

**Análisis de los compuestos fenólicos y volátiles de plantas medicinales y aromáticas del noroeste de la Patagonia Argentina, estudio de las actividades antioxidante y citotóxica**



**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

*Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco*

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud

Departamento de Química, Sede Esquel

**Lic. Bruno Gastaldi**

26 de Febreo de 2019

Directora: Dra. Silvia B. González.

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

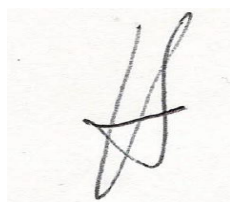
Co-Director: Dr. César A. N. Catalán.

Universidad Nacional de Tucumán.

**Análisis de los compuestos fenólicos y volátiles de plantas medicinales y aromáticas del noroeste de la Patagonia Argentina, estudio de las actividades antioxidante y citotóxica**



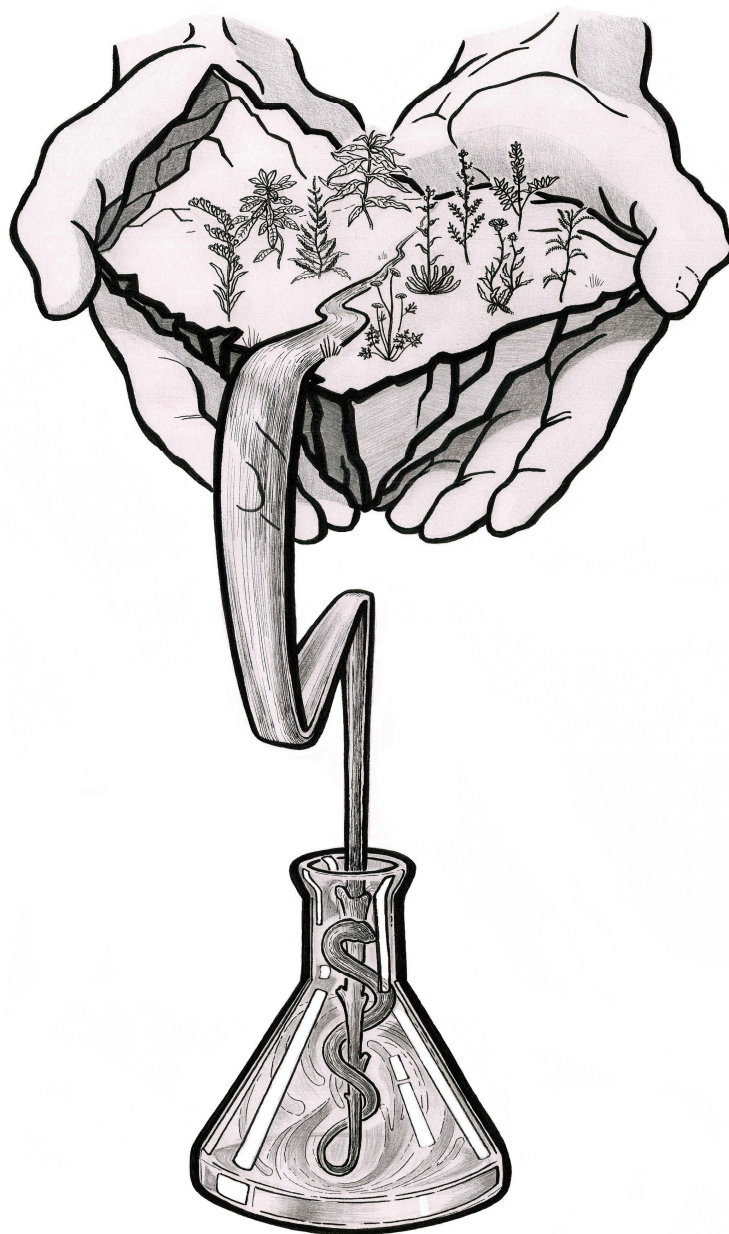
Lic. Bruno Gastaldi  
Doctorando



Dra. Silvia B. González  
Directora



Dr. César A.N. Catalán  
Co-Director



## AGRADECIMIENTOS

El más especial de mis agradecimientos es para mi directora, Silvia B. González, por su acompañamiento, incontables enseñanzas y sobresaliente calidad humana transmitidas a lo largo de todo este proceso.

A mi co-director César A.N. Catalán, por su confianza inicial en este proyecto y sus valiosos aportes.

A mis padres, Clara y Jorge, por su esfuerzo, apoyo incondicional, contención y aliento.

A Gaby V. Nieva por su compañerismo, impulso, alegría y colaboración activa a lo largo de este trabajo. Posiblemente ya uniremos nuestras líneas ;)

A Fresia Melisa Silva-Sofrás, mi hermanita compañera de mesada, siempre compartiendo alegría y palabras de aliento.

A Gabriela Marino y Yanina Assef, por transmitir sus conocimientos con generosidad y rigor científico, en la práctica podría considerarlas dos codirectoras más que tuve la suerte de tener.

A Emilio Lizarraga y Marcelo Wagner, profesionales y seres humanos excepcionales, siempre dispuestos a ayudar.

A investigadores y docentes de distintos ámbitos que realizan día a día su labor con convicción y compromiso profesional. De estos científicos recibí provechosos aprendizajes en diversos cursos de postgrado, los cuales contribuyeron positivamente a este escrito.

A los colegas y/o amigos que de alguna forma ayudaron con su granito de arena en algún momento de esta tesis: Murtin, Valeska, Belen Pildain, Sofía Lopez, Oscar Troncoso, Susana Rizzutto, Alina Greslebin, Gabriela Papazian, Eduardo Wright, Gabriel Martin, Lucas Pereyra, Dario Rubilar, Alejandro Sorín, Enrique Barros, Daiana Retta, Fabio Vallejo, Esteban Nicola, Vadym Cavalera.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>ÍNDICE</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis</b> .....	10
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL y OBJETIVOS</b> .....	11
1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	12
1.2. OBJETIVOS GENERALES.....	19
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>CAPÍTULO 2. ESPECIES AROMÁTICAS y MEDICINALES ESTUDIADAS</b> .....	20
2.1. ANTECEDENTES DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS .....	21
2.2. POBLACIONES, SITIOS DE MUESTREO y CONFECCIÓN DE HERBARIOS .....	41
2.3. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES .....	43
2.4. ESQUEMA GENERAL y ESTRUCTURA DE LOS SIGUIENTES CAPITULOS .....	44
<b>CAPÍTULO 3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE y CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LAS INFUSIONES</b> .....	46
3.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....	47
3.1.1. <i>Antioxidantes y salud, el paradigma de la especies reactivas del oxígeno (EROS)</i> .....	47
3.1.2. <i>Las infusiones de plantas medicinales y aromáticas como fuente dietaria de antioxidantes</i> .....	50
3.1.3. <i>Una primera aproximación a los compuestos fenólicos</i> .....	52
3.1.4. <i>Métodos para medir la actividad antioxidante, contenido de fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides</i> .....	52
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	56
3.2.1. <i>Determinación de la actividad antioxidante por método del DPPH</i> .....	56
3.2.2. <i>Determinación de la actividad antioxidante por <math>\beta</math>-caroteno/ácido linoleico</i> .....	58
3.2.3. <i>Determinación de la actividad antioxidante con un bioensayo de Saccharomyces cerevisiae</i> .....	59
3.2.4. <i>Determinación de fenoles totales</i> .....	60
3.2.5. <i>Determinación de ácidos hidroxicinámicos totales</i> .....	61

3.2.6. <i>Determinación de flavonoides totales</i> .....	62
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	64
3.3.1. <i>Determinación de la actividad antioxidante por los métodos del DPPH, <math>\beta</math>-caroteno/ácido linoleico y S. cerevisiae</i> .....	64
3.3.2. <i>Caracterización general de las infusiones, contenido de antioxidantes, compuestos fenólicos totales, ácidos hidroxicinámicos totales y flavonoides totales</i> .....	67
3.4. CONCLUSIONES .....	69
<b>CAPÍTULO 4. FITOQUÍMICA, IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS y VOLÁTILES</b> .....	70
4.1. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES .....	71
4.1.1. <i>Compuestos fenólicos</i> .....	71
4.1.2. <i>Compuestos volátiles</i> .....	76
4.1.3. <i>Otros metabolitos secundarios potencialmente bioactivos: lactonas sesquiterpénicas, diterpenos y cumarinas.</i> .....	79
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	80
4.2.1. <i>Compuestos fenólicos</i> .....	80
<i>Análisis por cromatografía en capa delgada TLC</i> .....	81
<i>Análisis por HPLC-DAD</i> .....	82
<i>Análisis por HPLC-ESI-MS</i> .....	82
4.2.2. <i>Compuestos volátiles</i> .....	83
<i>Extracción</i> .....	83
<i>Análisis por TLC</i> .....	83
<i>Análisis por GC-FID-MS</i> .....	83
4.2.3. <i>Otros metabolitos secundarios potencialmente bioactivos</i> .....	84
<i>Extractos orgánicos</i> .....	84
<i>Análisis por espectroscopía infrarroja (IR) para Lactonas sesquiterpénicas</i> .....	84
<i>Análisis por TLC para Diterpenos y Cumarinas</i> .....	85
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	85
4.3.1. <i>Compuestos fenólicos</i> .....	85
4.3.2. <i>Compuestos volátiles</i> .....	104
4.3.3. <i>Otros metabolitos secundarios potencialmente bioactivos</i> .....	117

4.4. CONCLUSIONES .....	120
-------------------------	-----

## **CAPÍTULO 5. ACTIVIDAD CITOTÓXICA, TOXICIDAD GENERAL Y POTENCIAL**

<b>ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA.....</b>	<b>122</b>
---------------------------------------	------------

5.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	123
---------------------------------------	-----

5.2. MATERIALES Y METODOS.....	129
--------------------------------	-----

5.2.1. Toxicidad general mediante el bioensayo de <i>Artemia salina</i> .....	129
---	-----

5.2.2. <i>Toxicidad general y genotoxicidad mediante el test de Allium cepa</i> .....	131
---	-----

5.2.3. Citotoxicidad sobre líneas celulares HTR8/SVneo, T84, HT-29 y Caco-2.....	135
--	-----

<i>Ensayo de proliferación celular por método del MMT</i> .....	135
---	-----

<i>Ensayo de Apoptosis</i> .....	138
----------------------------------	-----

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	140
-----------------------------------	-----

5.3.1. Toxicidad general mediante el bioensayo de <i>Artemia salina</i> .....	140
---	-----

5.3.2. <i>Toxicidad general y genotoxicidad mediante el test de Allium cepa</i> .....	143
---	-----

5.3.3. Citotoxicidad sobre líneas celulares HTR8/SVneo, T84, HT-29 y Caco-2 .....	145
---	-----

<i>Ensayo de proliferación celular por método del MMT</i> .....	145
---	-----

<i>Ensayos de Apoptosis</i> .....	148
-----------------------------------	-----

5.4. CONCLUSIONES .....	151
-------------------------	-----

## **CAPÍTULO 6. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN y CONCLUSIONES**

<b>FINALES .....</b>	<b>152</b>
----------------------	------------

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	153
-------------------------------	-----

6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	154
---------------------------------	-----

6.2. CONCLUSIONES FINALES .....	160
---------------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>161</b>
---------------------------	------------

## RESUMEN

El estudio de las propiedades y potenciales aplicaciones de la biodiversidad de plantas aromáticas y medicinales es un tema prioritario en todo el mundo. Las especies vegetales continúan siendo, en tiempos actuales, una fuente promisoría de nuevos productos naturales para el desarrollo de fitomedicamentos, suplementos dietarios y productos cosméticos. Esta importancia es atribuible a los metabolitos secundarios de las plantas, los que además, son cruciales en el mantenimiento de la biodiversidad de los ambientes y en las regulaciones de las interacciones ecológicas. Asimismo, existe un amplio consenso sobre la necesidad de estudiar en mayor profundidad las propiedades nutraceuticas de plantas novedosas, como la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos, además de bioactividades relacionadas como la actividad citotóxica sobre células derivadas de cáncer.

La región patagónica presenta ambientes diversos con elevada riqueza florística, en los que están presentes el 65% de las familias botánicas de Argentina y el 40% de los géneros. El número registrado de especies para esta región es de 1358, sólo un 13 % son exóticas; lo que pone de manifiesto la importancia de la flora nativa en esta región, que incluye plantas endémicas y géneros monotípicos. Muchas de ellas presentan usos etnobotánicos medicinales y alimenticios atribuidos al conocimiento de los pueblos originarios de esta región, como Tehuelches, Araucanos y Mapuches.

*Adesmia boronioides*, *Apium australe*, *Artemisia magellanica*, *Buddleja globosa*, *Drimys andina*, *Dysphania multifida*, *Glycyrrhiza astragalina*, *Grindelia chilensis*, *Madia sativa* y *Solidago chilensis* son plantas con escasos antecedentes fitoquímicos y biológicos, por lo que fueron seleccionadas y estudiadas por primera vez en numerosos aspectos novedosos para las especies. Se describieron por primera vez características nutraceuticas de las infusiones, analizando los principales compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, también se estudió la citotoxicidad sobre células derivadas de cáncer de colon. Por otro lado, se analizaron los perfiles de compuestos volátiles y se analizó la presencia de otros metabolitos secundarios específicos (lactonas sesquiterpénicas, diterpenos y cumarinas).

Los resultados muestran la importancia y el potencial de algunas de las especies nativas analizadas como fuente novedosa de antioxidantes y compuestos fenólicos dietarios. Muchas de ellas poseen altos niveles de antioxidantes y fenoles, superiores a los de otras plantas consumidas históricamente en otras partes del mundo; en algunos casos, por ejemplo, los valores son mayores al del té verde. Las infusiones de *B. globosa*, *D. andina* y *S. chilensis* se destacaron en cuanto a su actividad antioxidante. Se identificaron 28 compuestos fenólicos y se describieron los perfiles de los compuestos volátiles para las especies aromáticas.

Respecto a la actividad citotóxica y potencial actividad anticancerígena, se encontró que *A. boronioides* y *S. chilensis* ejercen una citotoxicidad muy interesante sobre células derivadas de cáncer de colon, posiblemente por apoptosis. Es notorio como las plantas que cuentan con mayores antecedentes de usos medicinales, fueron las que resultaron más interesantes en el abordaje central de este trabajo. Esto resalta la importancia de los conocimientos de los pueblos originarios y el valor de los datos bibliográficos etnobotánicos.

## ABSTRACT

The biodiversity of plants and their properties are a priority issue of research for the scientific world. Plants are a promising source of natural products for the development of new phytomedicines, supplements and cosmetic products. The key to their applicability relies on the plants' secondary metabolites. These molecules are crucial for the maintenance of environmental biodiversity and the regulation of ecological functioning. Besides, there is broad consensus on the need to explore in depth the nutraceutical properties of novel plants, such as antioxidant activity, phenolic compound content and cytotoxic activity on cancer cells.

The Patagonian region is diverse in environments with high floristic richness, with 65% of the botanical families of Argentina and 40% of the botanical genera. There are 1358 registered species for this area, of which only 13% are exotic, which highlights the incidence of native flora for this region, including endemic plants and monotypic genera. Many of these plants have medicinal and nutritional uses registered in the ethnobotanical folk knowledge of the Tehuelches, Araucanians and Mapuches communities.

