



PRÁCTICA OPTATIVA INFORME FINAL

“Determinación de la actividad antimicrobiana de *Pluchea sagittalis* Lam. (yerba lusera)”

Alumna: Daniela Bordón

Directora: Dra. Gabriela A. L. Ricciardi

Co-Directora: Bioq. María Susana Scaramellini Burgos

Carrera: Bioquímica

Año 2024

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Objetivos	2
2.1. Objetivos generales	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. Materiales y métodos	2
3.1. Obtención del material vegetal, extractos y aceite esencial	2
3.2. Caracterización fitoquímica	3
3.2.1. Cromatografía en capa delgada (TLC)	3
3.2.2. Cuantificación de fenoles: Folin - Ciocalteau	3
3.2.3. Cuantificación de flavonoides: AlCl_3 , NaNO_2 y NaOH	4
3.2.4. Cuantificación de taninos condensados: Vainillina - HCl	4
3.2.5. Actividad antioxidante	5
3.2.5.1. Con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	5
3.2.5.2. Con ABTS (radical catión, ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))	5
3.2.5.3. Determinación de la IC_{50} (concentración inhibitoria 50)	6
3.3. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	6
3.3.1. Preparación de discos	6
3.3.2. Screening. Método de Kirby-Bauer (difusión por disco)	6
3.3.3. Determinación de la CIM (concentración inhibitoria mínima). Método cuantitativo: microdilución en placa	7
3.3.4. Determinación de la CBM (concentración bactericida mínima)	7
4. Resultados y discusión	8
4.1. Rendimientos	8
4.2. Contenido de Fenoles, Flavonoides, Taninos y Actividad Antioxidante	9
4.3. Determinación de la IC_{50} para los extractos con mayor actividad antioxidante	9
4.4. Identificación de perfiles químicos de los diferentes extractos por separación cromatográfica (TLC)	11
4.5. Actividad antimicrobiana	15
4.5.1. Screening por el método de difusión por disco	15
4.5.2. CIM (concentración inhibitoria mínima) y CBM (concentración bactericida mínima)	17
5. Conclusión	24
6. Referencias bibliográficas	25

1. Introducción

A lo largo de la historia, las plantas han sido utilizadas por el ser humano con fines medicinales, superando diversas barreras culturales, temporales, religiosas y económicas. Gran parte de las terapias tradicionales involucra el uso de extractos vegetales o de los compuestos activos de las plantas (Akerle, 1993; Sheldon et al., 1997; Shrestha y Dhillon, 2003; Katewa et al., 2004, como se citó en Bermúdez et al., 2005), y su uso con fines curativos ha permitido descubrir un significativo número de medicamentos derivados de vegetales que han sido aprobados en la medicina moderna, entre los que destacan antimaláricos, antiinflamatorios y antitumorales, entre otros.

Investigaciones recientes indicaron que el 60% de los agentes terapéuticos empleados en el tratamiento del cáncer y el 75% de los utilizados para enfermedades infecciosas derivan de fuentes naturales; sin embargo, se ha observado una reducción en el aprovechamiento de los productos naturales para el desarrollo de nuevas terapias (Gupta et al., 2005) a pesar de que los mismos sirvan como fuente directa de agentes terapéuticos y puedan ser empleados en la creación de fármacos semisintéticos más avanzados.

La Organización Mundial de la Salud (1979) define una planta medicinal como cualquier especie vegetal que contiene sustancias con potencial terapéutico o cuyos principios activos pueden ser utilizados como precursores para la síntesis de nuevos medicamentos. Definido esto, dentro de la etnomedicina regional, algunas destacan sobre el resto por sus múltiples aplicaciones, entre las cuales se encuentra la capacidad preventiva contra el cáncer, atribuida a la habilidad de los compuestos químicos presentes en los extractos de neutralizar radicales libres. (Bermúdez et al., 2005)

Numerosas especies pertenecientes al género *Pluchea* tienen diversos usos en la medicina tradicional, como ser astringente, antipirético, antiinflamatorio, hepatoprotector, antidiarreico, entre otros. En el Nordeste de Argentina (NEA), *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera es una planta que es conocida como "yerba lucero" o "yerba lusera" y es especialmente consumida en forma de infusión o añadida al mate, donde se aprovechan sus propiedades digestivas y hepatoprotectoras.

Las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes del extracto acuoso de *Pluchea* han sido objeto de numerosos análisis (Hussain et al., 2013) mientras que, estudios *in vitro* del extracto etanólico de la misma especie en Brasil demostraron, además de su capacidad antioxidante mediante la captura de radicales libres frente al DPPH (2,2-difenilpicril-1hidrazilo), actividad antimicrobiana contra microorganismos. Estas propiedades se relacionaron con el alto contenido en compuestos fenólicos y flavonoides, en especial derivados del ácido cafeico, flavonas y ácidos grasos (Da Silva Freitas et al., 2022). Por lo tanto, se emprendió el estudio principalmente del extracto etanólico de la

especie nativa de nuestra región, centrándose en la evaluación de sus actividades *in vitro*, con el fin de evaluar su actividad antimicrobiana y su posible relación con sus componentes químicos.

2. Objetivo (s) del plan

2.1. Objetivos generales

- Obtener formación en la práctica manual de laboratorio para complementar la experiencia obtenida durante el desarrollo de mi carrera de grado.
- Adquirir destreza para la toma de decisiones en la práctica de laboratorio.
- Iniciar mi formación en investigación.

2.2. Objetivos específicos

- Estudiar de manera *in vitro* la actividad antimicrobiana que pueda presentar la especie *Pluchea sagittalis*.
- Caracterizar fitoquímicamente la especie por dosaje del contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante.
- Relacionar la composición química de *P. sagittalis* con la actividad antimicrobiana.

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención del material vegetal, extractos y aceite esencial

El material vegetal, que incluía tallos, hojas (H) y flores (F) de la especie *P. sagittalis*, fue recolectado mediante el método de poda en otoño de 2024 en el Campus Deodoro Roca, en el predio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la Ciudad de Corrientes, en proximidades a la residencia universitaria. Un ejemplar fue enviado al herbario de Corrientes (IBONE) para confirmar su identidad botánica como *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera.

Se separaron hojas y flores que se secaron por venteo al aire durante aproximadamente 1 semana habiendo descartado hojas y flores secas. Las hojas y los tallos tiernos se trituraron con molinillo hasta un tamaño de 20 mesh. Las materias primas molidas, se pesaron en balanza analítica con precisión de 0.1 mg, se dividió cada muestra en tres partes iguales y se colocaron a macerar en tres solventes diferentes: agua destilada (1) por 24 horas, etanol 96° (2) y diclorometano (3) por 48h, en una proporción 1:10 (material vegetal:solvente). Al cabo del tiempo correspondiente, cada macerado se filtró y luego desecó en rotavapor Büchi termostatzado a presión reducida con circulador de agua refrigerada; se conservaron los extractos secos en desecador hasta el momento de uso. Se calcularon los rendimientos porcentuales.

Con el fin de separar el aceite esencial de *P. sagittalis*, se realizó una nueva cosecha de hojas que se dejaron secar por venteo al aire durante 3 a 4 días para luego proceder a su destilación por arrastre con vapor de agua. El aceite esencial separado se conservó en atmósfera inerte a -4°C. Se calculó el rendimiento porcentual.

3.2. Caracterización fitoquímica

3.2.1. Cromatografía en capa delgada (TLC)

Se analizó el perfil fitoquímico de los extractos obtenidos a partir de TLC. Se sembraron los extractos disueltos en su solvente madre (1mg/1mL), en cromatofolios de sílica gel GF254 (Merck) y se desarrolló la cromatografía utilizando como fase móvil una mezcla elutrópica de tolueno-acetato de etilo-metanol-ácido fórmico 88% (6:4:4:1). Los componentes químicos separados, se revelaron con diferentes medios de visualización: a) radiación UV a dos longitudes de onda: 254nm y 365nm, b) revelador universal: anisaldehído/H₂SO₄, c) revelador específico para oxhidrilos fenólicos: solución acuosa al 10% de FeCl₃, d) Reactivo para productos naturales NP - PEG (Heinrich et al., 2018).

3.2.2. Cuantificación de fenoles: Folín - Ciocalteu

La cuantificación se llevó a cabo mediante la lectura de absorbancia usando el lector de microplacas thermoscientific MULTISKAN Sky con el fin de utilizar pocas cantidades de cada extracto. Cada pocillo de la microplaca puede contener un volumen máximo de 210 µL, por lo que se preparó una solución de 1 mg/mL de cada uno de los extractos obtenidos: H1, H2, H3, F1, F2 y F3. Con el fin de evitar dañar la microplaca de acrílico, en el caso de los extractos diclorometánicos se los preparó realizando una disolución previa con unos µL del solvente abrasivo y luego colocando 10 µL de esta disolución con 990 µL de etanol; trabajando de esta manera, se evita que el deterioro de la microplaca interfiera con la posterior lectura de absorbancia. El reactivo se preparó disolviendo en H₂O el reactivo de Folín (1:4) y preparando una solución también acuosa de Na₂CO₃ al 10%.

En una microplaca de reacción se colocó 20 µL del extracto disuelto y 100 µL del reactivo Folín, se agitó por 1 minuto. Transcurrido ese tiempo se añadió 75 µL de la solución acuosa de Na₂CO₃ al 10% y se dejó reaccionar en reposo por 30 minutos a 40°C en estufa. El volumen total en el well de reacción fue de 195 µL. Paralelamente se realizó un blanco con 20 µL de extracto, 75 µL de la solución acuosa de Na₂CO₃ y 100 µL de H₂O destilada. Se leyó la absorbancia a 750 nm. Se expresaron los resultados en µg ácido gálico/mg extracto.

