitoquímico y Actividad antialimentaria de *Senna stipulaceae*. *Bol. Soc. Chil*. 2000; 45(2):299.
14. Arora S, Deymann H, Tiwari RD, Winterfeldt E. A new chromone from *Cassia siamea* Tetrahedron. *Planta médica*. 1971; 27:981-984.

15. Takahashi S, Takido M, Sankawa M, Shibata S. Germitorosone and methylgermitorosone, two hydroanthracene derivatives from seedlings of *Cassia torosa*. *Phytochemistry*. 1982; 21(2):425-427.
16. Kitanaka S, Takido M. Studies on the constituents of the seeds of *Cassia obtusifolia*: The structures of two new lactones, isotoralactone and cassialactone. *Phytochemistry*. 1981; 20:1951-1953.
17. Barba B, Diaz JG, Goedken VL, Herz W, Dominguez XA. Unusual cassanes from a *Chamaecrista* species. *Tetrahedron*. 1992; 48:4725-4732.
18. Barba B, Diaz JG, Herz W. Anthraquinones and other constituents of two *Senna* species. *Phytochemistry*. 1992; 31:4374-4375.
19. Tasayco Yataco NJ, Álvarez Flores HR, Pizarro Carrasco J, Vega Silva L, Gaspar Maquera K, García Campos C. Seguridad y efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senna alata* (L.) Roxb (dormilona) en ratas con inducción a inflamación aguda. 2019. Disponible en: <http://repositorio.unid.edu.pe/bitstream/handle/unid/36/2%20Art%C3%ADcul%20S.%20alata%20-%20antiinflamatorio%202019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
20. Cardoso CL, Silva HS, Castro-Gamboa Ian, Bolzani VS. New Biflavonoid and Other Flavonoids from the Leaves of *Chimarrhis turbinata* and their Antioxidant Activity. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 2005; 16:1353-1359.
21. Amaral EA, Silva RM. Avaliação da toxicidade aguda de Angico (*Anadenanthera falcata*), Pau-Santo (*Kilmeyera coreacea*), Aroeira (*Myracrodruon urundeva*) e Cipó-de-São-João (*Pyrostegia venusta*), por meio do bioensaio com *Artemia salina*. *Perquiêre – Revista Eletrônica da Pesquisa*. 2008; 5(5).
22. Zhou L, Elias RJ. Antioxidant and pro-oxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: Influence of pH and phenolic concentration. *Food Chem*. 2013; 138(2-3):1503-1509.
23. Vargas-Muñoz C, Vargas-Muñoz M, Sánchez-Chaves L, Alfaro-Alarcón A, Alpízar-Solís C, Luna-Tortós C. Intoxicación por *Senna cobanensis* en terneros cebuinos: Primer reporte de caso. *Rev. Ciencias veterinarias*. 2022; 41(1):1-14.
24. MV Chhileski GS. Alteraciones musculares producidas por la intoxicación experimental con vainas y semillas de *Senna occidentalis* en cerdos. [Trabajo

- final integrador] La plata: Universidad Nacional de la Plata (2021). Disponible en:
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/134166/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y Fecha de acceso: 20 abril 2023.
25. Rizwana A, Riaz M. Acute and sub-acute oral toxicity of ethanol extract of *Cassia fistula* fruit in male rats. *Avicenna J Phytomed.* 2019; 9(2):117-125.
 26. Édipo M, Campos LÂ, Maia GO, Nascimento EM, Diego B. Melo AF, Dantas M, Riet-Correa F. Poisoning by *Senna obtusifolia* in sheep. *Pesq. Vet. Bras.* 2018; 38(8):1471-1474.
 27. Román-Miranda ML, Mora-Santacruz A, González-Cueva G. Principales plantas tóxicas para el ganado en el Estado de Colima. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias.* 2017; 4(11):33-38.
 28. Matulevich-Peláez JA, Castrillón-Carona WF, Chitiva-Chitiva LC. Estudio fitoquímico y evaluación de la capacidad antioxidante de hojas de *Senna reticulata* obtenidas en la región andina colombiana. *Revista científica.* 2017; 29(2):149-163.
 29. International Code of Botanical Nomenclature. En su artículo 18, inciso 5.
 30. Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. *Plant systematics: a phylogenetic approach*, Sinauer Axxoc. (2002). pp 287-292.
 31. Stevens PF. (2001 en adelante). «Fabaceae». *Angiosperm Phylogeny Website. Versión: 7 de mayo de 2006* (en inglés). Consultado el 28 de abril de 2022.
 32. Magallón SA, Sanderson MJ. «Absolute diversification rates in angiosperm clades» (pdf). *Evolution* (en inglés). 2001; 55(9):1762-1780.
 33. Lewis G, Schrire B, MacKinder B, Lock M. (eds). 2005. *Legumes of the world.* Royal Botanical Gardens, Kew, UK.
 34. Pousset JL (1989). *Plantes medicinales Africaines.* ACCT. Paris-France. pp 156.
 35. Gupta MP (Ed.). (1995). *270 plantas medicinales Iberoamericanas.* Editorial Presencia Ltda. Santa Fé de Bogotá-Colombia. pp 364-366.
 36. Del Águila JR, Cáceres A. (1992). Estudio integral de la actividad antimicrobiana de *Cassia occidentalis* L. y *Cassia grandis*. *Plantas usadas popularmente en el tratamiento de afecciones cutáneas.* Fondos de