*Adesmia boronioides*, *Apium australe*, *Artemisia magellanica*, *Buddleja globosa*, *Drimys andina*, *Dysphania multifida*, *Glycyrrhiza astragalina*, *Grindelia chilensis*, *Madia sativa* and *Solidago chilensis* are Patagonian native plants with little phytochemical and biological background. The nutraceutical properties of their infusions are described here for first time, analyzing their phenolic compounds, antioxidant activity and cytotoxicity on colon cancer cells. Additionally, their volatile compounds profiles are presented, along with some specific secondary metabolites (sesquiterpene lactones, diterpenes and coumarins) that were sought. Results show the potential value of some of these native species as a novel source of antioxidants and dietary phenolic compounds. Many of these plants have high levels of antioxidants and phenols, with values higher than those of other plants consumed around the world, in some cases even higher than green tea. In particular, the infusions of *B. globosa*, *D. andina* and *S. chilensis* have the highest levels for antioxidant activity. Twenty-eight phenolic compounds were identified and the profiles of the volatile compounds for the aromatic species were described.

Regarding cytotoxicity and potential anticarcinogenic activity, it was found that *A. boronioides* and *S. chilensis* exert cytotoxicity on colon cancer cells by possibly apoptosis. It is striking that the plants most used historically showed the most interesting results about the central topics of this work. This highlights the importance of traditional knowledge and the value of ethnobotanical research.

## ***Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis***

2018. **Gastaldi, B.**, Catalán C.A.N., Silva Sofrás F.M. y González S. B. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae), a medicinal plant from SouthAmerica. A comprehensive review: ethnomedicinal uses, phytochemistry and bioactivity. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Aromáticas y Medicinales 17(1):17-29.

2018. **B. Gastaldi**, G. Marino, Y. Assef, F. M. Silva Sofrás, C.A.N. Catalán y S. B. González. Nutraceutical Properties of Six Native Plants Consumed as Herbal Infusion in Argentinian Patagonia. Plant Foods For Human Nutrition 73(3):180-188.

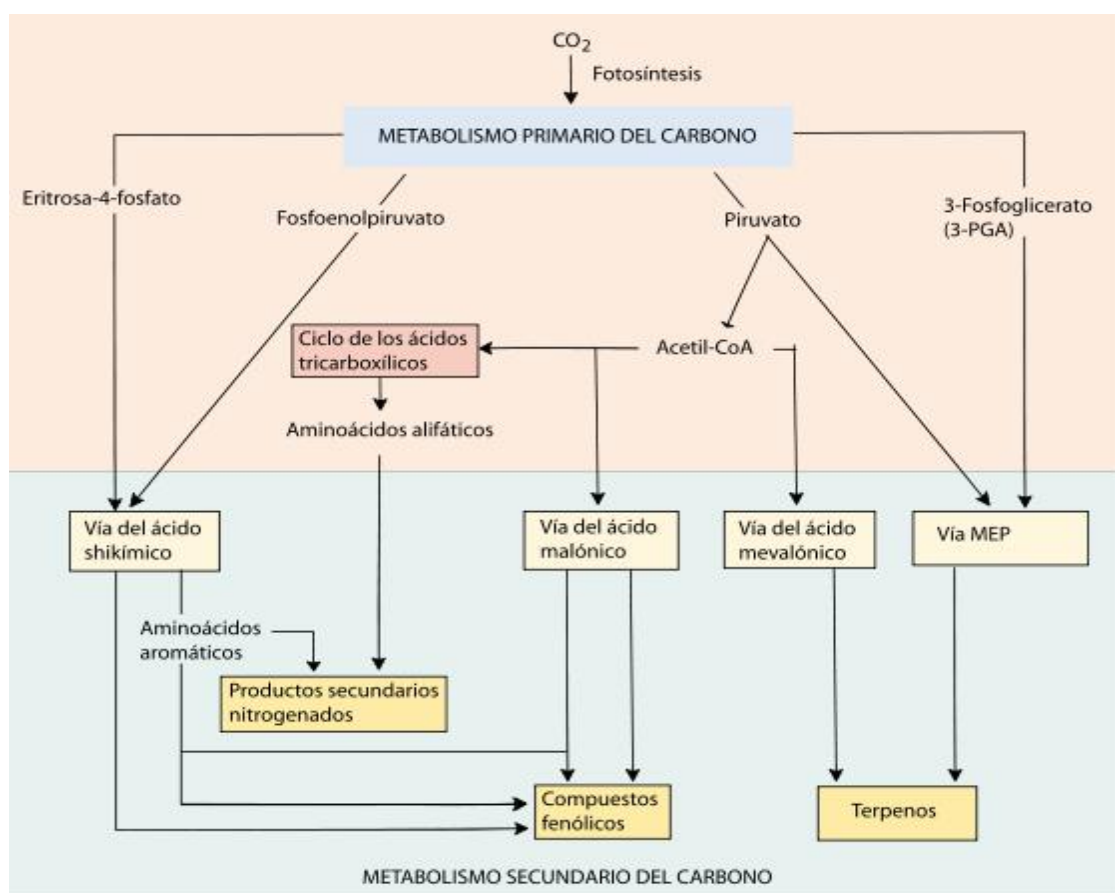
## **CAPÍTULO 1.**

### **INTRODUCCIÓN GENERAL y OBJETIVOS**

## 1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los compuestos fenólicos y los volátiles son dos grandes grupos de metabolitos que produce el Reino Plantae a través de las rutas biosintéticas propias del metabolismo vegetal (Fig.1.1 y 1.2). Para lograr una mejor comprensión de estas rutas biosintéticas, se suele clasificar al metabolismo vegetal en primario y secundario (Fig. 1.1).

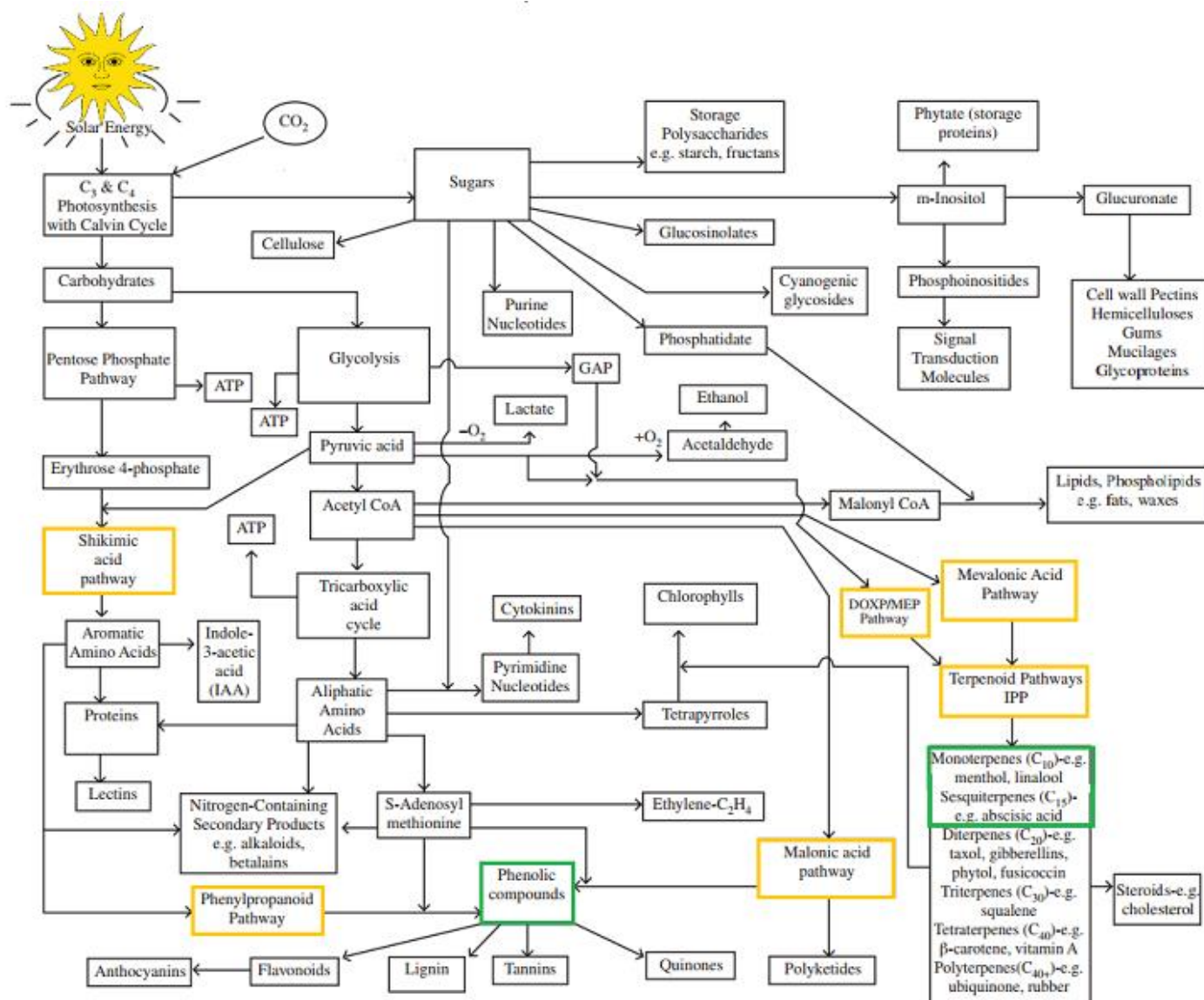
Se consideran metabolitos primarios a los compuestos orgánicos presentes en todas las especies vegetales que cumplen roles esenciales durante las diferentes etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas; entre ellos se encuentran lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, azúcares, fitoesteroles y ácidos orgánicos (Dewick, 2009).



**Figura 1.1.** Esquema simplificado del metabolismo vegetal, adaptado de Taiz y Zeiger (2006). La zona rosa representa el metabolismo primario, la zona celeste representa el metabolismo secundario. Los compuestos fenólicos y los terpenos son grupos de moléculas con gran protagonismo en el metabolismo secundario de las plantas.

Por otro lado, los metabolitos secundarios conforman una enorme variedad de compuestos orgánicos producidos por las plantas que no tendrían un rol esencial en el crecimiento y desarrollo. Sin embargo han demostrado tener significancia adaptativa en la protección contra herbívoros y patógenos, como atrayentes de polinizadores y animales dispersores de semillas, y como agentes alelopáticos (Taiz y Zeiger, 2006). En general determinados metabolitos secundarios están presentes en grupos taxonómicos limitados y algunas de sus funciones son aún

desconocidas. Esta variedad de compuestos es utilizada y aplicada de distintas formas por parte de la humanidad, por ejemplo como colorantes, ceras, aceites, saborizantes, repelentes, insecticidas, herbicidas, perfumes, antibióticos y diversas drogas. Los metabolitos secundarios derivan biosintéticamente de un número reducido de metabolitos primarios. El concepto actual es que las plantas utilizan su metabolismo primario para crecer y desarrollarse, y el metabolismo secundario para interactuar con el entorno (Taiz y Zeiger, 2006).



**Figura 1.2.** Esquema integral del metabolismo vegetal, adaptado de Cseke y Kaufman (2006). En verde se resaltan los compuestos fenólicos (*phenolics compounds*) y los volátiles (*monoterpenes* y *sesquiterpenes*), los cuales tienen un gran protagonismo en la variedad de moléculas que producen las plantas. En naranja se resaltan las principales rutas metabólicas por las que estos compuestos son biosintetizados en el organismo vegetal.

Las plantas medicinales y aromáticas suelen ser ricas en metabolitos secundarios, compuestos a los que generalmente se les atribuyen propiedades biológicas y/o farmacológicas de interés, como por ejemplo las actividades antioxidante y citotóxica (Yanez *et al.*, 2004; Carmona y Pereira, 2013).

Los compuestos fenólicos poseen en su estructura uno o más grupos hidroxilos unidos a un anillo aromático. Debido a esto son moléculas típicamente antioxidantes, ya que pueden neutralizar electrones desapareados de los radicales libres, generalmente por transferencia del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo, transformándose a su vez en una especie estabilizada por resonancia (Vermeris y Nicholson, 2006). Se trata de un grupo heterogéneo con más de 10.000 compuestos conocidos hasta el momento y gran diversidad estructural y funcional (Fig. 1.3 A). En los últimos años se ha incrementado el interés por saber más de estos compuestos y sus fuentes naturales, debido principalmente a los efectos prometedores que tienen sobre la salud humana al ser incorporados al organismo, ya sea a través de la dieta, o como suplementos y medicamentos herbales (Vermeris y Nicholson, 2006; Pandey y Rizvi, 2009; Dai y Mumper, 2010).

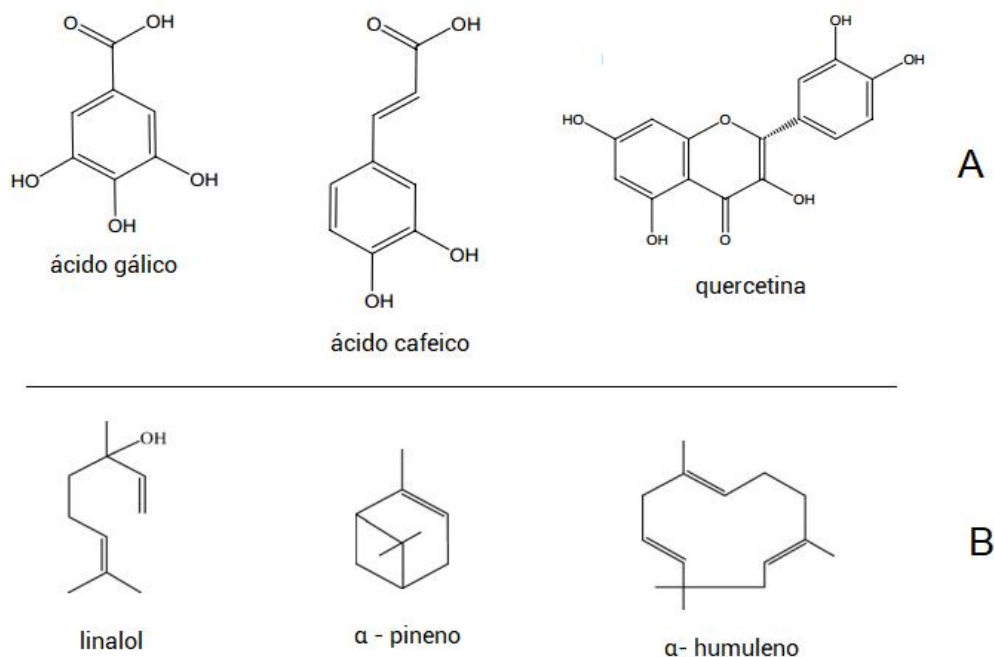
Los compuestos volátiles son un grupo muy amplio y complejo de moléculas relativamente pequeñas. En su mayoría son mono y sesquiterpenoides que derivan de la ruta biosintética de los terpenoides (ácido mevalónico y DOXP/MEP) y en menor medida de los fenilpropanoides (Fig. 1.2) (Maffei, 2010), ésteres de bajo peso molecular y algunos poliacetilenos simples. En general son compuestos poco polares e hidrofóbicos de 10 carbonos (monoterpenos) o de 15 carbonos (sesquiterpenos) (Fig.1.3 B). Desempeñan un rol muy importante en la interacción de las plantas con el ambiente y le confieren el aroma típico a las especies aromáticas. El producto de la extracción de esta mezcla compleja de compuestos volátiles constituye el denominado aceite esencial de una planta. Actualmente existe un interés en nuevas fuentes de aceites esenciales ya que tienen diversas aplicaciones en la industria farmacéutica (obtención de principios activos), en la industria de la alimentación (aromatizantes) y en la industria cosmética (elaboración de perfumes y productos para la piel) (Bandoni, 2003; Luengo, 2004; Christaki *et al.*, 2012).

En concordancia con lo expresado previamente, se considera que las plantas medicinales y aromáticas presentan, entre otros, dos aspectos de relevancia: por un lado son muy importantes en el mantenimiento de la biodiversidad de los ambientes y también actúan como reguladoras de interacciones ecológicas; por otro lado son de interés particular para la humanidad, ya que históricamente han sido utilizadas como medicinas y en la elaboración de otros productos.