Los resultados se calcularon en referencia a una curva de calibración que se confeccionó con cuatro diluciones de una solución madre de Ácido Gálico en etanol (4µg/mL) resultando soluciones de concentración 3 µg/mL; 2 µg/mL; 1 µg/mL; 0.6 µg/mL. Estas soluciones se trabajaron de la misma

manera que cada extracto con el reactivo de Folin, leyendo la absorbancia a 750 nm, y se confeccionó una curva de Absorbancia vs μg de Ácido Gálico; con la ecuación de la pendiente lineal de esta gráfica, se calcularon los μg equivalentes de Ácido Gálico/mg de extracto utilizando la Absorbancia leída para cada extracto.

3.2.3. Cuantificación de flavonoides: AlCl_3 , NaNO_2 y NaOH

La cuantificación se realizó nuevamente, en lector de microplacas, preparando soluciones de 2 mg/mL en cada solvente correspondiente, para cada uno de los extractos H1, H2, H3, F1, F2 y F3. Para evitar dañar la microplaca, en el caso del extracto diclorometánico se procedió disolviendo previamente el extracto seco en una pequeña porción de diclorometano, luego tomando 10 μL de esta solución y disolviéndolo con 990 μL de etanol. Los reactivos utilizados fueron NaNO_2 al 5%; AlCl_3 al 2% y NaOH al 4%.

Para los extractos acuosos, se condujo la reacción utilizando 50 μL del extracto disuelto en su solvente madre y mezclando con 120 μL de H_2O ; para los etanólicos se utilizaron 25 μL de solución de extracto con 145 μL de etanol y para los diclorometánicos 10 μL de solución de extracto con 160 μL de etanol. Se añadió 10 μL de solución acuosa de NaNO_2 al 5% y se dejó reposar 5 minutos para después agregar 10 μL de solución acuosa de AlCl_3 al 2% y reposar por 1 minuto. Finalmente se adicionó 60 μL de solución acuosa de NaOH al 4% y se procedió a leer la absorbancia a 470 nm. Se realizaron los blancos de extracto correspondientes agregando para los acuosos: 50 μL de extracto disuelto y 250 μL de H_2O destilada, para los etanólicos: 25 μL de extracto disuelto y 225 μL de etanol, y para los diclorometánicos: 10 μL de extracto disuelto y 240 μL de etanol. Se expresaron los resultados como μg quercetina/mg extracto.

Se realizó una curva de calibración procediendo con la misma técnica, pero utilizando soluciones de concentraciones conocidas de quercetina como patrón, preparadas a partir de diluciones consecutivas a partir de una solución madre, resultando ocho concentraciones finales (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se leyó la absorbancia a 470 nm y se graficó Absorbancia vs Concentración; se utilizó la ecuación de pendiente lineal de la gráfica obtenida para calcular con la absorbancia de los extractos, los μg equivalentes de quercetina/mg de extracto.

3.2.4. Cuantificación de taninos condensados: Vainillina - HCl

La cuantificación se realizó mediante lecturas de absorbancia en lector de microplacas, a partir de haber pesado 2.5 mg de cada extracto y se disuelto en 1 mL del solvente correspondiente; para el caso del diclorometánico se trabajó como se detalló en el apartado 3.2.2. *Dosaje de fenoles*. Se

utilizaron como reactivos: HCl 4% y 8%, ambos en metanol; vainillina 1% en metanol y reactivo de vainillina (vainillina 1% y HCl 8% en partes iguales).

Para la reacción se dejó incubar, por 20 minutos a 30°C, 90 µL del extracto disuelto con 150 µL de reactivo de vainillina, y para los blancos de reactivo: 90 µL del extracto disuelto con 150 µL del HCl 4% previamente preparado. Se leyó la absorbancia a 500 nm y se expresaron los resultados como µg catequina/mg extracto.

Se realizó una curva de calibración, repitiendo la reacción anterior, pero con seis concentraciones conocidas de catequina patrón disuelta en etanol (180 µg/mL; 90 µg/mL; 60 µg/mL; 45 µg/mL; 30 µg/mL; 24 µg/mL) y leyendo la absorbancia a 500 nm. Se utilizó la ecuación de pendiente lineal de la gráfica resultante, para calcular los µg catequina/mg extracto usando las lecturas de sus absorbancias.

3.2.5. Actividad antioxidante

3.2.5.1. Con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Se preparó una solución de DPPH en metanol de concentración 0.1 mM (1 mg en 13 mL de etanol) de manera de ajustar la absorbancia del reactivo entre 0.8000 – 0.8500 a 517 nm.

En la microplaca se mezclaron 10 µL de cada extracto disuelto en su solvente madre (explicado en los ítems anteriores) con 200 µL de DPPH; se realizaron blancos de extracto colocando 10 µL de extracto disuelto, con 200 µL del solvente correspondiente. Se incubó en oscuridad por 30 minutos y se leyó la absorbancia a 517 nm. Se calcularon los porcentajes de inhibición según la fórmula $[(A_o \text{ DPPH} - A_{leída}) / A_o \text{ DPPH}]$ y se expresaron los resultados como µmol Trolox/mg extracto utilizando la ecuación de la curva de calibración con Trolox.

La curva de calibración utilizando Trolox como patrón se confeccionó realizando la reacción anterior sobre diluciones de concentración conocida de Trolox (1.9 µg/mL; 0.9500 µg/mL; 0.2375 µg/mL; 0.1188 µg/mL; 0.05937 µg/mL; 0.02969 µg/mL) en iguales condiciones.

3.2.5.2. Con ABTS (radical catión, ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))

El radical se generó pesando 19,2 mg de ABTS, disolviéndolo en 5 mL de agua destilada y añadiendo 5 ml de una solución de persulfato de potasio 2,45 mM. Se mantuvo protegido de la luz, a temperatura ambiente y en constante agitación por 12-16 h para luego ser alicuotado en eppendorfs y congelado a -20°C. Para el momento de realizar el ensayo, se descongeló en función del volumen necesario según el número de muestras.

Con un peachímetro previamente calibrado a dos niveles (primero a 7.0100 y después a 4.0100) con las soluciones buffer correspondientes, se determinó el pH de una solución tampón de

fosfato de sodio (PBS) que después se utilizó para ajustar la absorbancia de ABTS entre 0.7000-0.7500, leída a 734 nm. La prueba se realizó por triplicado, haciendo reaccionar 160 μ L de ABTS con 40 μ L de cada extracto diluido en su solvente madre. Se realizó una curva de calibración con cuatro diluciones utilizando una solución madre de Ácido Gálico en etanol (4 μ g/mL) resultando soluciones de concentración 3 μ g/mL; 2 μ g/mL; 1 μ g/mL; 0.6 μ g/mL. Las absorbancias de cada extracto y sus diluciones (1/4; 1/10) se determinaron a los 5 minutos de reacción a 734 nm y se expresaron los resultados como μ mol ácido gálico/mg extracto utilizando la ecuación de la pendiente lineal de la curva de calibración, con las absorbancias leídas para cada extracto.

3.2.5.3. Determinación de la IC₅₀ (concentración inhibitoria 50)

Este valor se determinó para el extracto más activo como antioxidante, confeccionando un gráfico de % de actividad antioxidante vs concentración del extracto frente al DPPH y tomando para esta curva la ecuación de la regresión lineal, despejando la concentración correspondiente al 50% de actividad antioxidante, expresada en mg/mL. Los valores para la gráfica se obtuvieron por medición de la absorbancia del extracto disuelto en agua y del disuelto en etanol, en 8 concentraciones diferentes (desde 2mg/mL a 0,4 mg/mL) a 517 nm. Para el gráfico se utilizó el programa Prism - GraphPad.

3.3. Actividad antimicrobiana *in vitro*

3.3.1. Preparación de discos

Se pesaron 20 μ g de H1, H2, H3, F1, F2, F3 respectivamente y se disolvieron en 150 μ L de su correspondiente solvente para obtener una concentración de 2 mg. Los discos, previamente secados en estufa, se impregnaron con 15 μ L de los extractos. Se volvieron a colocar en estufa hasta el momento de la siembra en placa.

3.3.2. Screening. Método de Kirby-Bauer (difusión por disco)

En placas de Petri con agar Mueller-Hinton (MH) de 4 mm de espesor se inocularon cepas ATCC en una concentración de 0.5 Mc Farland según el método de Kirby-Bauer.

Las cepas ATCC utilizadas fueron:

- *Escherichia coli* 25922
- *Klebsiella pneumoniae* 700603
- *Pseudomonas aeruginosa* 27853
- *Staphylococcus aureus* 25923
- *Staphylococcus aureus* 43300 (resistente a meticilina y oxacilina)
- *Enterococcus faecalis* 29212

Después de la inoculación de las placas se colocaron los discos impregnados con los extractos y se incubó en estufa de cultivo a 37°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo se leyeron con una regla (en cm) y registraron los halos de inhibición.