- Información. Universidad de San Carlos de Guatemala. Fac. Cien. Quím. & Farmacia.
37. Sadique J, Chandra T, Thenmozhi V, Elango V. Biochemical modes of action of *Cassia occidentalis* and *Cardiospermum halicacabum* in inflammation. *J Ethnopharmacology*. 1987; 19(2):201-212.
 38. Gupta M, Santana AI, Espinosa A. Plantas medicinales de Panamá. *Indian J. Pharm.* 1966; 29(9):248-250.
 39. O'hara PJ, Pierce KR. Toxic cardiomyopathy caused by *Cassia occidentalis*. II Biochemical study in poisoned rabbits. *Vet. Pathol.* 1974; 11:110.
 40. Cordero M. Introducción a la Toxicología. 2018. Disponible en: <https://cutt.ly/KwnhdYf>
 41. Acute toxicity. Illustrated toxicology, 2018. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/acute-toxicity>
 42. Avaliação da Toxicidade. Toxicidade aguda. Disponible en: <http://tics.ifsul.edu.br/matriz/conteudo/disciplinas/toxa/ua/5/3.html>
 43. Abatzopoulos TJ, Beardmore JA, Clegg JS, Sorgeloos P. Artemia, basic and applied biology. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2002; 75:333-344.
 44. Mohamad NA, Mohd Iqbal MN, Juris B, Muhammad FA, Zulkiflee AL, Yeong YS. Trends and New Developments in *Artemia* Research. *Animals (Basel)*. 2022;12(18):2321.
 45. *Artemia franciscana*. Aquaculture reports, 2020. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/artemia-franciscana>
 46. Antioxidants: In Depth. National center for complementary and integrative Health. Disponible en: <https://www.nccih.nih.gov/health/antioxidants-in-depth>
 47. Hurrell R. Influence of vegetable protein source on trace elements and mineral bioavailability. *Journal of Nutrition*. 2003; 133:29735-29775.
 48. Ratnam KV, Ankola DD, Bahrdwai JKV, Sahana DK, Kavar MNV. A review: Role of antioxidant in prophylaxis and therapy. A pharmaceutical prospective. *Journal of Controlled Release*. 2006; 11:189-207.
 49. Carocho M, Ferreira CFR. A reviews on antioxidants, prooxidants and related controversy. Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 51:15-25.

50. Huang D, Boxin OU, Prior PL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 55:1841-1856.
51. Alshaal S, Karabet F, Daghestani M. Determination of the Antioxidant Properties of the Syrian Olive Leaves Extracts and Isolation Oleuropein by HPLC Techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemical Research*. 2019;6(1):97-110.
52. Pisoschi AM, Negulescu G. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 2011; 1:1-10.
53. Shekhar TC, Anju G. Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine*. 2014; 1(4):244-249.
54. Alam MN, Bristi NJ, Rafi quzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity .*Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013; 21(2):143-152.
55. Mfotie Njoya E. Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer. *Cancer (Second Edition)*, 2021.
56. Ojha K, Dubey S, Chandrakar J, Minj RA, Dehariya R, Dixit AK. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*. 2018;4 (6):707.
57. Garrett AR, Murray BK, Robison RA, O'Neill KL. Advanced protocols in oxidative stress. 2010; 2:251-262.
58. Jiang Y, Rakesh KP, Alharbi NS, Vivek HK, Manukumar HM, Mohammed YHE, Qin H. *Bioorganic Chemistry*. 2019; 89:103015.
59. Askin H, Yilmaz B, Gulcin I, Taslimi P, Bulut S, Yildiz M, Kandemir N. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;80(5):802-812.
60. Kamer G, Demirata B, Bayraktar R, Ozyurt D, Apak R (2019). *Analytical Methods* 14.
61. Robineau L. (ED.). 1996. *Farmacopea Vegetal Caribeña*. Ediciones Emile Dèsormeaux. Santo Domingo-República Dominicana. 291-293pp.
62. Nauplio. Bioartemia compañía limitada. Disponible en: <https://www.bioartemia.com/2017/03/03/biologia-de-la-artemia-sp/>
63. Schmidt R. Optical motility test for the detection of Trichothecenes using Brine shrimp. *Mycotoxin Res*. 1985; 1:25-29.