A lo largo de la historia, además del uso como medicinas, las plantas han sido utilizadas como alimentos. En particular las plantas aromáticas han sido cultivadas desde los inicios de la civilización con el fin de aportar aroma y sabor a las comidas (Li *et al.*, 2013). También fue muy importante su utilización al agregarlas como conservantes a los alimentos (Christaki *et al.*, 2012).

Hoy en día se utiliza el concepto de nutraceutico para designar a alimentos que además de un aporte nutricional brindan beneficios para la salud del ser humano, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades. Los nutraceuticos representan entonces, la integración de valor como alimento y medicamento para una sustancia (Kalra, 2003; Chauhan *et al.*, 2013). Existe amplio consenso sobre la necesidad de estudiar en mayor profundidad las propiedades nutraceuticas de plantas aromáticas y medicinales como la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos, especialmente para especies utilizadas popularmente y que aún no han

sido estudiadas científicamente (Briskin, 2000; Gurib-Fakim, 2006; Bernal *et al.*, 2011; Krisnah *et al.*, 2011; Gentile *et al.*, 2016).



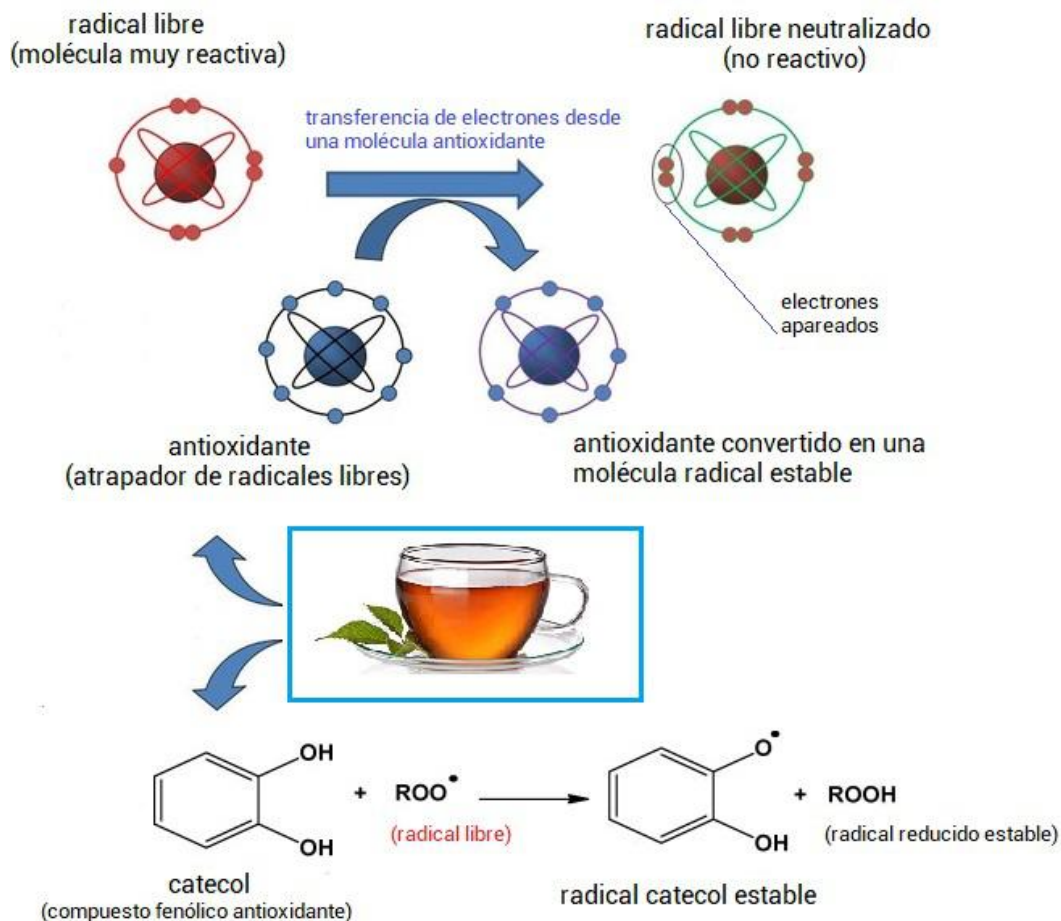
**Figura 1.3.** Ejemplo de algunas estructuras químicas de compuestos fenólicos (A) y volátiles (B) presentes en las plantas (Vermerris y Nicholson, 2006; Maffei, 2010).

Las nuevas fuentes naturales de antioxidantes pueden tener dos áreas principales de aplicación:

I) En salud, dado que están ampliamente demostrados los efectos benéficos de los antioxidantes para diversos grupos de patologías causadas o agravadas por estrés oxidativo, como por ejemplo las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatorias en general (Finkel y Holbrook, 2000; Piscochi y Pop, 2015);

II) En alimentos, ya que actualmente existe una búsqueda activa sobre compuestos y extractos naturales que permitan un uso alternativo a las versiones de antioxidantes sintéticos, utilizados actualmente como aditivos en alimentos y algunos señalados como potenciales carcinógenos (Khal y Kapus, 1993; Brewer, 2011; Movileanu *et al.*, 2013).

En la Figura 1.4 se esquematiza la reactividad química general de los antioxidantes.



**Figura 1.4.** Esquema general sobre las moléculas antioxidantes y la reducción de radicales libres. Los compuestos fenólicos dietarios, presentes en infusiones de plantas medicinales y aromáticas poseen actividad antioxidante ya que pueden reaccionar formando moléculas estables, en las que el electrón desapareado se estabiliza por resonancia dentro del anillo aromático.

Otro aspecto de interés de las plantas medicinales y aromáticas es el estudio de la actividad citotóxica de sus extractos (Rahman *et al.*, 2003) debido a dos razones principales:

I) Por las potenciales aplicaciones en salud, ya que un extracto que muestre efecto citotóxico antiproliferativo sobre células derivadas de cáncer puede resultar muy promisorio en cuanto a su potencial terapéutico (Lindholm *et al.*, 2002; Yañez, 2004; Lombardini *et al.*, 2017);

II) Para la estimación de la seguridad en la ingesta, ya que la ausencia de toxicidad general es una primera indicación de que una planta podría ser segura para el consumo humano (Hamidi *et al.*, 2014).

Las actividades biológicas observadas para un determinado extracto vegetal o fitocomplejo pueden atribuirse a una molécula en particular, que puede ser o no el compuesto mayoritario que ese extracto contenga (Bandoni *et al.*, 2009). El compuesto responsable de la bioactividad es conocido desde la visión farmacéutica clásica bajo el concepto de “principio activo”; este enfoque es muy útil si se busca aislar compuestos, estandarizar su calidad y elaborar medicamentos (Cordel, 2000; Calixto, 2005). Por otro lado, el efecto de un extracto se puede explicar por interacciones aditivas o sinérgicas entre sus componentes, lo que ha renovado el interés en estudiar los fitocomplejos desde una concepción integral que analice la actividad de la mezcla como un todo. Esta mirada adquiere relevancia desde las áreas de la nutrición y la nutraceutica,

campos en los que se utiliza directamente la mezcla en forma de suplementos dietarios o mediante el uso de infusiones herbales (Carmona y Pereira, 2013; Cordel, 2000). Desde este punto de vista también resulta importante identificar químicamente los compuestos presentes en un determinado extracto bioactivo.

Los desafíos de conservación de la biodiversidad que enfrenta el siglo XXI requieren de la caracterización de la biodiversidad florística de los distintos ecosistemas con un abordaje integral, donde se analice la planta en su ambiente, sus propiedades y usos potenciales, a la vez que se desarrollen estrategias de conservación (Gurib-Fakim, 2006; Sen y Samanta, 2015). Actualmente algunas plantas nativas se aprovechan comercialmente de forma extractiva deteriorando los ecosistemas naturales y destruyendo las poblaciones naturales (van Andel *et al.*, 2015); se trata de una problemática con alcance global y presente en la Patagonia (JNPAM, 2016), la cual debe contemplarse al momento de difundir los estudios químicos y biológicos de la flora y sus múltiples aplicaciones, teniendo en consideración posibles estrategias de conservación (Sen y Samanta 2015). Enmarcados en estas estrategias adquieren relevancia el desarrollo y promoción de cultivos, para el caso de plantas nativas que han demostrado alguna utilidad novedosa. En el caso de especies difíciles de cultivar se podría optar por estrategias de propagación vegetativa. Por otro lado, en el caso de los estudios sobre plantas medicinales y aromáticas, deberían tenerse en cuenta las directrices de la Organización Mundial de la Salud sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales (OMS, 2003).

Se estima que existen al menos 250.000 especies de plantas superiores en el planeta Tierra, de las cuales sólo un 6% han sido estudiadas en cuanto a actividades biológicas y solo un 15% han sido caracterizadas químicamente (Gurib-Fakim, 2006). En el caso de la biodiversidad florística nativa de Argentina, de acuerdo con Barboza *et al.* (2009), se estima que aproximadamente el 50% no ha sido estudiada en relación a sus propiedades químicas y actividad biológica, y esta situación no ha cambiado significativamente al momento de realizar este trabajo. Nuestro país alberga unas 9.000 especies vegetales, de las cuales más de 1500 son nativas. Estas especies nativas se encuentran en regiones de características ecológicas únicas y de gran interés florístico, como por ejemplo el bosque subtropical lluvioso de Misiones, los bosques secos de la región chaqueña o las formaciones vegetales andino patagónicas (Alonso y Desmaschelier, 2015; Zuloaga, 2013). Los ambientes de la Patagonia en particular son diversos en cuanto a relieve, clima y paisaje; dicha riqueza geográfica y ambiental da lugar a la presencia de un gran número de especies vegetales nativas y endémicas, muchas de las cuales aún no han sido estudiadas.

Tal como documentan numerosos trabajos etnobotánicos desarrollados en el sur del país, la presencia de especies medicinales y aromáticas es muy notoria y relevante en los ecosistemas patagónicos (Gratti 1998; González y Molares, 2003; Molares y Ladio, 2009; Retta *et al.*, 2017).

Gratti (1998) describe que en la región patagónica están presentes el 65% de las familias florísticas de Argentina y el 40% del total de géneros. El número registrado de especies para esta región es de 1358, solo un 13 % son exóticas, lo que pone de manifiesto la importancia de la flora nativa de esta región, que incluye plantas endémicas y géneros monotípicos. Muchas especies de

esta región presentan usos etnobotánicos medicinales y alimenticios atribuidos a los pueblos originarios de esta región como tehuelches, araucanos y mapuches.

[Molares y Ladio \(2009\)](#) recopilaron la flora medicinal utilizada por el pueblo Mapuche y su importancia en la región patagónica. Relevaron el uso de 505 especies de las cuales el 60 % son nativas. El uso principal registrado fue para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, seguido del uso para tratar dolor e inflamación como así también para tratar afecciones dermatológicas. En el caso de comunidades del noroeste de la provincia del Chubut, se relevó el uso de más 50 plantas con fines medicinales ([González y Molares, 2003](#)), concluyendo que principalmente se utilizan para afecciones del aparato digestivo, además de para afecciones de la piel y el sistema nervioso.

De forma similar a como ocurrió históricamente en otros lugares del mundo, en la Patagonia la principal forma tradicional de consumo de las plantas medicinales es como un extracto acuoso caliente denominado infusión. Este dato de la realidad indica que el estudio detallado de las propiedades y los potenciales uso de las plantas medicinales y aromáticas de la Patagonia debería investigarse prioritariamente a partir de las infusiones obtenidas de ellas.

## 1.2. OBJETIVOS GENERALES

Investigar las propiedades antioxidantes de plantas medicinales y aromáticas nativas seleccionadas del noroeste de la Patagonia Argentina, poniendo énfasis en el análisis de las infusiones y los compuestos fenólicos en ellas presentes.

Determinar componentes volátiles en las especies aromáticas.

Analizar la actividad citotóxica y potencial actividad anticancerígena de las especies en estudio.

## 1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Abordar el estudio de las siguientes especies:

*Adesmia boronioides* Hook. f. (Fabaceae), *Apium australe* Thouars (Apiaceae), *Artemisia magellanica* Sch. Bip. (Asteraceae), *Buddleja globosa* Hope (Buddlejaceae), *Drimys andina* (Reiche) R. Rodr. & Quezada (Asteraceae), *Dysphania multifida* L. (Chenopodiaceae), *Glycyrrhiza astragalina* Gillies ex Hook. & Arn. (Fabaceae), *Grindelia chilensis* (Cornel.) Cabrera (Asteraceae), *Madia sativa* Molina (Asteraceae) y *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae).

b) Estudiar características químicas generales de las infusiones: actividad antioxidante, contenido de fenoles, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos totales.

c) Determinar la identidad química de los principales compuestos fenólicos presentes en las infusiones.

d) Determinar la identidad química de los compuestos volátiles mayoritarios presentes en los aceites esenciales de las especies aromáticas.

e) Analizar la presencia de otros metabolitos secundarios potencialmente bioactivos: lactonas sesquiterpénicas, diterpenos y cumarinas.

f) Estudiar la toxicidad general y la actividad citotóxica de las infusiones de las especies seleccionadas mediante bioensayos secuenciales y complementarios: modelo de *Artemia salina*, test de *Allium cepa* y citotoxicidad sobre células derivadas de cáncer de colon T-84, HT-29 y Caco-2.

## **CAPÍTULO 2.**

### **ESPECIES AROMÁTICAS y MEDICINALES ESTUDIADAS**

En este Capítulo se desarrolla el objetivo específico (a). Se recopilan los antecedentes de las especies estudiadas, se hace referencia a la toma de muestras de poblaciones naturales, la herborización y la preparación de extractos para los ensayos fitoquímicos y biológicos (que son luego presentados en los Capítulos 4 y 5 respectivamente).

Los nombres botánicos se presentan en base a The Plant List (2018), Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur (2018), y bibliografía adicional. Las ilustraciones botánicas presentadas a lo largo de la tesis fueron concebidas exclusivamente para este trabajo por la ilustradora Baradit Valeska (2018).

Los criterios generales para elegir las especies estudiadas fueron: 1- que la especie sea aromática y nativa (tanto endémica como cosmopolita), 2- que no existan reportes de estudios químicos y/o biológicos al momento de iniciar este trabajo, o que estos sean muy limitados, 3- que presenten algún uso popular como especie medicinal (principalmente infusión) o comestible.

A continuación se presentan las características y antecedentes de las especies estudiadas, lo que se resume al final de esta sección en la Tabla 2.1.