3.3.3. Determinación de la CIM (concentración inhibitoria mínima). Método cuantitativo: microdilución en placa

Los extractos que resultaron con actividad antimicrobiana fueron seleccionados para determinar su Concentración Inhibitoria Mínima, para lo cual se pesaron 4 mg de cada extracto: H2 y F2, y se disolvieron en 80 µL de etanol y 160 µL de agua. En cada pocillo de la microplaca, se dispensaron 100 µL del medio MH a los que se agregaron 100 µL de cada solución de extracto; estas cantidades representan los mg que se colocaron en los discos utilizados en el método de screening (2 mg/disco). Luego se adicionaron 100 µL del inóculo 0.5 McFarland de la cepa ATCC y se realizaron diluciones al: $\frac{1}{2}$; $\frac{1}{4}$; $\frac{1}{6}$; $\frac{1}{8}$; $\frac{1}{12}$; $\frac{1}{18}$. También se realizaron blancos de extracto (sólo el extracto disuelto, sin inóculo) y blancos de crecimiento (inóculo solo).

Las microplacas se incubaron por 24 horas a 37°C en estufa de cultivo y transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 600 nm. Una vez leídas las absorbancias, se replicó cada pocillo en placas de agar Mueller-Hinton para la posterior determinación de la CBM (concentración bactericida mínima) (*ítem 3.3.4*).

Después del repique se colorearon las microplacas con iodonitrotetrazolio (INT) y se incubaron por 20 minutos. Pasado este tiempo, la aparición de color indicó crecimiento bacteriano y, por el contrario, el no desarrollo de color indicó inhibición de crecimiento por parte del extracto. El pocillo anterior al que se observe aparición de color rosado corresponde a la CIM. Se volvieron a leer las absorbancias, pero esta vez a 530 nm.

3.3.4. Determinación de la CBM (concentración bactericida mínima)

En una placa con agar MH se repicaron cada uno de los pocillos de la microplaca utilizada para la determinación de la CIM que contenían medio de cultivo, extracto e inóculo. La misma fue incubada por 24 horas a 37°C en estufa de cultivo. Para determinar la CBM se observó y contó el número de colonias que desarrollaron por cada pocillo en un contador de colonias electrónico tipo Quebec, considerándose dicha CBM como la menor concentración del extracto cuyo subcultivo produjo un número de colonias menor al 0.1% del inóculo original.

4. Resultados y discusión

4.1. Rendimientos

Se calcularon como rendimientos porcentuales de P/P a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Rto \%} = \frac{(P - P_0)}{P_m} \times 100$$

Donde:

P: peso del balón + extracto seco

P₀: peso del balón vacío

P_m: peso material vegetal inicial colocado en el balón

ej. H1: $\text{Rto \%} = \frac{(60.1029\text{g} - 62.4970\text{g})}{19\text{g}} \times 100 = 8.45\%$ (Tabla 1)

En el caso del rendimiento porcentual del aceite esencial, se utilizó el peso del mismo y no el volumen para expresarlo como % P/P (Tabla 2).

Tabla 1

Rendimientos porcentuales de extractos de P. sagittalis

Extracto	H1	H2	H3	F1	F2	F3
Rto %	8.45	28.82	9.21	7.66	3.76	2.43

(H1) extracto acuoso de hojas.; (H2) extracto etanólico de hojas.; (H3) extracto diclorometánico de hojas.; (F1) extracto acuoso de flores.; (F2) extracto etanólico de flores.; (F3) extracto diclorometánico de flores.

Tabla 2

Rendimientos porcentuales de aceite esencial de P. sagittalis

Destilación	1ra	2da
Rto %	0.12	0.05

Como se puede observar, el rendimiento del aceite esencial es muy bajo en comparación con el de los extractos vegetales. Las masas de partida utilizadas para obtener los extractos vegetales son menores que las necesarias para obtener los aceites esenciales, además de que para éstos últimos se utilizan sólo las hojas y tallos tiernos.

4.2. Contenido de Fenoles, Flavonoides, Taninos y Actividad Antioxidante

Tabla 3

Cuantificación de fenoles, flavonoides, taninos y actividad antioxidante realizados a extractos acuosos, etanólicos y diclorometánicos de hojas y flores de P. sagittalis

Extracto	Dosajes			Actividad antioxidante	
	Fenoles ($\mu\text{gAG/mgE}$)	Flavonoides ($\mu\text{gQuerc/mgE}$)	Taninos ($\mu\text{gCateq/mgE}$)	DPPH ($\mu\text{molTrolox/mgE}$)	ABTS ($\mu\text{molAG/mgE}$)
H1	740,0 \pm 10,8	130,5 \pm 8,1	n/d	0,74 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01
H2	671,0 \pm 21,3	n/d	n/d	0,40 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01
H3	165,3 \pm 2,0	n/d	n/d	0,08 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01
F1	94,6 \pm 0,7	n/d	n/d	0,09 \pm 0,04	0,04 \pm 0,01
F2	168,7 \pm 7,8	n/d	n/d	0,12 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01
F3	147,1 \pm 61,1	n/d	n/d	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01

(H1) extracto acuoso de hojas.; (H2) extracto etanólico de hojas.; (H3) extracto diclorometánico de hojas.; (F1) extracto acuoso de flores.; (F2) extracto etanólico de flores.; (F3) extracto diclorometánico de flores.

Nota: (n/d) significa “no detectable”.

Dado que las absorbancias de lectura para la cuantificación de Taninos resultaron menores al rango de error del método ($\text{Abs} < 0.2000$) se repitieron las mediciones duplicando la concentración inicial de los extractos. Pese a ello, los valores de absorbancia continuaron siendo inferiores a 0.2000, por lo tanto, se considera que las muestras no contienen taninos detectables.

De la misma manera se procedió con las mediciones del contenido de Flavonoides, consiguiendo sólo valores aceptables a una concentración de 2 mg/mL y sólo en el extracto acuoso de hojas, por lo que se considera que este tipo de solvente es el que permite extraer los flavonoides presentes en la especie vegetal (Tabla 3).

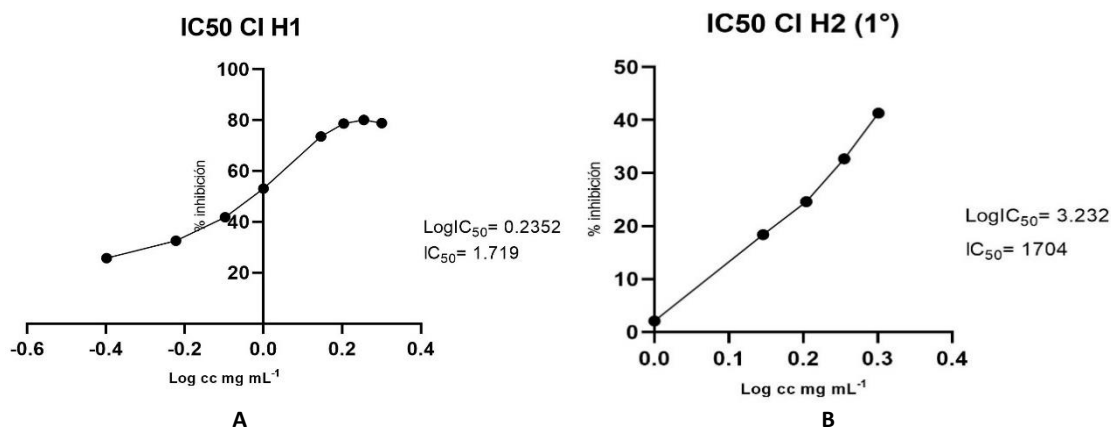
De la Tabla 3 se puede observar que las hojas son las que presentan mayor actividad antioxidante, especialmente en los extractos acuoso y etanólico, tanto frente a DPPH como a ABTS (captación de radicales libres). Dichos valores de actividad antioxidante estarían relacionados al contenido de fenoles presente en los extractos.

4.3. Determinación de la IC_{50} para los extractos con mayor actividad antioxidante

En la Figura 1 se representan los gráficos correspondientes a la determinación de la IC_{50} para el extracto acuoso de hojas y para el extracto etanólico de hojas.

Figura 1

Gráficos de la IC_{50} del primer dosaje de extractos de hojas y flores de *P. sagittalis* provenientes del Campus frente a DPPH

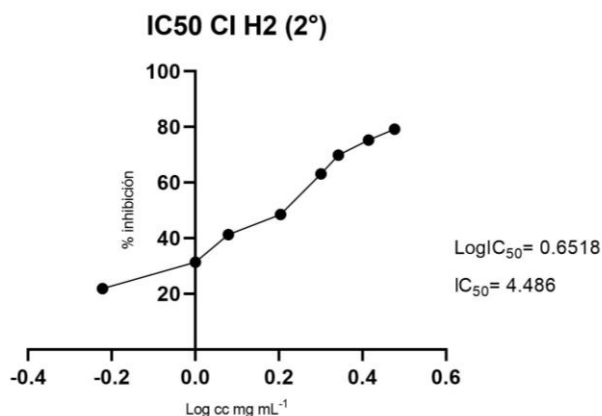


(A) IC_{50} del extracto de hojas acuoso (H1).; (B) IC_{50} del primer dosaje del extracto de hojas etanólico (H2).

Se considera que un extracto con mayor IC_{50} será menos eficiente en su capacidad antioxidante que otro con menor IC_{50} de ahí que, en base a los resultados obtenidos con los gráficos de la Figura 1, no se podía establecer una correlación con los resultados mostrados en la Tabla 3 en la que se observa que el extracto etanólico de hojas (H2) es sólo un poco menos antioxidante que el extracto acuoso de hojas (H1). Por tal motivo, se repitió la determinación utilizando una solución madre de concentración inicial igual al doble de la anterior y al realizar el gráfico correspondiente, se obtuvo una IC_{50} de 4,486 mg/mL (Figura 2) pudiéndose establecer una correlación entre el valor de la IC_{50} y la actividad cuantificada por microplaca.