64. Vanhaecke P, Persoone G. The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia* nauplii. Methodology and evaluation. Ecotoxicological Testing for the Marine Environ. 1984;143-157.
65. Gonzáles Villa AA. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos [Trabajo final Tecnología en Alimentos]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia (2014). Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2800/angelaandreaconzalezvilla.2004.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Fecha de acceso: 10 diciembre 2021).
66. Liang P, Macrae T. The synthesis of a small heat shock/alphacrystallin protein in *Artemia* and its relationship to stress tolerance during development. Dev Biol, 1999; 207:445-456.
67. Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García MC. Radical Scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. Talanta. 2007; 71(1):230-235.
68. Andriolli A, Beraldo H, Santos D, Teixeira S, Teixeira L, Ziolli R. Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe (III) utilizando *Artemia franciscana*. Heal. and Environ. J. 2007; 8:2-10.
69. Oluwole S, Funmilayo EA, Abimbola PO. The genus *Senna* (Fabaceae): A review on its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. South African Journal of Botany. 2021; 138:1-32.
70. Sorgeloos P, Dhert P, Candreva P. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. Aquaculture. 2001; 200:147–159.
71. Naegel LCA, Rodríguez-Astudillo S. Comparison of growth and survival of white shrimp postlarvae (*Litopenaeus vannamei*) fed dried *Artemia* biomass versus four commercial feeds and three crustacean meals. Aquac. Int. 2004; 12:573–581.
72. Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. DARU J. Pharm. Sci. 2015; 23:1–6.
73. Wang Y, Zhang D, Zhang M, Mu J, Ding G, Mao Z, Cao Y, Jin F, Cong Y, Wang L. Effects of ingested polystyrene microplastics on brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*. Environ. Pollut. 2019; 244:715–722.

74. Henry J, Bai Y, Williams D, Logozzo A, Ford A, Wlodkowic D. Impact of test chamber design on spontaneous behavioral responses of model crustacean zooplankton *Artemia franciscana*. *Lab. Anim.* 2022; 51:81–88.

ANEXOS

Anexo 1. Constancia de certificación de la especie vegetal



UNAP

Centro de Investigación de
Recursos Naturales
Herbarium Amazonense — AMAZ

INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO
CÓDIGO DE AUTORIZACIÓN AUT-ICND-2017-005

CONSTANCIA DE DETERMINACIÓN BOTÁNICA n.º 024-2023 AMAZ-UNAP

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA), de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por **XUSAN ELMIRA REÁTEGUI NICOLINI Y DANIEL ALEXANDER WENINGER PEZO** bachiller de la **Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica** de la **Facultad de Farmacia y Bioquímica** de la **Universidad Nacional de la Amazonía Peruana** pertenece al proyecto de tesis de pre grado titulado **“TOXICIDAD AGUDA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y TALLO DE *Senna quinquangulata*”**; ha sido **DETERMINADA** en este centro de investigación y enseñanza **Herbarium Amazonense-AMAZ-CIRNA-UNAP**, como se indica a continuación:

Nº	FAMILIA	ESPECIE	AUTOR
01	FABACEAE	<i>Senna quinquangulata</i>	(Rich.) H.S. Irwin & Barneby

Determinador: Ing. Juan Celidonio Ruiz Macedo

A los cinco días del mes de junio del año dos mil veintitrés, se expide la presente constancia a los interesados para los fines que se estime conveniente.