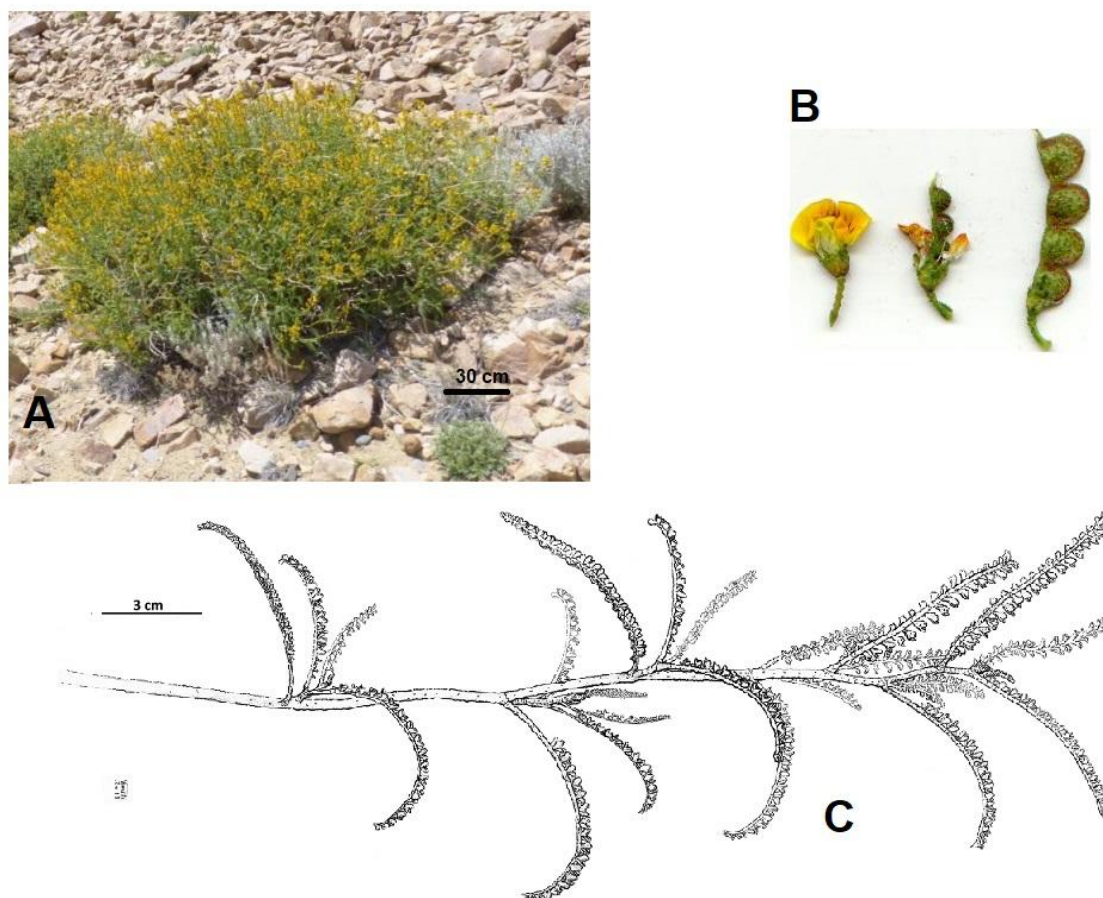
## 2.1. ANTECEDENTES DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

### 2.1.1. *Adesmia boronioides* Hook. f.

El género *Adesmia* posee alrededor de 240 especies y tiene distribución estrictamente sudamericana (Urribari, 2007; The Plant List, 2018). *Adesmia boronioides* es una especie nativa, endémica de los ambientes de ecotono de la cordillera patagónica, se encuentra distribuida entre los 0 y 2200 m s.n.m. en ambientes de cordillera y estepa de Chile-Argentina, en Argentina se encuentra desde el sur de la provincia de Mendoza hasta Tierra del Fuego (González *et al.*, 2018). Es un arbusto mediano cuya altura varía entre 0,4 y 2 m, la planta es muy ramificada, con ramas glandulosas, olorosas, muy resinosas y pegajosas al tacto (Fig. 2.2). Su aroma es típico y llamativo, siendo la única especie del género *Adesmia* considerada glanduloso-resinosa (González *et al.*, 2018).

El nombre popular más conocido para esta planta es “paramela”, también se utilizan los nombres “pega pega”, “té silvestre”, “té pampa”, “yagneu” y “lonkotrevo” (González, 2002; Molares y Ladio, 2012). Es aromática y medicinal. *Adesmia boronioides* posee numerosos usos medicinales en diversos ámbitos rurales y urbanos (González y Molares, 2004; Ladio y Molares, 2014). Se la consume principalmente como una bebida caliente denominada infusión. La infusión de sus hojas y tallos posee uso medicinal como digestiva, diaforética y antiemética. También se menciona su uso para aliviar síntomas respiratorios como resfríos, asma y bronquitis. La propiedad para aliviar dolores también es informada frecuentemente para preparados caseros en forma de cremas y ungentos elaborados con la incorporación de extractos de esta planta (golpes, torceduras, dolores articulares y musculares, calambres y reumas). Otros usos para sus extractos acuosos incluyen acción revitalizadora del cabello, vigorizante y afrodisíaca (González *et al.*,

2018). Puede observarse que la mayoría de sus usos medicinales más conocidos pueden relacionarse con el alivio de condiciones inflamatorias.



**Figura 2.1.** *Adesmia boronioides*, aspecto general de la planta (A), fotografía de flor y fruto (B) (González, 2002) e ilustración botánica de un tallo y hojas (C).

Al momento de iniciar este trabajo de tesis los estudios fitoquímicos y biológicos sobre *A. boronioides* era escasos (Barboza et al., 2009). Los antecedentes fitoquímicos existentes se relacionan principalmente con la caracterización del aceite esencial, el cual presenta un perfil olfativo poco común y muy interesante, con un aroma dulce maderoso y especiado, de una gran tenacidad y fijación (González, 2002). En González et al. (2002), se reportó la presencia de esqueletos terpénicos que no habían sido observados previamente en ninguna otra especie vegetal; al compuesto mayoritario se le asignó el nombre de Esquelenona como homenaje a uno de los lugares donde crece espontáneamente la especie. La configuración absoluta fue reasignada por el trabajo de Cerda-García-Rojas et al. (2015). Recientemente, luego de haberse iniciado este trabajo de tesis, Muñoz y Delporte (2015) reportaron un nuevo compuesto flavonoide no conocido hasta el momento para esta especie creciendo en Talca (Chile), el compuesto es un oligósido (triósido) de camferol, es decir un esqueleto del flavonoide camferol con tres azúcares. El mismo se ha denominado camferol 3-O- $\beta$ -D-[galactopiranosil(1-2)ramnósido]-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido.

En cuanto a la bioactividad, los datos existentes se basan en el estudio de los aceites esenciales, los cuales demostraron actividad antimicrobiana, antifúngica y tripanomicida (Gonzalez *et al.*, 2018). La actividad antiinflamatoria de interés fue reportada por González *et al.* (2003), utilizando un modelo de leucocitos peritoneales de rata. La irritabilidad dérmica fue estudiada sobre piel de conejo albino, los resultados mostraron la inocuidad del aceite esencial bajo las condiciones del ensayo, sugiriendo su utilización segura para fines cosméticos (González *et al.*, 2002).

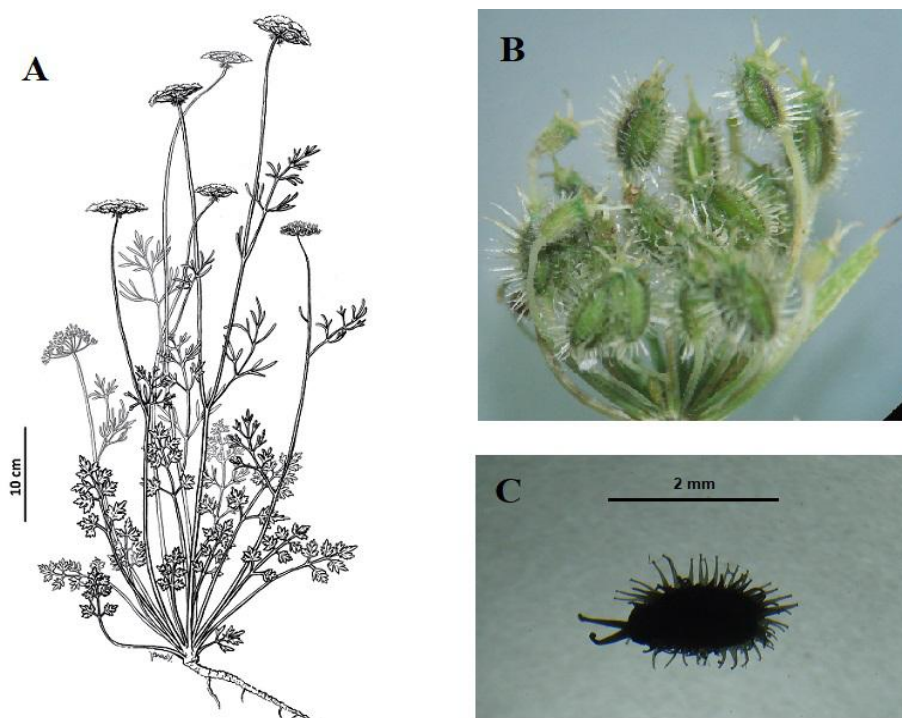
Respecto de su conservación, *A. boronioides* se indica como especie vulnerable en Chile, y en Argentina se encuentra protegida en todos los Parques Nacionales del sur (Gonzalez *et al.*, 2018). Las poblaciones silvestres de esta planta se encuentran particularmente impactadas las provincias de Chubut y Santa Cruz debido a la explotación comercial que realizan empresas privadas. Tal como se concluyó en el debate de cierre de V Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales y las I Jornadas Nacionales de Plantas Medicinales Nativas (JNPAM, 2016) esto constituye una problemática regional de gravedad que debe atenderse sin demoras. Actualmente se está avanzando en el desarrollo de cultivos experimentales de esta especie en la sede del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de San Carlos de Bariloche, Río Negro (Gonzalez *et al.*, 2018).

*Adesmia boronioides* es una planta nativa, aromática, endémica de los ecosistemas patagónicos, que posee amplios usos medicinales y es consumida en forma de infusión. Los antecedentes sobre su fitoquímica y actividad biológica son escasos. Por las razones mencionadas se la seleccionó para ser estudiada en este trabajo.

### 2.1.2. *Apium australe* Thouars

El género *Apium* posee 20 especies, distribuidas en Europa, Sudamérica y Oceanía (Short, 1979; The Plant List, 2018). *Apium australe* se distribuye en Argentina en ambientes húmedos desde la provincia de Neuquén hasta la provincia de Tierra del Fuego, es más frecuente encontrarla entre los 0 y 200 m s.n.m. (Correa y Costaguta, 1999). Su presencia también es reportada en Nueva Zelanda y las Islas Malvinas (Upson *et al.*, 2016). Es una hierba de 50 a 100 cm de altura, de hojas basales multivididas. Sus tallos presentan en general pocas hojas que son más pequeñas que las basales. Sus flores son blancas, dispuestas en umbelas terminales y axiales. Sus frutos pequeños, de unos 2 mm de diámetro, poseen un carpóforo bífido que constituye un carácter específico (Fig. 2.3) (Correa y Costaguta, 1999).

Esta planta de la familia Apiaceae es conocida comúnmente como “Apio silvestre”. Posee varios sinónimos botánicos: *A. prostratum*, *A. antarcticum*, *A. chilense*, *A. flexuosum*, *A. goughense* y *A. maclovianum*. Es aromática y comestible.



**Figura 2.2.** *Apium australe*, ilustración botánica de la planta completa (A), fotografía a 40 X de frutos (B) y detalle del carpóforo bífido del fruto (C).

Su utilización principal es como comestible. Con sus hojas se preparan ensaladas que poseen notorio valor nutricional debido al contenido de vitamina C (8 mg/100 gramos de vegetal fresco) (Rapoport *et al.*, 2005). Además se utiliza como medicinal, reportándose la ingesta de la infusión para aliviar resfríos (Rapoport *et al.*, 2005), lo cual es consistente con la utilización como agente antiescorbuto que realizara la tripulación del capitán Cook durante las exploraciones por Tierra del Fuego (Kodicek y Young, 1969). Debido a su uso medicinal y comestible puede considerarse una planta con propiedades nutraceuticas.

La fitoquímica de *A. australe* se encuentra escasamente estudiada. [Schemeda et al. \(1999\)](#) reportó muy baja actividad antioxidante por el método de la xantino oxidasa y por el método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para extractos metanólicos de las hojas. De forma similar a otros *Apium* spp. presenta carácter aromático ([Saleh et al., 1985](#)), pero hasta la fecha sus aceites esenciales no han sido analizados.

La única actividad biológica estudiada *in vitro* para esta planta fue reportada por [Schemeda et al. \(1992\)](#), quien reportó moderada actividad inhibitoria de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Por otro lado, en un estudio de interés agroecológico, se ha informado que la especie *A. australe* dio resultados prometedores al ser utilizada para obtener híbridos de cruzamiento con *A. graveolens* (especie hortícola de importancia económica) resistentes a los ataques de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *Apii* y *Septoria apiicola* Speg. ([Ochoa et al., 1989](#); [Yao et al., 2018](#)).

En cuanto a su conservación se ha informado baja vulnerabilidad en las poblaciones presentes en Islas Malvinas ([Upson et al., 2016](#)), podría en un principio esperarse una condición similar para *A. australe* en los ambientes húmedos de Patagonia, aunque no se han encontrado estudios al respecto.

*Apium australe* es una planta nativa, aromática, endémica de los ecosistemas patagónicos, que se utiliza como planta comestible y además posee uso medicinal en forma de infusión. Los antecedentes sobre su fitoquímica y actividad biológica son muy escasos. Por las razones mencionadas se la eligió para ser estudiada en este trabajo.

### 2.1.3. *Artemisia magellanica* Sch. Bip.

El género *Artemisia* posee unas 500 especies distribuidas en las regiones templadas de todo el mundo ([Pandey y Singh, 2017](#); [Koul et al., 2018](#)). El género *Artemisia* ha sido extensamente reportado como fuente de drogas vegetales de interés, un ejemplo muy conocido es el descubrimiento y aislamiento de la artemisina, una droga muy efectiva contra la malaria ([Bora y Sharma, 2011](#)). *Artemisia magellanica* es una especie nativa endémica de la Patagonia, con distribución desde la provincia de Mendoza hasta tierra del Fuego. Es una hierba perenne de 10 a 60 cm de alto con una raíz principal vigorosa. Sus tallos están ramificados desde abajo, erectos-ascendentes, con flores dimorfas ([Zuloaga et al., 2014](#)). En la Figura 2.3 se muestra una fotografía obtenida de esta planta.

En la región patagónica es popularmente conocida como “ajenjo nativo”. Es aromática y no presenta usos etnobotánicos reportados.

Hasta el momento no ha sido objeto de estudios fitoquímicos ni de actividad biológica.

El único análisis de esta planta fue realizado por [Pellicer et al. \(2010\)](#) con un enfoque filogenético, a través de estudios moleculares de secuenciación del ADN encontraron que *A. magellanica* muestreada en el noroeste de Chubut está estrechamente emparentada con *A. biennis* (nativa de América del Norte).

Si bien no existen reportes sobre su estado de conservación, puede mencionarse que es una especie poco abundante, con distribución limitada a los márgenes de arroyos de estepa y que los individuos crecen alejados uno de otros. Dichas características harían que esta especie sea vulnerable ante un hipotético caso de recolección extractiva.

*Artemisia magellanica* es una especie patagónica perteneciente a un género sumamente bioactivo, además no cuenta con antecedentes de análisis químicos ni de actividad biológica; por estas razones se la incluye en este trabajo, considerando que tiene gran potencial para brindar resultados novedosos e interesantes.