Figura 2

Gráfico de la repetición de la IC_{50} del extracto de hojas etanólico (H2) de *P. sagittalis* proveniente del Campus frente a DPPH



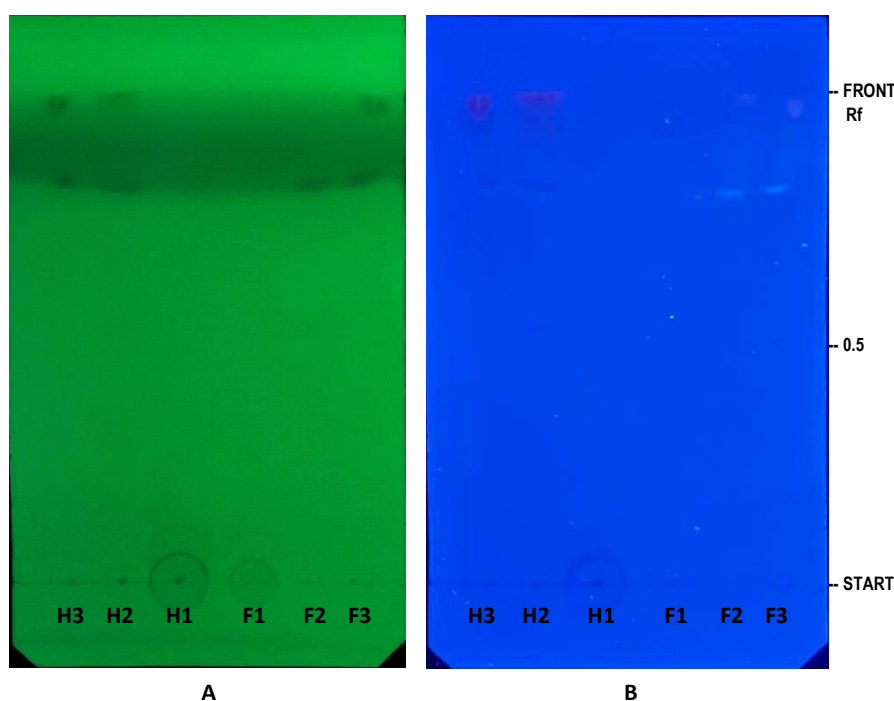
De la Tabla 3 se puede deducir que el extracto que presenta mayor actividad antioxidante es el extracto acuoso, en contraste con el etanólico que es el que había sido reportado en investigaciones en Brasil como el más activo (Da Silva Freitas et al., 2022).

4.4. Identificación de perfiles químicos de los diferentes extractos por separación cromatográfica (TLC)

Se realizaron 2 corridas cromatográficas sembrando soluciones de 1 mg/mL de cada extracto disuelto en su solvente madre sobre las placas de sílica gel con indicador de fluorescencia y desarrollando la cromatografía con una fase móvil correspondiente a una mezcla de tolueno-acetato de etilo-metanol-ácido fórmico (6:4:4:1). Las placas fueron inicialmente observadas a la luz UV a dos longitudes de onda (Figura 4) y luego revelados los componentes químicos con dos reactivos reveladores, a) anisaldehído / H_2SO_4 y b) FeCl_3 al 10% en solución acuosa (Figura 5 y Figura 6).

Figura 3

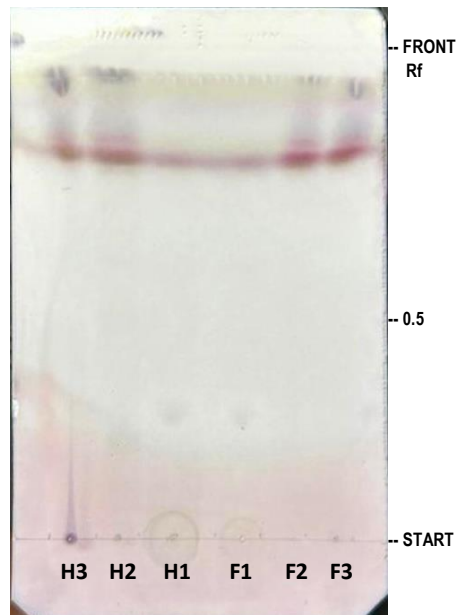
Placas de TLC de extractos de P. sagittalis visualizadas a dos longitudes de onda



(A) visualización a luz UV 254 nm.; (B) visualización a luz UV 365 nm.

Figura 4

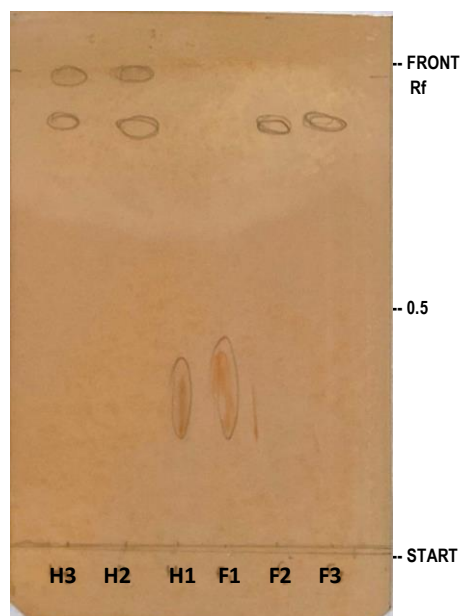
Placa de TLC con revelador universal: anisaldehído/ H_2SO_4



De la Figura 4 se puede observar que los extractos acuosos, tanto de hojas como de flores, resultan de composición química diferente dado que las manchas que aparecen en los extractos etanólicos y clorofórmicos a un valor de R_f aproximadamente de 0.8, aparecen mucho más atenuadas y sin la mancha gris que evidencia en el frente del solvente (probablemente clorofila).

Figura 5

Placa de TLC con revelador específico de oxhidrilos fenólicos: $FeCl_3$ al 10% en solución acuosa

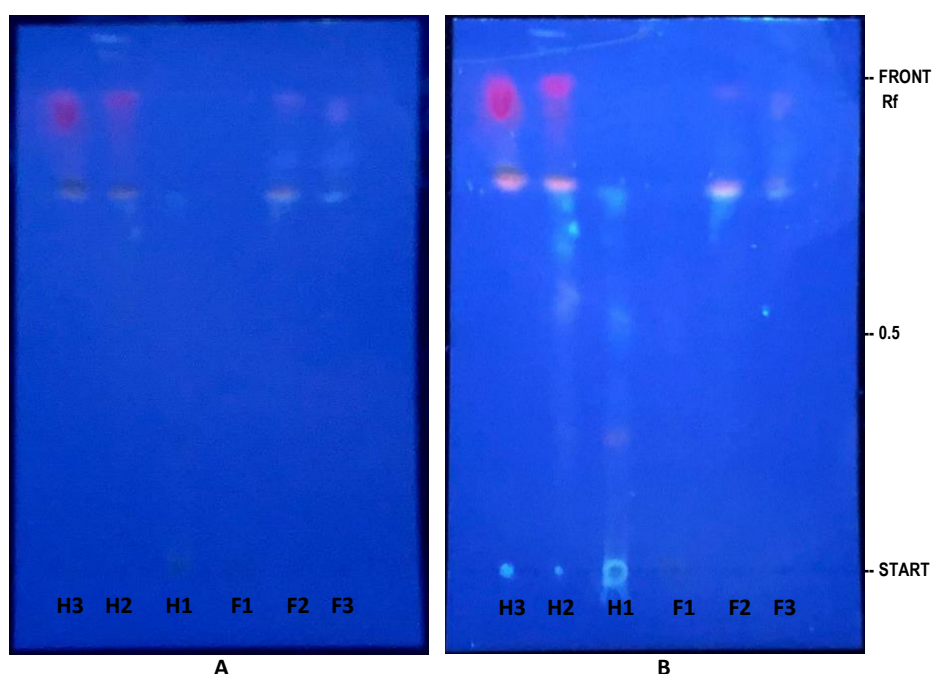


Al revelar con el reactivo específico para fenoles, se observa que aparecen componentes de esta naturaleza en los extractos acuosos tanto de hojas como de flores, a un valor de R_f aproximadamente entre 0.3 y 0.4 (Figura 5), mientras que los extractos etanólico de hojas y hexánico de hojas no presentan los mismos componentes fenólicos sino unos de menor polaridad que ascienden casi con el frente del solvente (dos manchas coincidentes con R_f aproximado de 0.9 y R_f aproximado de 1); por su parte, las flores sólo presentan una mancha similar a la de los extractos anteriores, a R_f aproximadamente igual a 0.9.

Con el fin de correlacionar la estructura química con la actividad antioxidante, se realizaron otras dos corridas cromatográficas más con las mismas condiciones anteriores, pero, una de ellas se reveló con el reactivo antioxidante DPPH (Figura 7) y la otra con el reactivo de productos naturales (NP - PEG) (Figura 6).

Figura 6

Placas de TLC de extractos de P. sagittalis reveladas con reactivo para productos naturales NP - PEG



(A) revelado con NP y visualización a la luz UV 365 nm.; (B) revelado con NP – PEG y visualización a la luz UV 365 nm.

De acuerdo con la bibliografía (Wagner et al., 2001), la observación de manchas rosadas en la Figura 6, distribuidas en proximidades al frente de corrida, se atribuirían a la presencia de clorofila; sin embargo, tras la aplicación del reactivo revelador, la ausencia de estas manchas en las siembras correspondientes a las flores, sugiere que la clorofila no está presente en estas estructuras.