Atentamente,


Richard J. Huaranca Acostupa
Coordinador Herbarium Amazonense
CIRNA - UNAP



Anexo 2. Instrumento de recolección de datos

OJA DE TRABAJO
ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA POR *Artemia franciscana*

REGISTRO DE DATOS Y RESULTADOS

FECHA:

H. INICIO:

H. TERMINO:

CANTIDAD DE LARVAS INYECTADAS

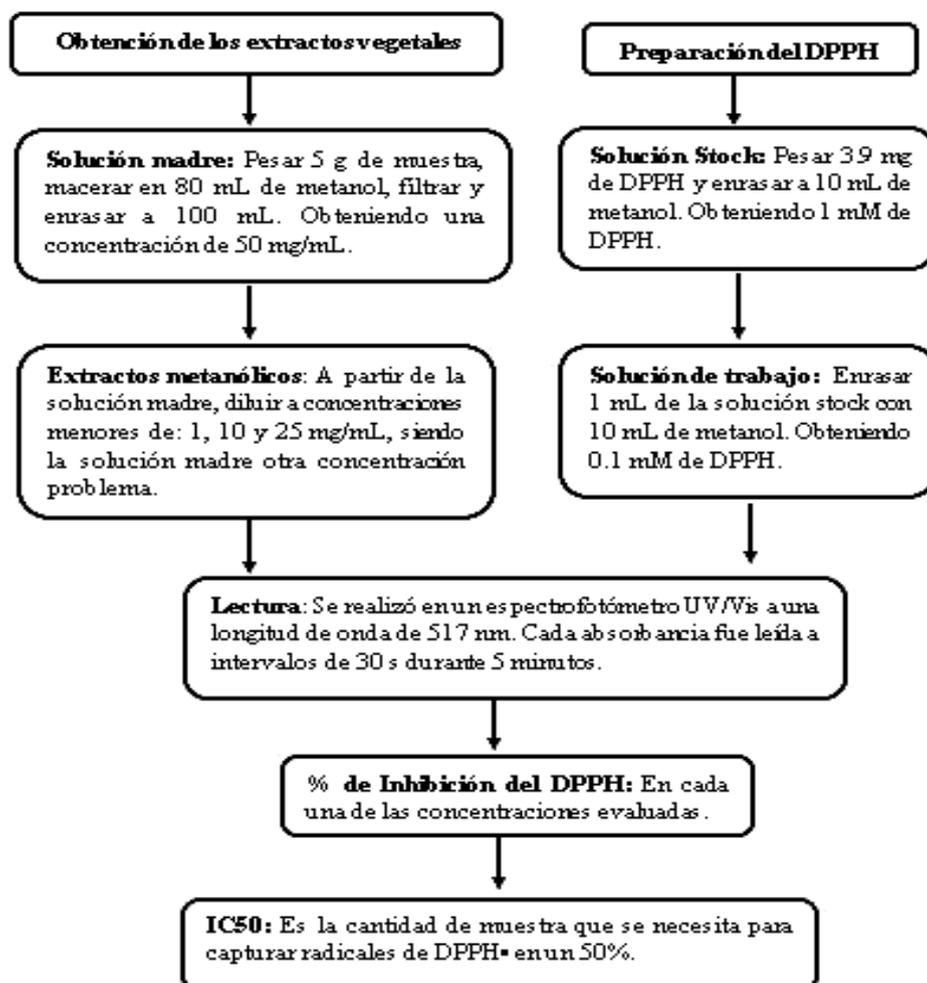
Muestra	Extracto de:						Control (-)		Control (+)	
[c]	S1		S2		S3		S4		S5	
repeticiones	10 ppm		100 ppm		1000 ppm		Sol. IO 3%		400 ppm $K_2Cr_2O_7$	
1° réplica	A1		A2		A3		A4		A5	
2° réplica	B1		B2		B3		B4		B5	
3° réplica	C1		C2		C3		C4		C5	

CONTEO DE LARVAS VIVAS Y MUERTAS DE *Artemia franciscana* EN LAS DISOLUCIONES

FECHA:

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE Artemia			
			Total	Vivas	Muertas	% Letal
.....	S1 10 ppm	1° repeticiónA1 2° repeticiónB1 3° repeticiónC1 Total				
.....	S2 100 ppm	1° repeticiónA2 2° repeticiónB2 3° repeticiónC2 Total				
.....	S3 1000 ppm	1° repeticiónA3 2° repeticiónB3 3° repeticiónC3 Total				
.....	S4 (Sol. IO 3%)	1° repeticiónA4 2° repeticiónB4 3° repeticiónC4 Total				
.....	S5 400 ppm $K_2Cr_2O_7$	1° repeticiónA5 2° repeticiónB5 3° repeticiónC5 Total				

Anexo 3. Flujoograma de la Actividad Antioxidante *in vitro*



Anexo 4. Flujoograma del ensayo toxicidad aguda