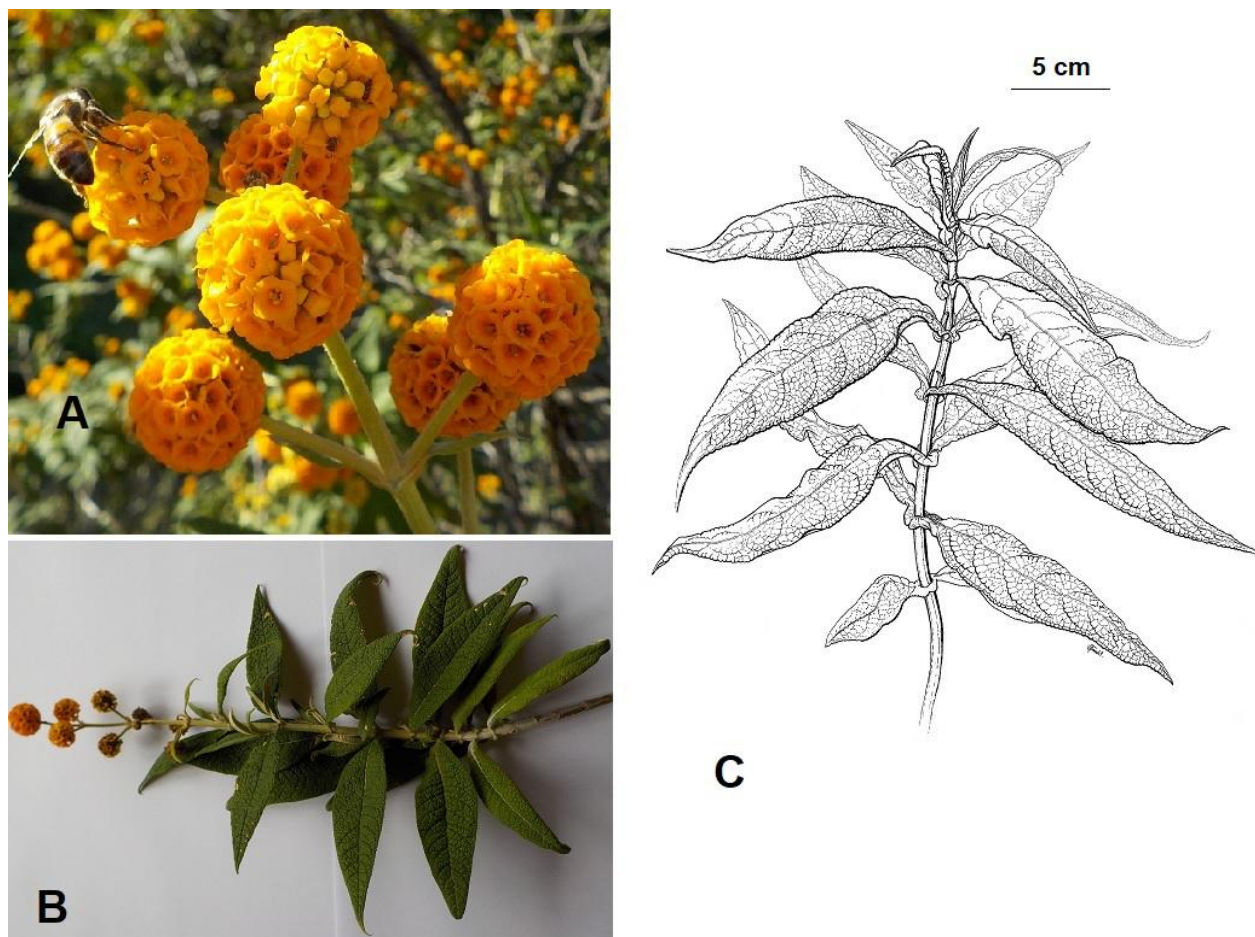


**Figura 2.3.** Fotografía de *A. magellanica*, se aprecia el arquetipo característico de esta especie, se observan los tallos ramificados y sus numerosas flores, aún cerradas.

#### 2.1.4. *Buddleja globosa* Hope

El género *Buddleja* se compone de alrededor de 100 especies, y presenta su principal distribución en zonas cálidas de todo el mundo (Houghton *et al.*, 2003; The Plant List, 2018). *Buddleja globosa* presenta una distribución restringida a los valles de los bosque andino patagónicos y a la región de ecotono (transición entre los ecosistemas de bosque y estepa patagónica). Se considera endémica del sur de Chile y Argentina; en Argentina vive en la zona

húmeda cordillerana desde Neuquén hasta Chubut (Correa y Costaguta, 1999). Es un arbusto que puede alcanzar hasta 5 metros de altura, es una especie funcionalmente dioica. Sus hojas son ovadas u ovado-lanceoladas, agudas, crenadas, discoloras, con cara adaxial oscura, glabra o con escasa pubescencia sobre los nervios, la abaxial con denso lomento castaño y nervadura prominente. Las flores forman glomérulos globosos de 12 a 20 mm de diámetro, agrupados enseudorracimos foliosos (Fig. 2.5-A). Las semillas miden entre 0,5 y 1 mm, y son aproximadamente isodiamétricas, prismáticas y reticuladas (Correa y Costaguta, 1999).



**Figura 2.4.** *B. globosa*. Fotografía en detalle de las flores (A), fotografía de las hojas del tallo y flores (B) e ilustración botánica de la región apical de un tallo (C).

El principal nombre popular utilizado en Argentina es “pañil”, otro nombre común más utilizado en Chile es “matico”. Se la consiera una especie aromática, con sus flores se preparan bebidas frías lo que constituye un uso comestible, aunque el principal uso reportado para esta planta es medicinal (Alonso, 2004). La infusión de las partes aéreas es muy consumida con fines medicinales por comunidades rurales y también en las ciudades. A los extractos acuosos se le atribuyen numerosas propiedades, siendo las principales como cicatrizante de epitelios, tanto externos como internos (Houghton P, 2003), además de usos digestivos y para tratar desequilibrios del sistema hepático. Según la revisión de Alonso y Desmachelier (2015), la infusión de esta planta es bien tolerada por humanos, y señalan además su utilización por vía externa en el lavado de heridas, úlceras, acné, sarna y sífilis.

Los principales estudios fitoquímicos han sido realizados para poblaciones de Chile. Entre sus características fitoquímicas de interés se ha reportado la presencia de terpenos (sesquiterpenos, triterpenos) en la corteza del tallo y en las raíces (Houghton P, 2003; Bustamante *et al.*, 2015). Los compuestos fenólicos son abundantes en las hojas de esta planta, 9.7-13.9% en extractos metanólicos (Fischer *et al.*, 2011). Los compuestos principales reportados en extractos acuosos y orgánicos polares (etanólicos y metanólicos) son verbascósido y los flavonoides luteolina-7-O-glucósido, apigenina-7-O-glucósido y quercetina. Estos compuestos se encuentran en mayor concentración en la planta durante la primavera (Backhouse *et al.*, 2008a).

Varios estudios sobre la bioactividad de esta planta han sido desarrollados, principalmente enfocados en evaluar su actividad antiinflamatoria, cicatrizante y analgésica, en concordancia con sus principales usos populares. La actividad antiinflamatoria fue reportada en diversos estudios *in vitro* e *in vivo* (Backhouse *et al.*, 2008b). La actividad cicatrizante se atribuye principalmente a la actividad multinivel ejercida por sus componentes de forma combinada durante todo el proceso de curación de una herida (Bustamante *et al.*, 2015); en dicho proceso es muy importante el aumento en la proliferación de fibroblastos ejercidas por los compuestos fenólicos. La actividad analgésica ha sido también estudiada *in vivo*, se ha reportado un efecto analgésico dosis dependiente para el extracto etanólico de sus partes aéreas. Además en el caso del compuesto verbascósido se le atribuye una actividad similar o mayor que al ibuprofeno (Backhouse *et al.*, 2008a). Por otro lado, las hojas de *B. globosa* también han mostrado actividad nematocida, Bhom (2009) han reportado dicha actividad utilizando directamente las hojas de esta planta en sustratos de cultivos hortícolas, indicando su novedoso potencial uso agroecológico.

El Ministerio de Salud de Chile la ha catalogado como Planta medicinal o medicamento herbario tradicional libre de toxicidad para el ser humano. Actualmente se encuentra en desarrollo el primer estudio clínico con preparados de esta planta, orientado a estudiar la eficacia como cicatrizante de heridas y antiúlceras (Bustamante *et al.*, 2015).

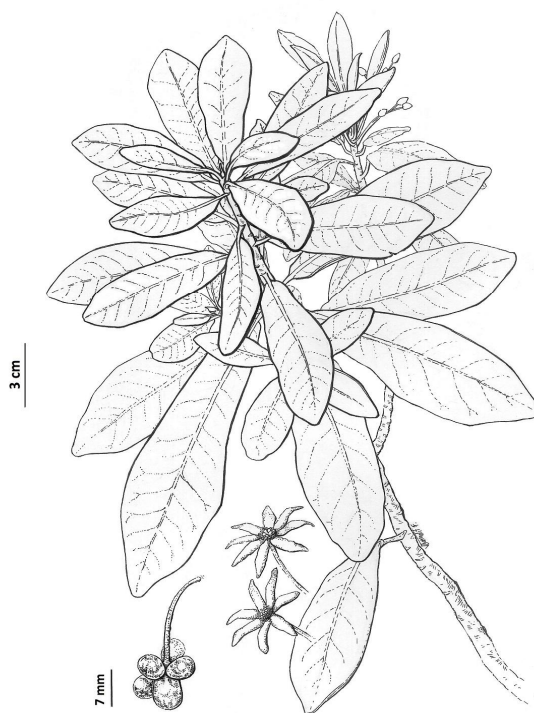
En cuanto a su consevación no hay datos específicos sobre *B. globosa*, aunque cabe mencionar que debido al aprovechamiento que se hace de esta planta, principalmente en Chile, el cultivo está en una etapa incipiente (Vogel *et al.*, 2011). Aún continúa siendo recolectado en áreas silvestres, por ello Wickens (2013) ha propuesto protocolos de aprovechamiento sustentable a partir de las poblaciones naturales.

*Buddleja globosa* es una planta sumamente interesante, como lo indican los reportes acerca de sus usos medicinales y los estudios de bioactividad, sus partes aéreas son fuente de extractos y compuestos muy bioactivos. Aun así, se encuentra escasamente estudiada para las poblaciones de Patagonia Argentina. Por estas razones se la ha seleccionado para incluirla en el abordaje de este trabajo.

### 2.1.5. *Drimys andina* (Reiche) R. Rodr. & Quezada

El género *Drimys* cuenta con 12 especies aceptadas, distribuidas en centro y sudamérica (Ruiz *et al.*, 2008; The Plant List, 2018). *Drimys andina* adquiere el status de especie en el año 1991, hasta ese momento se la consideraba conespecífica de *D. winteri*. Las diferencias entre ambas especies (y con otras especies relacionadas del género *Drimys*) se confirmaron con posteriores análisis moleculares de secuenciación del ADN, se propone que *D. andina* tuvo su divergencia en el cuaternario (Jara-Arancio *et al.*, 2012). Actualmente es considerada especie nativa endémica del sur de Chile y sudoeste de la Argentina. Se distribuye en Chile desde la Región de la Araucanía por el norte hasta la Región de Magallanes y la Antártida, en la Argentina se encuentra asociada exclusivamente a los bosques de lenga (*Nothofagus pumilio*) de las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut (Correa y Costaguta, 1999). Se trata de una planta arbustiva de alrededor de un metro de altura, de hoja perene, posee hojas esparcidas suavemente en el ápice de las ramas, lanceoladas a elípticas, de margen plano. Las flores son solitarias, pedunculadas. Los frutos son bayas negras-violáceas de 1 cm de diámetro (Figura 2.6).

Su nombre común es “canelo enano”, en referencia a su escasa altura en comparación con el “canelo” (*D. winteri*). *Drimys andina* es aromática, y sus frutos son comestibles. No reporta usos medicinales, pero si los tiene la especie cercana *D. winteri*, la infusión de su corteza es utilizada como agente antigripal, además los mapuches la utilizan contra el kuref aire (parálisis facial), como antiinflamatorio, en metrorragias y hemorragias posparto (Alonso y Desmachelier, 2015).



**Figura 2.5.** *D. andina*, ilustración botánica de región apical de un tallo, flores y fruto.

Un trabajo fitoquímico preliminar ha reportado la presencia de dos sesquiterpenos muy bioactivos en la corteza de *Drymis* spp. denominados poligodial y drimendiol, el primero posee interesantes actividades antialérgicas y antiinflamatorias (Da Cunha *et al.*, 2001). El principal trabajo fitoquímico desarrollado en detalle para *D. andina* fue realizado por Muñoz-Concha (2004), en el cual se reportó un rendimiento de aceite esencial de 0,6 ml/100 gramos de material vegetal seco para las partes aéreas de la planta (similar a *D. winteri*), un contenido de terpenos del 7% y contenido de flavonoides de 2,2 %. Respecto a los compuestos fenólicos del tipo flavonoide, Ruiz *et al.* (2002) propone la identificación tentativa para *D. andina* de apigenina, flavona-3-O-glucósido, taxifolina y dihidroflavonol. Estos compuestos no están presentes en *D. winteri* ni *D. confertifolia*, por lo que Ruiz *et al.* (2002) propuso que las distintas especies de este género producen un patrón diferencial de flavonoides. Cabe mencionar que la taxifolina es una molécula con actividad anticancerígena, que ha sido ensayada con resultados positivos en un modelo de ratón de cáncer de piel (Oi *et al.*, 2012), además de reportar numerosos efectos quimopreventivos del cáncer en modelos celulares.

En cuanto a su conservación no existen datos. Se han realizado intentos de reproducción en vivero, los cuales hasta el momento no han dado resultados positivos en la región patagónica (Sanchez, 2018). En el futuro podría ser interesante investigar otras técnicas de reproducción, como micropropagación.

Esta planta muy aromática, endémica y tiene algunos antecedentes en cuanto a presencia de flavonoides, razones por las que se la seleccionó para este trabajo.

#### 2.1.6. *Dysphania multifida* L.

El género *Dysphania* contiene actualmente 37 especies con distribución cosmopolita en regiones tropicales, subtropicales y templadas. *Dysphania multifida* tiene amplia distribución en Sudamérica y en los ecosistemas patagónicos. Es una hierba anual rastrera, aromática, fácil de encontrar en ambientes modificados. Posee hojas ascendentes, atenuadas en pecíolo corto, oblongo-lanceoladas, más o menos agudas, irregularmente sinuoso-dentadas o casi enteras, delgadas, glabras, de color verde muy intenso (Figura 2.7). Las flores se encuentran aglomeradas, pequeñas, de 1 mm de diámetro o un poco mayor, reunidas en racimos foliosos, espiciformes, glabros. El fruto es ovoideo, de menos de 1 mm, comprimido, perfectamente envuelto por el cáliz; la semilla es lisa, de color negro brillante, lustrosa y lenticular (Correa y Costaguta, 1999).

El nombre común más frecuentemente utilizado es “paico” y *Chenopodium multifidum* es el principal sinónimo botánico. Es muy aromática, comestible debido a su uso como condimentaria, y medicinal. Las partes aéreas secas y molidas se utilizan para condimentar platos y para darle sabor a la yerba mate; las infusiones y decocciones de sus partes aéreas tienen uso como antiinflamatorias, digestivas, carminativas y antiparasitarias (Carballo *et al.*, 2005; Golenowski *et al.*, 2006).



**Figura 2.6.** *D. multifida*, fotografía de la estructura rastrera de la planta (A) e ilustración botánica de un tallo apical en prefloración (B).

A pesar de ser una planta muy utilizada en la medicina popular, los estudios fitoquímicos son relativamente escasos. De forma similar a otras especies del género, posee aceites esenciales y el compuesto mayoritario determinado en poblaciones del noroeste del Chubut fue el ascaridol (49-61%) (García *et al.*, 1997; Gonzalez *et al.*, 2009).