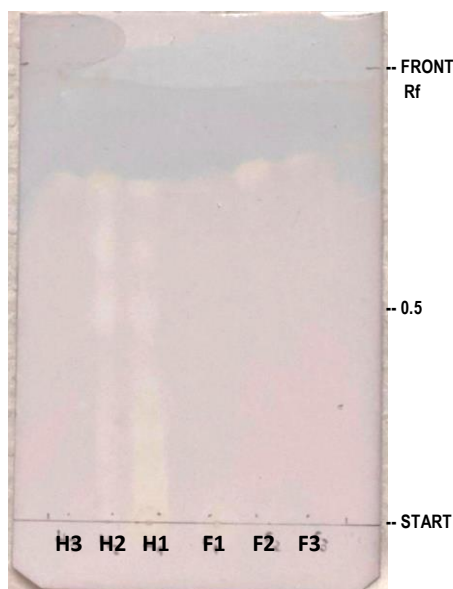
Como se puede observar en la Figura 6, tampoco los extractos acuosos contendrían clorofila porque no se observan las manchas correspondientes a este componente químico.

La comparación de los componentes separados en hojas y flores permite observar que los extractos de hojas son más ricos en componentes de diferente naturaleza polar que las flores (Figuras 4, 5 y 6), lo que se interpreta a partir de una disminución en la intensidad o desaparición de algunas manchas. Sin embargo, los componentes presentes en ambos órganos resultan ser los mismos dado que el perfil de corrida es similar para todos los extractos (variación cuantitativa y no cualitativa).

La variación cuantitativa en la composición entre hojas y flores también se evidenció en los compuestos que permanecieron en el punto de siembra, lo cual sugiere que, considerando su polaridad, estos serían más polares que el solvente de elución.

Figura 7

Placa de TLC revelada con reactivo antioxidante de DPPH



De la Figura 7 se puede observar que los extractos de hojas (etanólico y acuoso) son los que presentan mayor actividad antioxidante y, a su vez, de acuerdo con las Figuras 4 y 5, esta actividad no se correlacionaría exclusivamente a los componentes fenólicos dado que se observa decoloración en todo el camino de ascenso de la muestra; esta actividad quizás esté relacionada a algún otro componente de naturaleza química diferente. En la Figura 6 - B, luego de asperjar con PEG a la placa revelada con el reactivo NP, se puede apreciar la presencia de por lo menos 3 o 4 manchas de colores diferentes anteriores a las identificadas con el reactivo de fenoles. Los diversos colores de estas manchas son indicadores de su diferente naturaleza química, aunque no se puede concluir con exactitud cuál sería, requiriendo otros ensayos para ello.

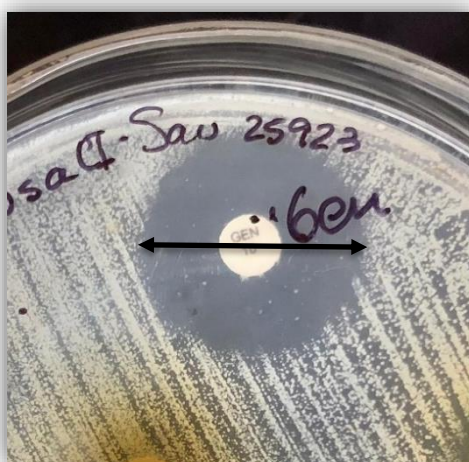
4.5. Actividad antimicrobiana

4.5.1. Screening por el método de difusión por disco

Para la observación y registro de la formación de halos de inhibición de crecimiento bacteriano se tomó como patrón positivo el halo de inhibición generado por la gentamicina de 10 µg (antibiótico patrón: control positivo) (Figura 8) en todas las cepas excepto en *Enterococcus faecalis*, que se utilizó un disco de gentamicina de alta carga (120 µg); y se comparó con el diámetro de los mismos. Estos halos se midieron utilizando una regla (en cm) y tomando el valor del diámetro total del halo generado en aquellos discos con extractos que presentaron actividad antimicrobiana. Frente a todas las cepas ensayadas (Figura 9), sólo se observó actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Figura 9 - D).

Figura 8

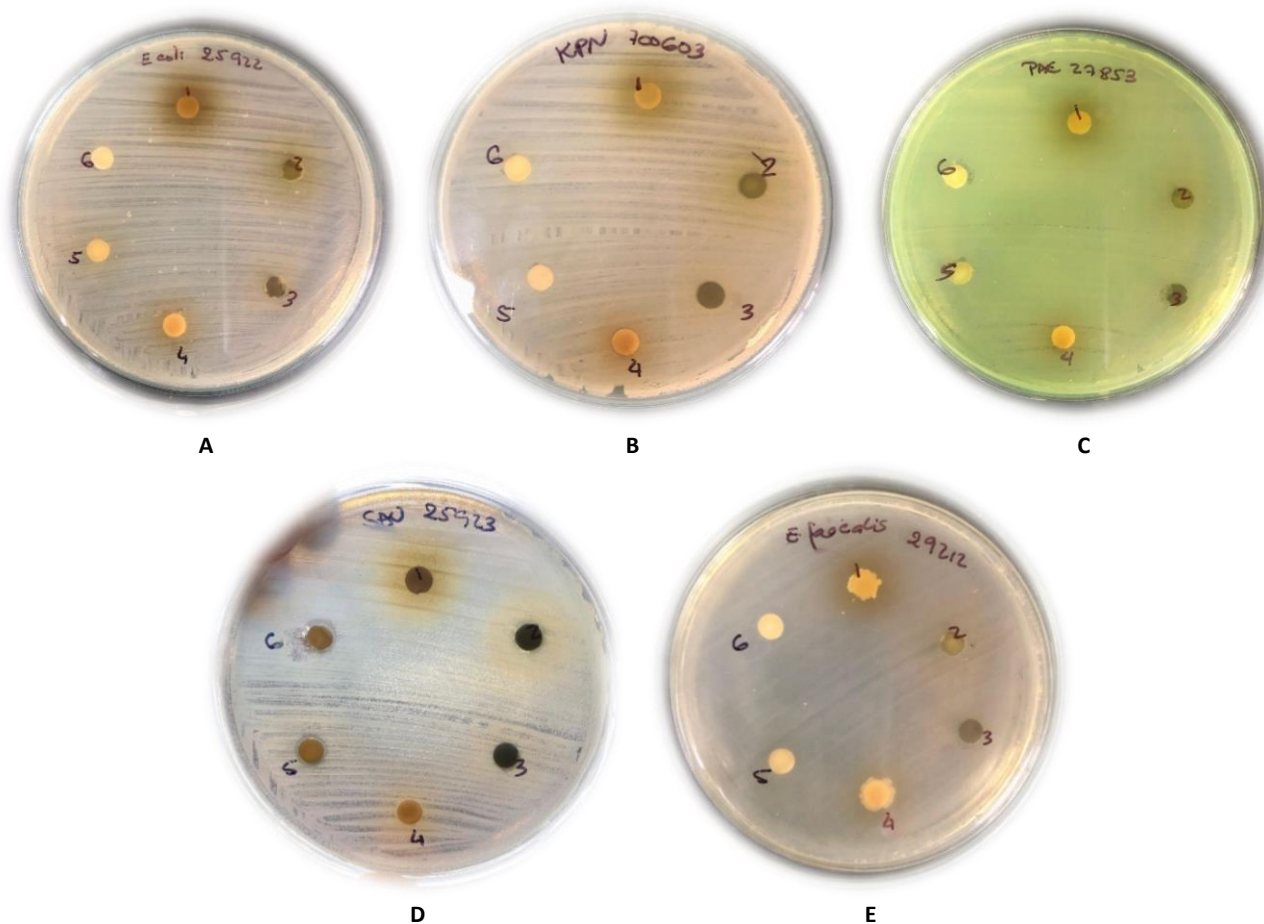
Halo de inhibición formado por el antibiótico patrón: gentamicina



Nota: la flecha indica el diámetro medido del halo de inhibición de la gentamicina (antibiótico utilizado como control positivo) = 23 mm.

Figura 9

Extractos de P. sagittalis enfrentados a diferentes cepas ATCC en placas de Petri con agar MH



(A) extractos + cepa ATCC de *E. coli* 25922.; (B) extractos + cepa ATCC de *K. pneumoniae* 700603.; (C) extractos + cepa ATCC de *P. aeruginosa* 27853.; (D) extractos + cepa ATCC de *S. aureus* 25923.; (E) extractos + cepa ATCC de *E. faecalis* 29212.

Nota: (1) extracto acuoso de hojas; (2) extracto etanólico de hojas; (3) extracto diclorometánico de hojas; (4) extracto acuoso de flores; (5) extracto etanólico de flores; (6) extracto diclorometánico de flores.

Sólo los extractos etanólicos tanto de hojas y flores (H2 y F2 correspondientes a las siembras con números 2 y 5)) y del extracto diclorometánico de flores (F3 correspondiente a la siembra con número 6) frente a la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 25923 (Figura 9 - D) mostraron una actividad antimicrobiana moderada en base a la formación de los halos de inhibición cuyos valores se muestran en la Tabla 4. El extracto F3 (número 6) muestra una actividad antimicrobiana ligeramente mayor.

Tabla 4

Medidas de los halos de inhibición de los extractos de hojas y flores de P. sagittalis frente a cepas ATCC en estudio por el método de difusión por discos

Extracto	<i>E. coli</i> 25922	<i>K. pneumoniae</i> 700603	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>S. aureus</i> 25923
H1	-	-	-	-	-
H2	-	-	-	-	7 mm
H3	-	-	-	-	-
F1	-	-	-	-	-
F2	-	-	-	-	7 mm
F3	-	-	-	-	8 mm

(H1) extracto acuoso de hojas.; (H2) extracto etanólico de hojas.; (H3) extracto diclorometánico de hojas.; (F1) extracto acuoso de flores.; (F2) extracto etanólico de flores.; (F3) extracto diclorometánico de flores.

Nota: (-) significa “no desarrollo de halo de inhibición”. Los diámetros de los halos fueron expresados en milímetros (mm).

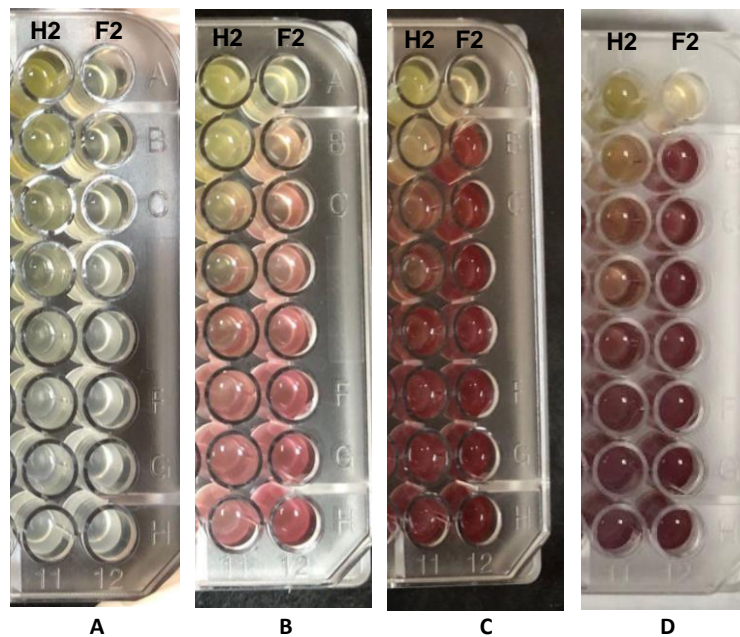
Por tal motivo se determinó la CIM por el método de microdilución en placa solamente a los extractos (H2, F2 y F3) frente a la cepa ATCC de *S. aureus* 25923.

4.5.2. CIM (concentración inhibitoria mínima) y CBM (concentración bactericida mínima)

Como se observa en la Figura 10 - C y 10 - D, la incubación de los extractos con el inóculo durante 24 horas a 37°C seguida de la adición del INT, permitió visualizar las zonas de inhibición. La aparición de un color violeta o rosado pálido indicó el umbral de concentración a partir del cual se inhibe el crecimiento bacteriano, mientras que, la ausencia de coloración violeta en el pocillo previo se consideró como la CIM.

Figura 10

Método cuantitativo en microplaca para extractos de P. sagittalis frente a cepa ATCC S. aureus 25923



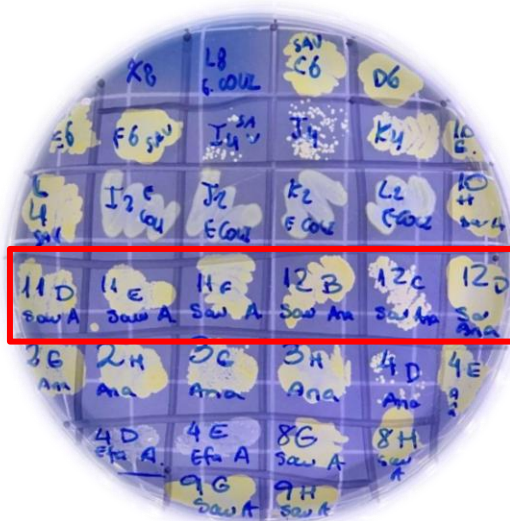
(A) microplaca sin INT.; (B) microplaca con INT, pre incubación.; (C) microplaca con INT post incubación, fondo oscuro.; (D) microplaca con INT post incubación, fondo claro.

Nota: las calles 11 y 12 corresponden a los extractos etanólico de hojas y etanólico de flores (H2 y F2) respectivamente.

En consecuencia, se estimó la CIM para H2 en el segundo pocillo correspondiente a un factor de dilución al $\frac{1}{2}$, equivalente a 1.25 mg/mL y para F2 en el primer pocillo con una dilución equivalente a 2.5 mg/mL frente a la cepa ATCC *S. aureus* 25923. Seguidamente, para determinar la CBM, se repicaron en placas de MH los pocillos conteniendo diluciones por encima y por debajo de aquellos que mostraron inhibición (Figura 11).

Figura 11

Primera determinación de la CBM de extractos de P. sagittalis frente a la cepa ATCC S. aureus 25923

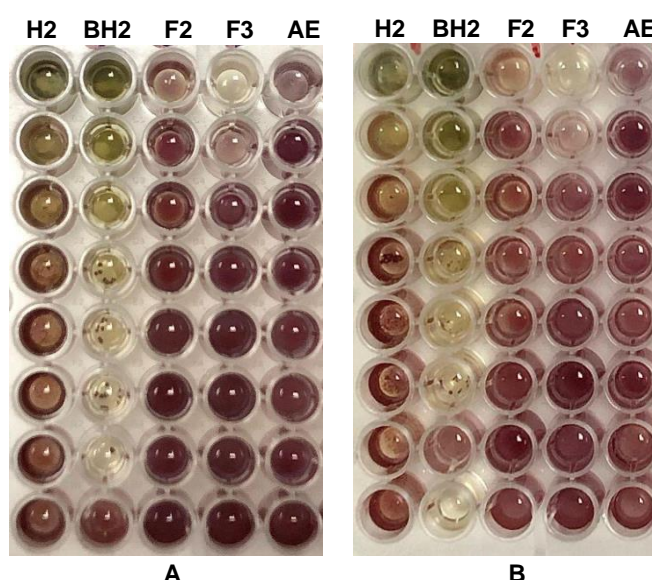


Nota: el extracto H2 fue repicado en las posiciones 11D, 11E, 11F; el extracto F2 en las posiciones 12B, 12C, 12D.

La prueba para determinar la CBM frente a la cepa ATCC *S. aureus* 25923 se hizo en base a la disponibilidad de espacio en la placa (Figura 11) y se pudo observar que, a pesar de que se repicaron las diluciones superior e inferior a las que dieron coloración después de agregar el INT, hubo desarrollo de colonias en todas las posiciones por lo que no se pudo determinar la CBM. Por tal motivo, fue necesario repetir el método y esta vez se incluyó un blanco de extracto para H1 (por ser el más coloreado) y se incluyó, además, el aceite esencial. Este segundo ensayo se realizó por duplicado (Figura 12).

Figura 12

Primera repetición del método cuantitativo en microplaca para extractos y aceite esencial de P. sagittalis frente a cepa ATCC S. aureus 25923

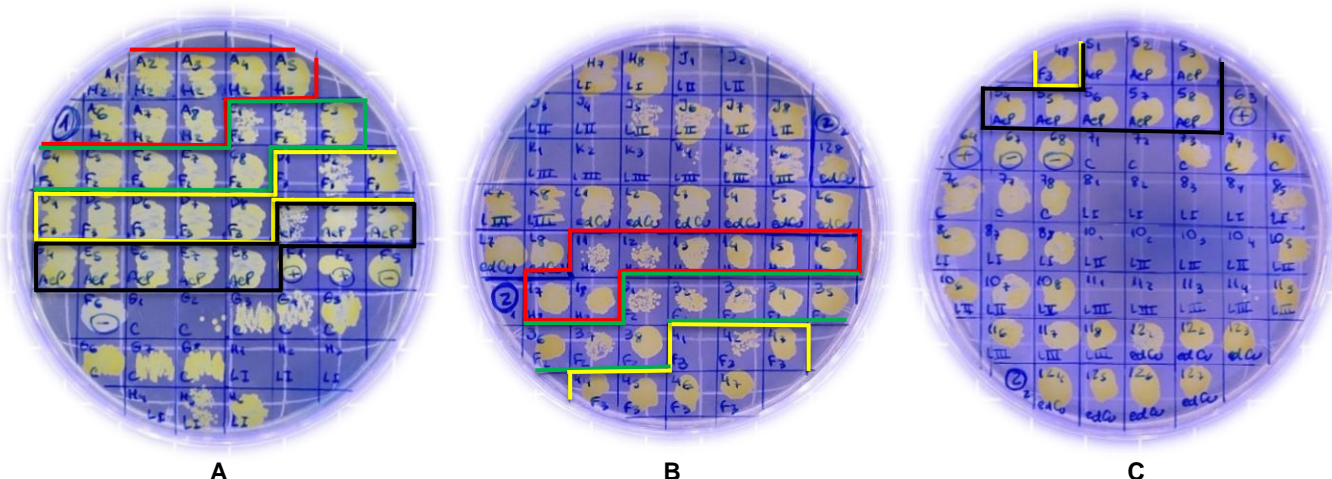


(A) microplaca post incubación con INT.; (B) microplaca del duplicado post incubación con INT.
 Nota: (H2) extracto acuoso de hojas.; (BH2) blanco del extracto acuoso de hojas.; (F2) extracto etanólico de flores.; (F3) extracto diclorometánico de flores.; (AE) aceite esencial de *P. sagittalis*.

Al realizar nuevamente el ensayo, se observó coloración violeta o rosada en la mayoría de los pocillos, exceptuando a los correspondientes al blanco de extracto; por lo cual, a pesar de haber vuelto a realizar el ensayo (por duplicado) en las mismas condiciones que la primera vez, incluido el blanco de extracto de H2 y ensayado el aceite esencial (AE) (Figura 12), luego de añadir el colorante INT era esperable no dar con la CBM. Esto se confirmó luego de repicar todos los pocillos en placas con agar MH y observar crecimiento en todas las posiciones (Figura 13).