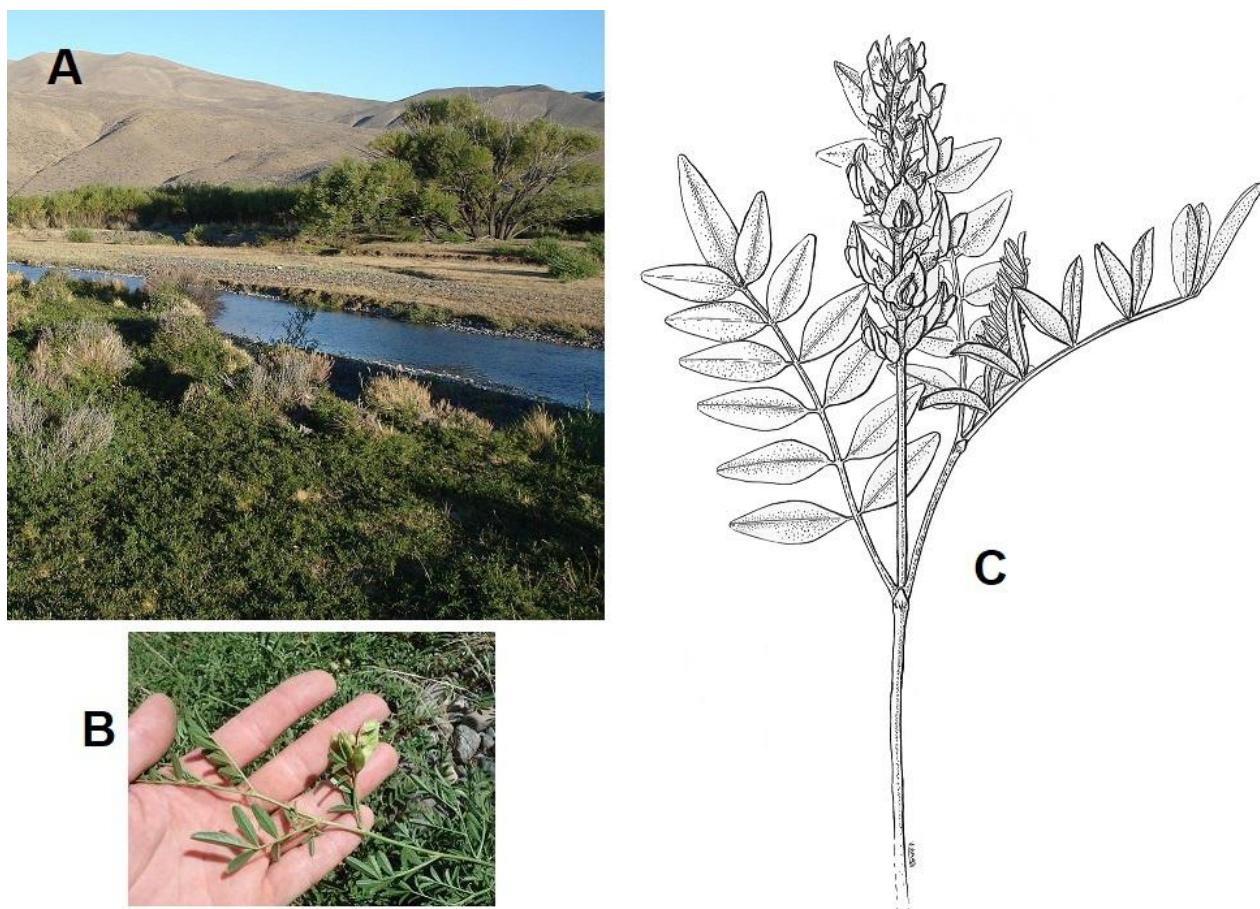
Los estudios de bioactividad también son escasos, aunque hay algunos antecedentes desarrollados en Argentina en relación a la toxicidad, aspecto que ha sido un tema controversial en los últimos años en parte de la comunidad médica y académica (Gonzalez *et al.*, 2009). Los trabajos de Gadano *et al.* (2000, 2002, 2006) analizaron la genotoxicidad de infusiones y deccociones de paico con un ensayo de cultivo de linfocitos *in vitro*. Detectaron efectos genotóxicos producidos en mayor medida por la deccoción que por la infusión, y los atribuyeron a posibles productos de oxidación del ascaridol, que serían solubles en agua. Posteriormente Gadano *et al.* (2007) confirmaron los efectos presentados en sus trabajos anteriores para 13 poblaciones de paico procedentes de distintos puntos de Argentina. Por otro lado, Carballo *et al.* (2005) reportaron daño al ADN *in vitro* con el ensayo del cometa (electroforésis en gel con una sola célula) para deccociones e infusiones de las partes aéreas del paico.

En cuanto a su conservación no se encuentra amenazada.

Debido a sus medicinales y alimenticios, escasez de estudios e interés en aumentar el conocimiento sobre su toxicidad (reportada hasta el momento con modelos puntuales) se incluyó al paico en esta tesis.

### 2.1.7. *Glycyrrhiza astragalina* Gillies ex Hook. & Arn.

El género *Glycyrrhiza* cuenta con 30 especies y pertenece a la familia Fabaceae, se considera de distribución subcosmopolita con presencia en Asia, Australia, Europa y América (Hoseinzadeh y Nasiri-Asl, 2015; The Plant List, 2018). *Glycyrrhiza glabra*, conocida como regaliz, tiene distribución mediterránea y es la especie más conocida de este género. También es importante *Glycyrrhiza uralensis*, que se utiliza en la medicina tradicional china (Hoseinzadeh y Nasiri-Asl, 2015). *Glycyrrhiza astragalina* posee distribución sudamericana, siendo frecuente en suelos húmedos del centro-sur de Argentina (Correa y Costaguta, 1999), en Patagonia es común encontrarla en los bordes de arroyos, ríos y mallines. Se trata de una hierba rastrera que puede cubrir amplias zonas de terreno, los tallos son color verde a castaño-rojizo, pueden llegar a medir 50 cm y poseen zarcillos. Las hojas son alternas con 3 a 7 pares de folíolos opuestos (Figura 2.8). Las flores miden de 7 a 8 mm, son azules o violáceas, brevemente pediceladas. Las semillas miden entre 4-5 mm x 2,5-3,5 mm (Correa y Costaguta, 1999). Esta planta se comporta como maleza en zonas productivas de regadío (alfalfares) y también puede comportarse como maleza en zonas arenosas (Atlas de malezas del INTA, 2018).



**Figura 2.7.** *G. astragalina*. Fotografía de una población a orillas de un río de estepa (A), en la parte inferior se observa una población de esta especie. Fotografía en detalle de hojas y frutos (B) e ilustración botánica de tallo hojas y flores (C).

Los nombre comunes para esta planta son “orozú”, “orozuz”, “orozus silvestre”, “regaliz silvestre”, “porotillo” ([Atlas de malezas del INTA; 2018](#)). Esta planta es aromática y medicinal. El uso medicinal reportado en comunidades del noroeste de Chubut, es para casos de resfríos y bronquitis para lo cual se mastica la raíz ([Gonzalez y Molares, 2004](#)).

Esta especie prácticamente no cuenta con antecedentes fitoquímicos ni caracterización de actividad biológica, aspectos que han sido estudiados en otras especies del género *Glycyrrhiza*. Los principales grupos de metabolitos encontrados en este género son: saponinas, flavonoides, isoflavonas, cumarinas y estilbenoides. Además resulta notoria la presencia del ácido glycyrrhético ([Hosseinzadeh y Nassiri, 2015](#)).

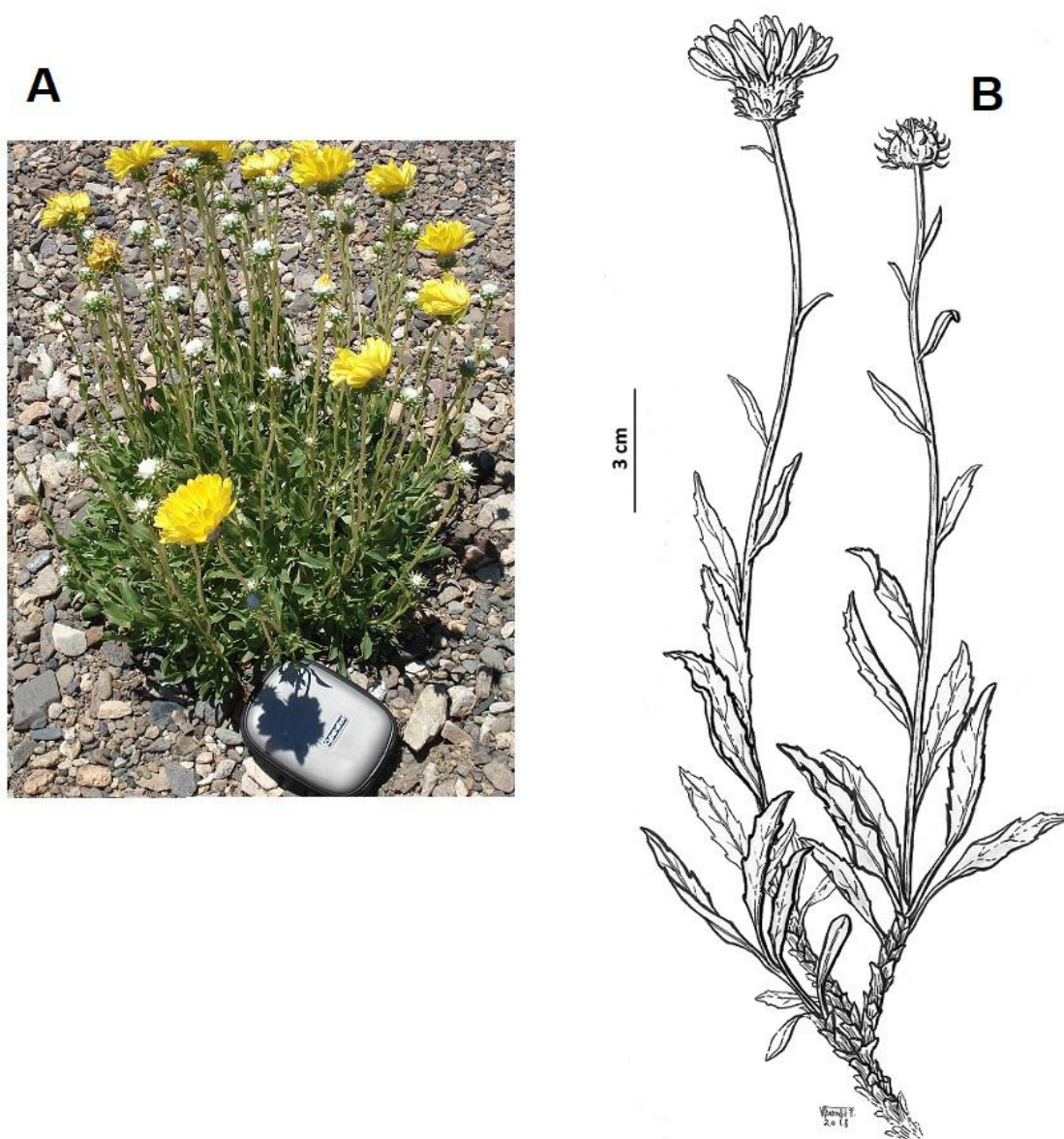
Actividades biológicas de interés han sido atribuidas a otras especies del género, entre las cuales figuran: actividad antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral y hepatoprotectora ([Kaur et al., 2013; Hosseinzadeh y Nassiri, 2015](#)). Un reporte puntual la nombra como tóxica ([Atlas de malezas del INTA, 2018](#)), aunque es un registro muy particular no sustentado en otros datos bibliográficos.

En cuanto a su conservación no hay registros específicos, pero dado su hábito de rastrera gracias al cual ocupa fácilmente extensas áreas de terreno, y a su característica de maleza se podría considerar una especie no amenazada.

*Glycyrrhiza astragalina* es aromática y abundante en la región patagónica, posee usos medicinales puntuales y pertenece a un género sumamente bioactivo, sin embargo no cuenta con estudios fitoquímicos ni biológicos. Debido a estas características se la ha seleccionado para este trabajo.

### 2.1.8. *Grindelia chilensis* (Cornel.) Cabrera

El género *Grindelia*, consiste en unas 70 especies de distribución americana, se caracteriza por la abundante producción de exudados resinosos que cubren la superficie de las hojas, tallos y capítulos florales ([Mesurado et al., 2017](#)). *Grindelia chilensis* se encuentra muy presente en la región patagónica, con distribución entre la provincia de Mendoza y el norte de la provincia de Santa Cruz. Habita en cerros y ambientes secos, siendo muy frecuente en suelos modificados como ser el costado de rutas y caminos, forma extensas comunidades especialmente en terrenos degradados. Tiene tallos erectos, hojosos en su parte distal. Las flores son dimorfas, las marginales tienen corola ligulada y las del centro corola tubulosa. El fruto es un aquenio con pappus ([Zuloaga et al., 2014](#)).



**Figura 2.8.** *G. chilensis*. Fotografía de un individuo en floración (A), e ilustración botánica de tallos hojosos en su parte distal y flores (B).

Se la conoce con el nombre popular de “botón de oro”. Es aromática, no reporta usos medicinales ni comestibles.

Se han encontrado distintos patrones fitoquímicos para las distintas especies de *Grindelia*, en general se caracterizan por la producción de diterpenoides bicíclicos de tipo labdano, llamados grindelanos. Estos diterpenoides muestran propiedades bioactivas hacia diferentes organismos diana como insectos, hongos patógenos y bacterias (Mesurado *et al.*, 2017). *Grindelia chilensis* en particular no ha sido objeto de estudios fitoquímicos en profundidad, a pesar de estar ampliamente distribuida en Patagonia. Hasta el momento se determinó que la producción de resinas (mezcla de terpenos), que presenta en forma de exudado, pueden ser hasta el 25% del peso fresco de las hojas. El interés en este aspecto es productivo, ya que esta resina podría tener usos similares a la resina de pino, por ello también se han abordado ensayos de propagación y reproducción de la especie (Wassner y Ravetta, 2000; Zavala y Ravetta 2001, Zavala y Ravetta 2002).

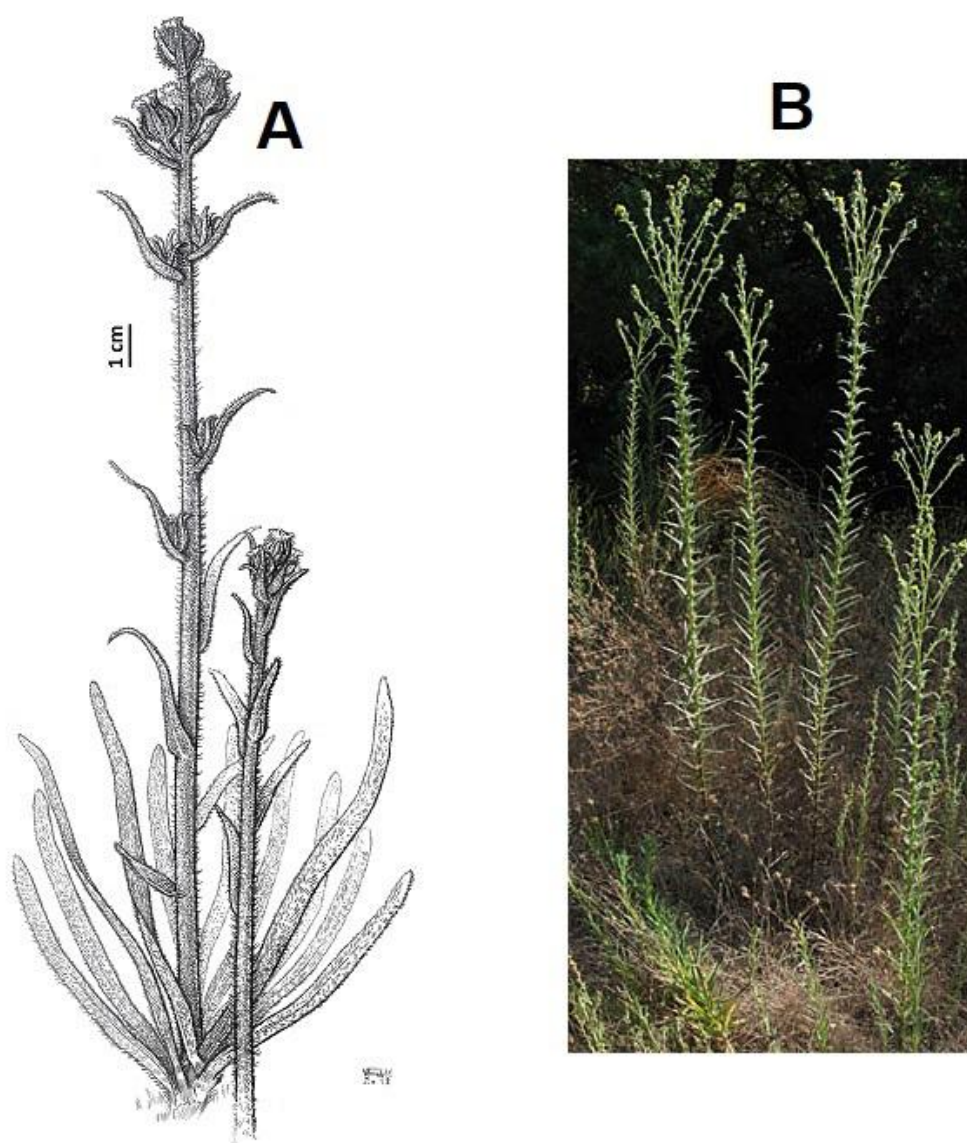
Esta especie casi no ha sido objeto de estudios de actividad biológica. La única investigación registrada es sobre la actividad proteolítica, a partir del látex exudado por la parte aérea, con resultados negativos. El interés de esta investigación fue estrictamente farmacéutico, buscando enzimas proteolíticas con potencial uso digestivo y antiinflamatorio (Saqueiros *et al.*, 2003).