Figura 13

Primera repetición CBM de extractos y aceite esencial de *P. sagittalis* frente a la cepa ATCC *S. aureus* 25923



(A) recuadro rojo: diluciones de extracto etanólico de hojas H2, recuadro verde: diluciones de extracto etanólico de flores F2, recuadro amarillo: diluciones de extracto diclorometánico de flores F3, recuadro negro: diluciones de aceite esencial.; (B) y (C) ídem A pero del ensayo duplicado.

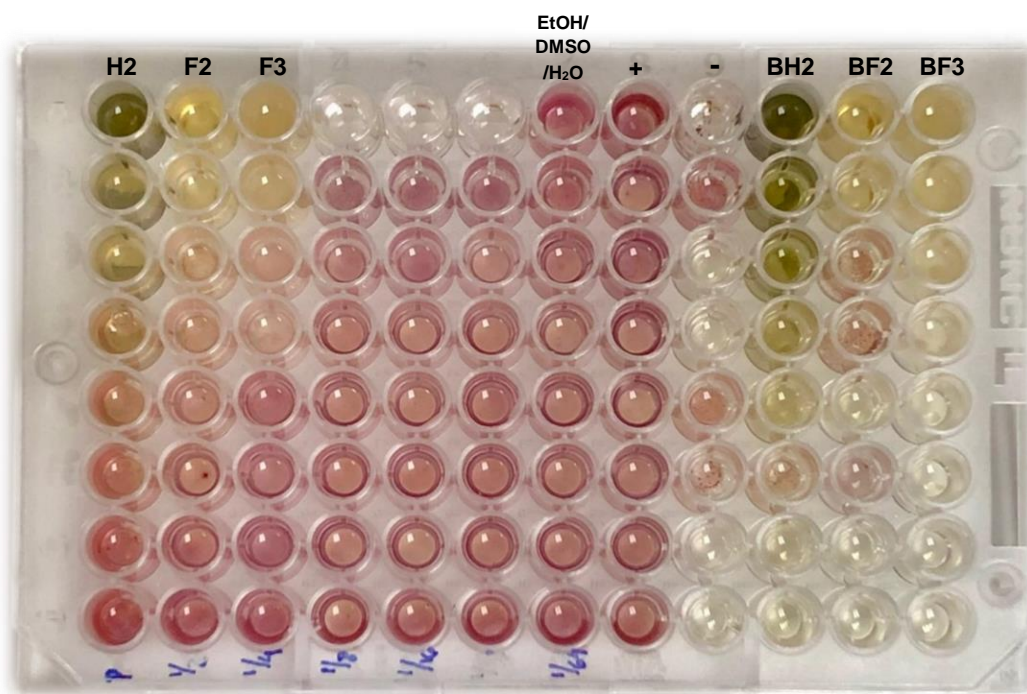
De acuerdo con la Figura 12, luego del agregado del INT a la microplaca hubo desarrollo de color en todos los pocillos, incluidos los que se correspondían a las concentraciones más altas, por lo que se esperaba el desarrollo de microorganismos en todas las concentraciones ensayadas. Esto se comprobó en todas las placas repicadas (Figura 13) no pudiendo llegar a determinar las CBM ni de los extractos ni del aceite esencial probado, lo que implicaría partir de concentraciones iniciales más altas para dar con las mismas.

Subsiguientemente, se realizó una última repetición del ensayo, buscando optimizar las condiciones experimentales mediante el aumento significativo de las masas iniciales y la modificación de los solventes empleados para mejorar la disolución de los extractos, con el objetivo de minimizar

las variables de error (Figura 14). Sin embargo, no fue posible volver a ensayar en mayores concentraciones el aceite esencial debido al bajo rendimiento al momento de su obtención.

Figura 14

Segunda y última repetición del método cuantitativo en microplaca para extractos de P. sagittalis frente a cepa ATCC S. aureus 25923 post agregado de INT



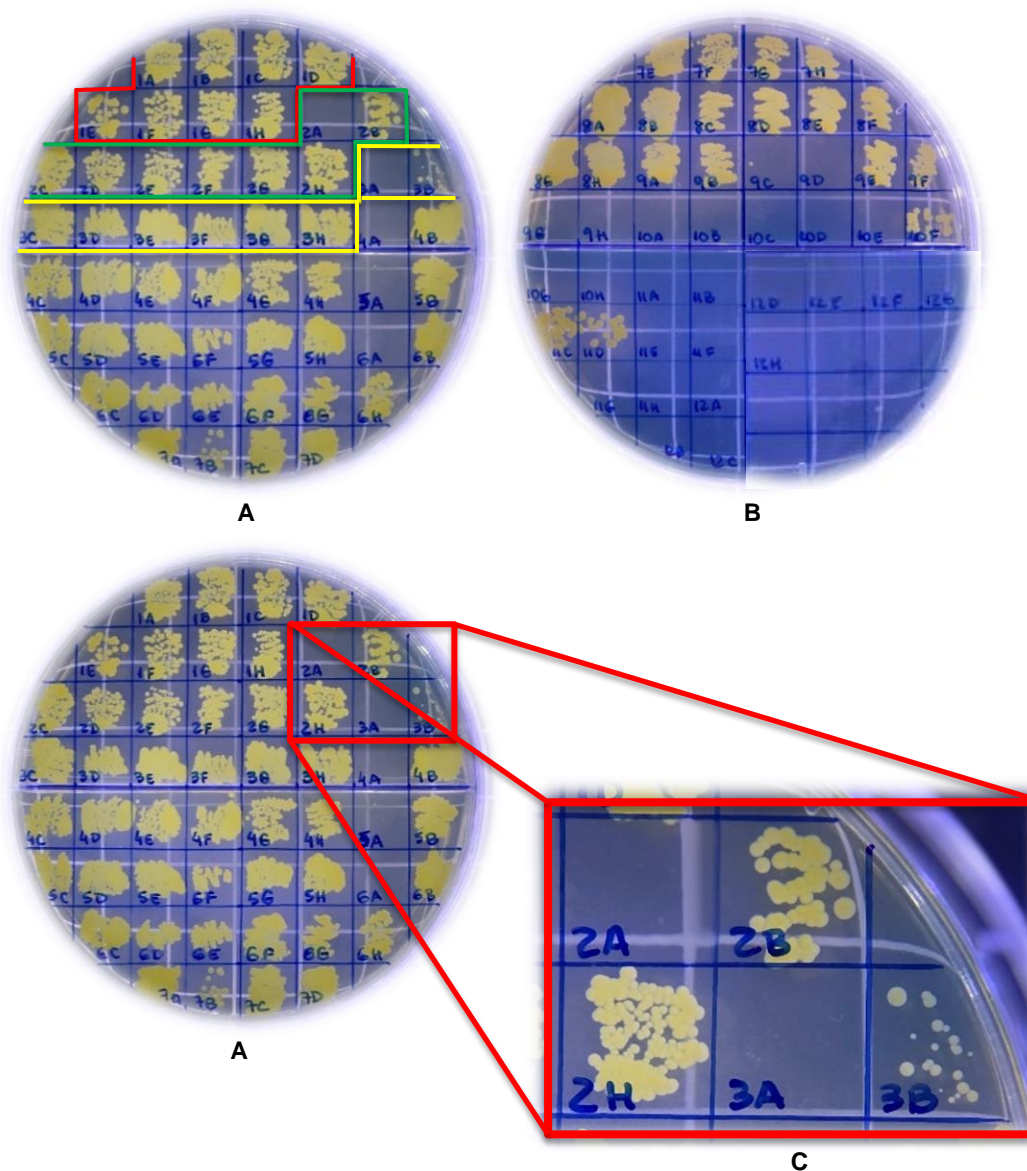
(EtOH/DMSO/H₂O) control de mezcla de solventes utilizados para disolver los extractos.; (+) control positivo del microorganismo.; (-) control negativo del microorganismo.; (BH2) blanco de extracto H2.; (BF2) blanco de extracto F2.; (BF3) blanco de extracto F3.

Ésta vez se partió de una masa inicial de 30 mg de cada extracto (H2, F2 y F3) que se disolvieron en 50 µL de etanol, 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 300 µL de agua destilada. Se realizaron los blancos de extractos correspondientes y también un blanco de solventes para determinar su comportamiento frente a la cepa en estudio (Figura 14). Después de la incubación y el agregado de INT se estimó la CIM para H2 en el tercer pocillo donde la dilución correspondía a 3.75 mg/mL, y para F2 y F3 en el segundo pocillo donde la dilución era equivalente a 7.5 mg/mL.

Se repicaron todos los pocillos de la microplaca en una placa de Petri con agar MH para nuevamente intentar determinar la CBM frente a la cepa ATCC *S. aureus* 25923 (Figura 15) tomando todas las concentraciones ensayadas, incluidos los blancos de extracto, controles positivo y negativo para, incluso, evaluar la posibilidad de contaminación durante el desarrollo del ensayo.

Figura 15

Segunda y última repetición CBM de extractos de P. sagittalis frente a la cepa ATCC S. aureus 25923



(A) recuadro rojo: diluciones de extracto etanólico de hojas H2, recuadro verde: diluciones de extracto etanólico de flores F2, recuadro amarillo: diluciones de extracto diclorometánico de flores F3.; (B) muestras correspondientes a otro ensayo, controles positivos y negativos de crecimiento.; (C) Detalle de la CBM para diluciones correspondientes a F2 y F3.

De acuerdo con la Figura 14, para el caso de H2, según el desarrollo de color observado en la microplaca, se esperaba dar con la CBM. Luego de repicar en el agar MH se observó desarrollo en todas las concentraciones probadas lo que indicó que se requieren concentraciones más altas para lograr la concentración bactericida y que la observación del color producido por el INT se vio enmascarada por la propia coloración del extracto (Figura 15 – A; recuadro rojo).

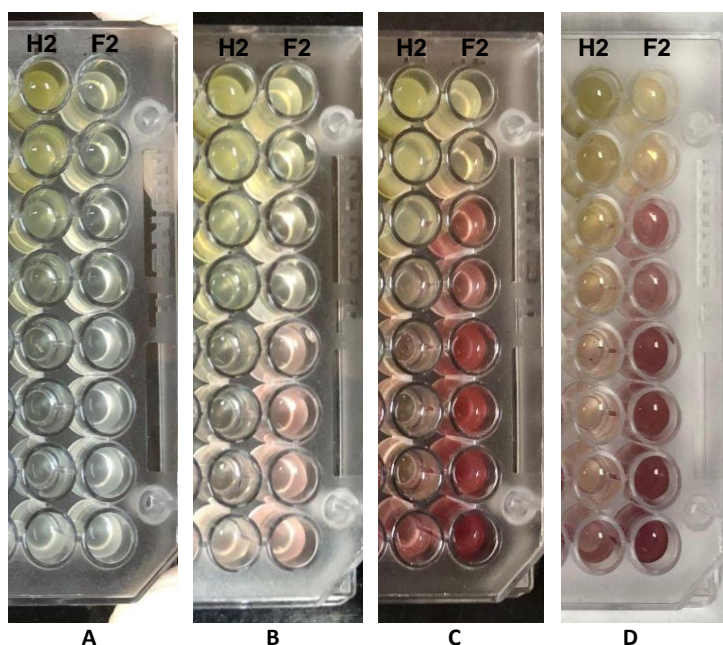
Finalmente, se pudo determinar la CBM tanto para el extracto F2 como para el F3, coincidiendo ambos en el pocillo número 1 donde la dilución era equivalente a 15 mg/mL (Figura 15 – A; recuadro verde y recuadro amarillo).

Asimismo, pese a que los extractos F2 y F3 coinciden en su CBM, se observó una actividad antibacteriana ligeramente mayor para F3 al comparar los segundos pocillos repicados en el agar (Figura 15 – C); es decir, se pudo apreciar menor desarrollo del microorganismo a la misma concentración frente a este último extracto mencionado. Este resultado concuerda con lo obtenido a través del método cualitativo de difusión por discos donde el halo de inhibición generado por F3 era ligeramente mayor a F2 y H2 (Figura 9 – D) (Tabla 4).

Por otro lado, por un hecho fortuito se probó la actividad antimicrobiana frente a la cepa ATCC *S. aureus* 43300, una cepa resistente a meticilina.

Figura 16

Método cuantitativo en microplaca para extractos de P. sagittalis frente a cepa ATCC S. aureus 43300



(A) microplaca sin INT.; (B) microplaca con INT, pre incubación.; (C) microplaca con INT post incubación, fondo oscuro.; (D) microplaca con INT post incubación, fondo claro.

Nota: las calles 11 y 12 corresponden a los extractos etanólico de hojas y etanólico de flores (H2 y F2) respectivamente.

De acuerdo con los cambios de color observados post incubación con INT (Figura 11 – C y D) se estimó la CIM para H2 en el tercer pocillo donde la dilución era de 0.625 mg/mL y para F2 en el segundo pocillo con una dilución equivalente a 1.25 mg/mL. Para determinar la CBM, se repicaron en placas de MH los pocillos de diluciones por encima y por debajo de los puntos indicados. A pesar de

esto no fue posible determinar la CIM ni la CBM de los extractos frente a esta cepa meticilino/oxacilina resistente, por lo que debería continuarse con esta línea de investigación.

5. Conclusión

En conformidad con los objetivos propuestos en el plan del presente trabajo, logré adquirir una sólida formación y destreza en la práctica manual de laboratorio, así como también aptitud en la toma de decisiones frente a situaciones desafiantes e inesperadas que surgieron durante el transcurso del proyecto. Este proceso representó un avance significativo tanto en el ámbito profesional como personal, permitiéndome llevar a la práctica los conocimientos teóricos aprendidos a lo largo de todos estos años de formación académica e integrarlos con esta iniciación en el campo de la investigación científica.

En este sentido, logré interiorizarme en el estudio de los productos naturales a través de la caracterización fitoquímica de la especie en estudio mediante el dosaje de familias de componentes químicos naturales como los fenoles, flavonoides y taninos, y relacionarlos a su actividad antioxidante por metodologías que implican la captación de radicales libres (DPPH y ABTS).

En cuanto al criterio científico, he podido llegar a importantes conclusiones relacionadas a las diferencias encontradas con estudios previos realizados en la misma especie vegetal pero nativa de Brasil, donde el extracto más activo fue el etanólico de hojas, en contraste a lo obtenido en este estudio, donde el extracto con mayor actividad resultó ser el acuoso de hojas.

Otro aspecto de mi formación con esta práctica se demostró con la capacidad de correlacionar la actividad antibacteriana de *P. sagittalis* con el órgano vegetal y el tipo de polaridad de la extracción. Al respecto, he podido concluir que la manera de realizar la extracción permite potenciar una extracción selectiva respecto de la mayor actividad antibacteriana, al observar que el extracto diclorometánico de flores (F3) resultó ser el de mayor actividad frente a la cepa ATCC *S. aureus* 25923, seguido por el extracto etanólico de flores (F2) y finalmente, el extracto etanólico de hojas (H2) que resultó ser el que menos actividad presenta.

En conclusión, esta práctica optativa me permitió adquirir una valiosa experiencia en la investigación científica, desarrollar habilidades y destrezas en la práctica de laboratorio y analizar críticamente los resultados obtenidos, lo que contribuye significativamente a mi formación personal y profesional.

6. Referencias bibliográficas

- Ahemd, S. A., & Kamel, E. M. (2013). *Phenolic constituents and biological activity of the genus Pluchea*. Der Pharma Chemica, 109–114.
- Akerele, Olayiwola. (1993). *Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar*. Foro mundial de la salud 1993; 14(4):390-395.
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A., Velázquez, D., & Asociación Interciencia. (2005). *La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales*. Interciencia, 8, 453–459.
- Da Silva Freitas, L., De Andrade, W. P., Barreto, D. N., Da Costa Silva, T., Santiago, M. B., Martins, M. M., Carvalho, M., Pereira, D. P., Thuler, R. T., Martins, C. H. G., De Miranda Coelho, V. P., & Cunha, L. C. S. (2022). *Antifungal and antioxidant activities and chemical constituents from Pluchea sagittalis*. Research Society and Development, 11(7), e40111730059.
- Fernández, N. L., Dellacassa, E., & Ricciardi, G. (2023). *Fitoquímica de extractos y aceite esencial de Pluchea sagittalis (Lam.) Cabrera del Nordeste Argentino*. In Octavo Encuentro Nacional De Química.
- Grandini, C. P. (2017). *OBTENÇÃO DE EXTRATOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS DE Pluchea sagittalis (Lam.) Cabrera (QUITOCO): PROCESSOS E ANÁLISES*. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Gupta, R., 1, Gabrielsen, B., 2, & Ferguson, S. M., 1. (2005). *Nature's Medicines: Traditional Knowledge and Intellectual Property Management*. Case Studies from the National Institutes of Health (NIH), USA. Current Drug Discovery Technologies (Vol. 2, pp. 203–219).
- Heinrich, M., Barnes, J., Prieto-García, J., Gibbons, S., & Williamson, E. M. (2018). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy* (3rd Edition).
- Hussain, H., Ahmed Al-Harrasi, Ghulam Abbas, Najeeb Ur Rehman, Fazal Mabood, Ishtiaq Ahmed, Muhammad Saleem, Teunis van Ree, Ivan R. Green, Saeed Anwar, Amin Badshah, Afzal Shah, & Iftikhar Ali. (2013). *The Genus Pluchea: Phytochemistry, Traditional Uses, and Biological Activities*. In CHEMISTRY & BIODIVERSITY (Vols. 10–10).
- Katewa S, Chaudhary B, Jain A (2004). *Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. J. Ethnopharmacol.* 92: 41-46.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1998). *ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY*. Free Radical Biology & Medicine (Vol. 26, 1231–1237).

- Ricciardi Verrastro, B. V. (2020). *Evaluación fitoquímica y biológica (actividades antimicrobiana y alexitérica) de extractos de Cissampelos pareira* (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Corrientes, Argentina.
- Sadeer, NB, Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G. y Mahomoodally, MF (2020). *La versatilidad de los ensayos de antioxidantes en la ciencia y la seguridad alimentaria: química, aplicaciones, ventajas y limitaciones*. En Antioxidantes.
- Sharma, S. K. & Naveen Goyal. (2011). *Biological Studies of the Plants from Genus Pluchea*. Annals of Biological Research, 25–34.
- Sheldon J, Balick M, Laird S (1997). *Medicinal plants: ¿can utilization and conservation coexist?*. New York Botanical Garden. Nueva York, EEUU. 104 pp.
- Shrestha P, Dhillon S (2003). *Medicinal plant diversity and use in the highlands of Dolakha district, Nepal*. J. Ethnopharmacol, 86: 81-96.
- Wagner, H., Bladt, S. (2001). *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas* (2nd Edition). Springer.