En cuanto a su estado de conservación no existen reportes, su hábitos de colonizadora y amplia distribución sugieren que esta planta se encuentra fuera de peligro.

Debido a su elevada abundancia en los ecosistemas patagónicos, los datos que sugieren un metabolismo secundario muy activo y a la notoria ausencia de estudios se seleccionó *Grindelia chilensis* para incluirla en este trabajo.

### 2.1.9. *Madia sativa* Molina

El género *Madia* cuenta con 13 especies de distribución americana (Boham *et al.*, 1982; The Plant List, 2018). *Madia sativa* presenta distribución disyunta en Norteamérica y Patagonia. En ésta última crece en ambientes secos desde Mendoza hasta Tierra del Fuego (Correa y Costaguta, 1999). Se trata de una hierba anual con un ciclo de crecimiento muy corto, tiene tallos simples, erectos, pubescente-glandulosos (Figura 2.9). Tiene distintos tipos de hojas sésiles a lo largo del tallo, las hojas inferiores son arrosetadas, las siguientes opuestas y las superiores alternas. Las flores son amarillas, dimorfas, las marginales femeninas y las del disco, hermafroditas. El fruto es un aquenio oblanceolado, ligeramente comprimido, algo curvo, negro, liso y sin papus (Correa y Costaguta, 1999).



**Figura 2.9.** *M. sativa*. Ilustración botánica de la planta (A) y fotografía general de la misma (B).

Su nombre común principal es “madi” o “melosa”. Es aromática, medicinal y considerada comestible. Ha sido ampliamente reportada como comestible debido al alto valor nutricional de sus semillas, razón por la cual los pueblos originarios la recolectaban e incluso cultivaban en tiempo

precolombinos (Schmeda-Hirschmann, 1995). La información sobre uso medicinal es escasa, Muñoz *et al.* (1981) indica que las hojas se usan como tónico contra el reumatismo, gota, ciática y como purgante; Zardini (1992) reporta su utilización externa para aliviar síntomas de la artritis.

La fitoquímica no ha sido mayormente estudiada, habiéndose informado la presencia de diterpenos del tipo labdano (Boham *et al.*, 1982). El resto de análisis fitoquímicos existentes se centran en el estudio nutricional de las semillas, las cuales poseen un 30% de contenido de proteínas y 26% de aceites, entre los que se destaca el ácido linoleico (70%). La composición de su aceite también es analizada por Angelini *et al.* (1997), y posteriormente Malthus y Angelli (2005) quienes señalan que presenta componentes antinutricionales, aunque más tarde, Acevedo *et al.* (2012) concluyen que los aceites de las semillas de *Madia* no presentan actividad citotóxica.

La única actividad biológica reportada para extractos de esta especie es la capacidad inhibitoria del factor inflamatorio NF- $\kappa$ B reportada por Ekenäs *et al.* (2008) en un cultivo de keranotocitos humanos. NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción muy importante que entre otras funciones, regula la transcripción citoquinas inflamatorias en células epiteliales, actualmente NF- $\kappa$ B es un blanco de interés terapéutico. La investigación previa es congruente con el uso de preparaciones de *M. sativa* para aliviar síntomas de la artritis (origen inflamatorio) reportado por Zardini (1992) y Muñoz *et al.* (1981).

En cuanto a su estado de conservación no se encuentran trabajos al respecto, aunque debido a que se adapta fácilmente a suelos pobres y al valor nutricional de sus semillas, Schmeda-Hirschmann (1995) la ha propuesto como un cultivo potencial en Chile

Su notoria presencia en ambientes patagónicos, y el hecho de que casi no ha sido estudiada hasta el momento hacen que sea seleccionada para analizarla en este trabajo.

#### 2.1.10. *Solidago chilensis* Meyen

El género *Solidago* cuenta con 160 especies, distribuidas principalmente en el continente americano ([The Plant List, 2018](#)). *Solidago chilensis* es abundante en los ecosistemas patagónicos, se desarrolla en terrenos arenosos preferentemente húmedos, aunque también se encuentra en sitios áridos. La planta es una hierba rizomatosa, con tallos erectos, hojosos, glabros o hirsutos. Presenta hojas alternas, lineal lanceoladas, de 40 a 80 x 5 a 8 mm, enteras, trinervadas, glabras. La inflorescencia de flores amarillas adquiere una forma triangular a lo que debe el nombre común de punta de lanza (Figura 2.10), las flores son dimorfas, las marginales cortamente liguladas, las del centro tubulosas. El fruto es un aquenio, ligeramente pubescente, con papus blanco ([Zoluaga et al., 2014](#)).



**Figura 2.10.** *S. chilensis*. Fotografía de una planta completa en floración.

Esta especie es conocida como “vara de oro”, “punta de lanza” o simplemente “solidago”. Es aromática y presenta numerosos usos medicinales para las infusiones obtenidas de sus partes aéreas: diurética, antiinflamatoria de las vías urinarias, antiséptica y cicatrizante. Los usos etnofarmacológicos están relacionados principalmente con las propiedades antiinflamatorias ([Mercandeli et al. 2012](#); [Valverde et al., 2012](#)).

Los principales estudios fitoquímicos realizados sobre extractos etanólicos de las partes aéreas de esta planta indican la presencia de flavonoides quercetina y derivados glicosilados de dicho compuesto, y contiene además ácidos fenólicos (Russo y Garbarino, 2008). Por otro lado se han reportado diterpenos como solidagenona, en extractos orgánicos de las partes aéreas y raíces de la planta (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2002).

La bioactividad de extractos polares (acuosos, etanólicos, metanólicos) ricos en compuestos fenólicos han sido analizados con distintos objetivos y modelos (Mercandeli *et al.* 2012 ). Se han llegado a realizar dos ensayos clínicos sumamente interesantes con preparados de aplicación externa hechos en base a extractos etanólicos de solidago, en los mismos se demostró su utilidad medicinal como analgésico para el dolor lumbar (Silva *et al.*, 2010) y para aliviar los cuadros de tendinitis en las manos (Silva *et al.*, 2015).

En cuanto a su conservación no se encuentra amenazada y es cultivada en Brasil, formando parte de la plataforma agroecológica de fitomedicinas del Ministerio de Salud de ese país (Valverde *et al.*, 2012).

Solidago chilensis es una especie ampliamente distribuida en la región patagónica, con numerosos compuestos químicos y usos medicinales reportados, aún así hasta el momento no se han estudiado en detalle las infusiones obtenidas de esta planta. Por ello se la ha seleccionado para incorporarla en la presente investigación.

Tabla 2.1. Resumen de las principales propiedades y antecedentes para las especies estudiadas

Especie	Medicinal	Aromática	Usos medicinales principales	Compuestos reportados	Actividad biológica
 <i>A. boronoides</i>	✓	✓	antiinflamatoria, cicatrizante, digestiva	terpenos volátiles, flavonoides, esquelonona	antiinflamatoria
 <i>A. australe</i>	✓	✓	resfríos	sin datos	muy escasa
 <i>A. magellanica</i>	✗	✓	no posee	sin datos	sin datos
 <i>B. globosa</i>	✓	✗*	antiinflamatoria, cicatrizante, digestiva	fenoles, flavonoides, verbascósido	antiinflamatoria, cicatrizante, analgésica
 <i>D. andina</i>	✗	✓	no posee	flavonoides, taxifolina	sin datos
 <i>D. multifida</i>	✓	✓	digestiva, antiparasitaria	ascaridol, otros terpenos	genotoxicidad <i>in vitro</i> sobre linfocitos
 <i>G. astragalina</i>	✗	✓	resfríos **	sin datos	sin datos
 <i>G. chilensis</i>	✗	✓	no posee	diterpenos	muy escasos, no reporta actividad proteolítica
 <i>M. sativa</i>	✗*	✓	no posee	diterpenos	muy escasos, actividad inhibitoria de NF-kB
 <i>S. chilensis</i>	✓	✓	antiinflamatoria, cicatrizante, digestiva	diterpenos, ácidos fenólicos, flavonoides, quercetina y derivados	antiulcerosa, antiinflamatoria, analgésico muscular

\* En el caso de *B. globosa* la bibliografía la cita como aromática pero las poblaciones de Argentina no presentan carácter aromático y como se verá en el Capítulo 4 no posee aceites esenciales extraíbles en cantidades significativas. En el caso de *M. sativa* existe un trabajo que reporta su uso medicinal de manera muy general para América del Norte, no se considera una planta medicinal en Patagonia. \*\* En el caso de *G. astragalina* se encontró un reporte de utilización medicinal en una comunidad puntual, por ello se considera que en general no posee usos medicinales mayormente difundidos.

## 2.2. POBLACIONES, SITIOS DE MUESTREO y CONFECIÓN DE HERBARIOS

Se seleccionaron poblaciones naturales de las especies estudiadas ubicadas en la región noroeste de Patagonia, se tuvo en cuenta que las mismas se encontrarán en zonas rurales de acuerdo a las directrices de la Organización Mundial de la Salud sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales (OMS, 2003).

*Adesmia boronioides*, proximidades del camino a La Hoya, Esquel [42° 51' 20" S ; 71° 17' 12" O]

*Apium australe*, cercanías Parque Nacional Lago Puelo [42° 05' 21" S ; 71° 36' 23" O]

*Artemisia magellanica*, arroyo Mayoco, Leleque [42° 42' 41" S ; 71° 02' 59" O]

*Buddleja globosa*, proximidades Laguna Carao, Esquel [42° 54' 58" S ; 71° 20' 18" O]

*Drymis andina*, Laguna Negra, Bariloche [41° 08' 06" S ; 71° 34' 13" O]

*Dysphania multifida*, alrededores de la ciudad de Esquel [42° 55' 51" S ; 71° 21' 54" O]

*Glycyrrhiza astragalina*, Río Tecka, Tecka [46° 16' 31" S ; 70° 52' 21" O]

*Grindelia chilensis*, alrededores de Ruta Provincial 12, Gualjaina [42° 47' 12" S ; 70° 53' 10" O]

*Madia sativa*, alrededores Ruta Nacional 40, Leleque [42° 23' 24" S ; 71° 12' 43" O]

*Solidago chilensis*, alrededores Ruta Provincial 259, Esquel [42° 55' 53" S ; 71° 21' 51" O]

El material vegetal se recolectó en el estadio fenológico de prefloración a los fines de mantener un criterio de similitud durante la recolección de las muestras. Además, en concordancia con los objetivos de este trabajo, existe evidencia de que suele ser la época de mayor concentración de compuestos fenólicos y antioxidantes en las plantas en ambientes patagónicos (Backhouse et al., 2008a). Los permisos de recolección correspondientes fueron gestionados ante la Dirección de Flora y Fauna Silvestre de la Provincia del Chubut.

El material vegetal fue herborizado con técnicas estándar y enviado al Herbario Miguel Lillo, mundialmente reconocido por la cantidad de muestras y calidad de sus colecciones. Allí se realizó la curación por métodos habituales, y Dra. Nora Muroaga, curadora del herbario, corroboró la correcta identificación botánica de las especies, asignándoles los siguientes números de Voucher: *A. boronioides* LIL615497, *A. australe* LIL615498, *A. magellanica* LIL615499, *B. globosa* LIL615500 (A y B), *D. andina* LIL615501, *D. multifida* LIL615502 (A y B), *G. astragalina* LIL615503 (A y B), *G. chilensis* LIL615505, *M. sativa* LIL615506 y *S. chilensis* LIL615504.

A modo de ejemplo, en la Figura 2.11. se muestra una fotografía de *A. australe* tal cual como está ingresada en el Herbario Miguel Lillo.



Figura 2.11. Imagen de *Apium australe* herborizado en el Herbario Fanerogámico Miguel Lillo (Herbario LIL), San Miguel de Tucumán, Argentina.

## 2.3. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

Se trabajó con muestras compuestas de las partes aéreas de cada una de las especies, las mismas se constituyeron con 7 individuos elegidos al azar por población.

### *Infusión y liofilizados*

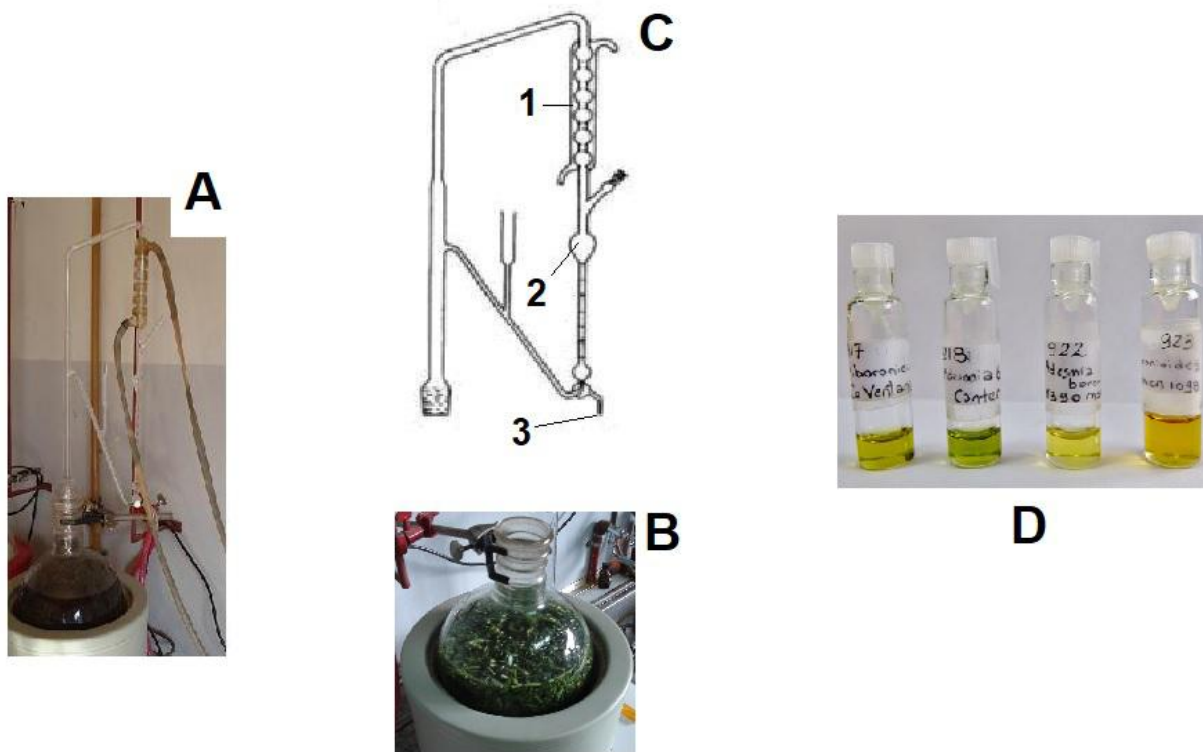
Se secó a temperatura ambiente, aislado de la luz, durante 7 días. Transcurridos los 7 días, a los fines de corroborar la ausencia de humedad se tomó un muestra 50 g y se colocó en estufa a 100 °C durante 24 horas, registrando el peso con una balanza analítica, antes y después de ingresar la muestra en la estufa. El material seco fue molido en un molinillo eléctrico Arcano de 24000 rpm. A partir del materia vegetal seco y molido de cada especie vegetal se prepararon las infusiones de acuerdo a la [Farmacopea Argentina 7ma edición \(2003\)](#). Para ello se pesaron 5 g de material vegetal en una balanza analítica Shimadzu AY220 y se colocaron en un erlenmeyer de 250 ml. Luego se agregaron 100 ml de agua destilada a 100 °C y se dejó reposar 20 min. El extracto acuoso obtenido se filtró por un embudo con papel de filtro Whatman número uno ([Deetae et al., 2012](#)), obteniendo las infusiones en vasos de precipitado (Fig. 2.12 A). Las infusiones obtenidas se sometieron a un proceso de liofilización en un equipo Virtis de 5 bocas, modelo SL, Gardiner, NY, USA. A través de este proceso se preservaron los extracto en forma de polvo seco que se utilizaron para posteriores análisis (Fig. 2.12 B).



**Figura 2.12.** Imagen de preparación de infusiones (A) y liofilizados obtenidos (B).

### *Aceites esenciales*

Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación con un aparato tipo Clevenger ([Farmacopea Argentina 7ma edición, 2003](#)). El material vegetal (400 g) previamente oreado durante 48 horas, se fraccionó con tijeras y se colocó en un balón de destilación de 5 litros de capacidad. La hidrodestilación se llevó a cabo hasta agotar el material (Fig 2.13).



**Figura 2.13.** Extracción de aceites de esenciales. Vista general del destilador (A), balón de hidrodestilación con material vegetal (B) al que se le aclopa la trampa Clevenger (C) (1-condensador, 2-bulbo de almacenaje, 3-llave de tres vías y pico para extracción), por último los aceites esenciales extraídos (D).

#### *Otros extractos orgánicos*

A partir del material vegetal seco y molido se prepararon extractos al 10% con solventes orgánicos (metanol, etanol y diclorometano) para la búsqueda de metabolitos secundarios de potencial interés (lactonas sesquiterpénicas, diterpenos y cumarinas).

## 2.4. ESQUEMA GENERAL Y ESTRUCTURA DE LOS SIGUIENTES CAPÍTULOS

En la Figura 2.14 se presenta un esquema general sobre la preparación de extractos y su relación con los análisis y experimentos que se abordarán en los capítulos sucesivos de este trabajo.

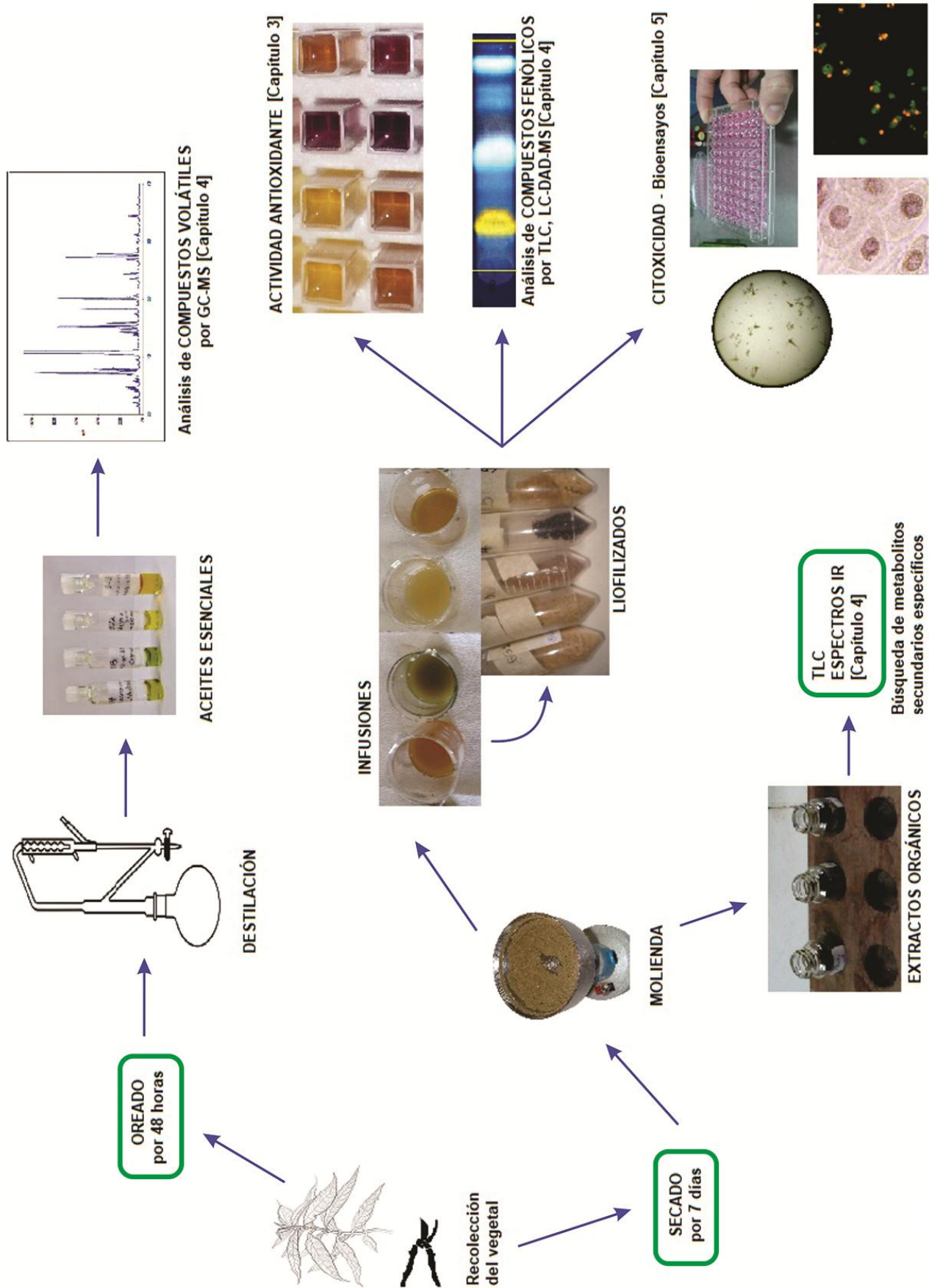


Figura 2.14. Esquema general de la preparación de extractos luego de la recolección del material vegetal. Se muestra como se procedieron a realizar los análisis y bioensayos, presentados en los siguientes capítulos de este trabajo.

## **CAPÍTULO 3.**

# **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE y CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LAS INFUSIONES**

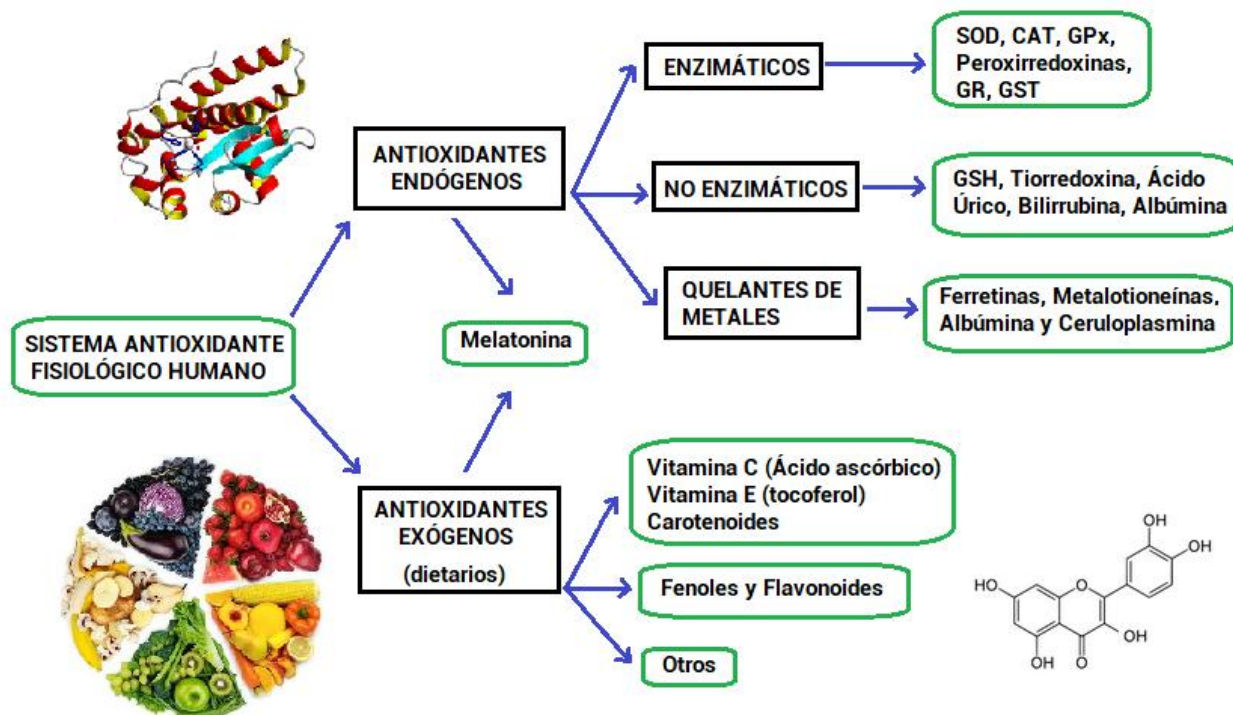
### 3.1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

#### 3.1.1. *Antioxidantes y salud, el paradigma de la especies reactivas del oxígeno (EROS)*

Para comprender la importancia del rol de los antioxidantes dietarios en salud humana es prioritario definir qué es un antioxidante. Si bien es un término de amplia utilización, resulta difícil dar una definición que satisfaga a todas las ramas científicas (Halliweel, 2001); según Huang *et al.* (2005) la definición a utilizar dependerá fuertemente de la rama científica y el aspecto que se desee analizar.

Desde la química, un antioxidante es una molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de otras. Halliwell (2001). Desde un enfoque más biológico, se propone una definición ampliamente aceptada actualmente, planteando que un antioxidante es cualquier sustancia que, a baja concentración respecto a la de un sustrato oxidable, retrasa o evita significativamente la oxidación de ese sustrato. Otra definición planteada desde la perspectiva de los procesos celulares y fisiológicos sería: un antioxidante es una sustancia que regula el estado redox de la célula (Halliwell, 2015). Todas las definiciones coinciden en que los antioxidantes son sustancias que neutralizan moléculas reactivas como los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno (EROS), reduciendo su reactividad en diversas matrices biológicas, incluyendo el cuerpo humano (Fraumberger *et al.*, 2016).

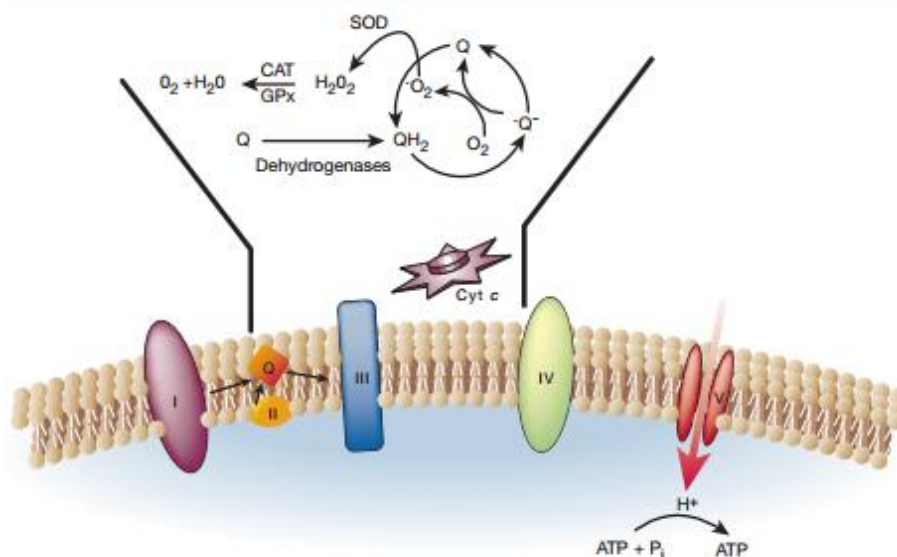
Desde la visión del sistema antioxidante fisiológico humano, se puede clasificar a los antioxidantes en endógenos (principalmente enzimas que produce el organismo) y en exógenos que se incorporan con la dieta y se consideran fitonutrientes (vitaminas, fenoles y flavonoides) (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Clasificación de los antioxidantes desde la importancia para la fisiología humana (elaborada en base a [Bonaciu et al., 2012](#); [Xu et al., 2012](#)). Los antioxidantes endógenos son principalmente enzimas, los antioxidantes exógenos son principalmente compuestos que se ingieren con la dieta, por ejemplo vitaminas y compuestos fenólicos provenientes de fuentes vegetales. SOD: enzima superóxido dismutasa, CAT: enzima catalasa, GPx: enzima glutatión peroxidasa, GR:enzima glutatión reductasa, GST:enzima glutatión transferasa. En la esquina inferior derecha ejemplo de la estructura química de un flavonoide.

Para comprender la importancia del rol de los antioxidantes dietarios en la salud humana es necesario enmarcarse en la teoría actual del envejecimiento, la cual propone que, en primera instancia, las células del cuerpo envejecen porque van acumulando pequeños daños producidos por las especies reactivas del oxígeno (EROS), generadas durante el proceso de respiración en la cadena de transporte de electrones. Las EROS son moléculas con oxígeno en su estructura, muy reactivas y oxidantes en los sistemas biológicos, y para neutralizarlas el organismo posee un sistema endógeno de antioxidantes enzimáticos (Figura 3.2) ([Finkel y Holbrock, 2000](#)).

El mecanismo de acción de las EROS es similar al de los radicales libres, moléculas con un electrón desapareado que las hace muy reactivas en sistemas biológicos. Los tóxicos ambientales pueden ser otra fuente externa de EROS y radicales libres, dañinos para el organismo. Dado que el sistema antioxidante endógeno no es 100 % eficiente, adquieren relevancia los antioxidantes exógenos o dietarios (Fig. 3.1.). Si en un organismo hay más oxidantes y radicales libres que antioxidantes se produce un estado fisiológico conocido como *estrés oxidativo*, en el que las defensas fisiológicas antioxidantes se ven sobrepasadas y las biomoléculas comienzan a dañarse progresivamente. El estrés oxidativo es causante y/o agravante de muchas condiciones patológicas como cáncer, enfermedades neurológicas, cardíacas, autoinmunes, de la vista y del envejecimiento en general ([Finkel y Holbrock, 2000](#)).



**Figura 3.2.** Esquema de la producción de las especies reactivas del oxígeno (EROS)  $\cdot\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la membrana mitocondrial durante el proceso de la respiración celular. La producción principal de EROS ocurre en el complejo III y son reducidos por las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx (Finkel y Holbrook, 2000).

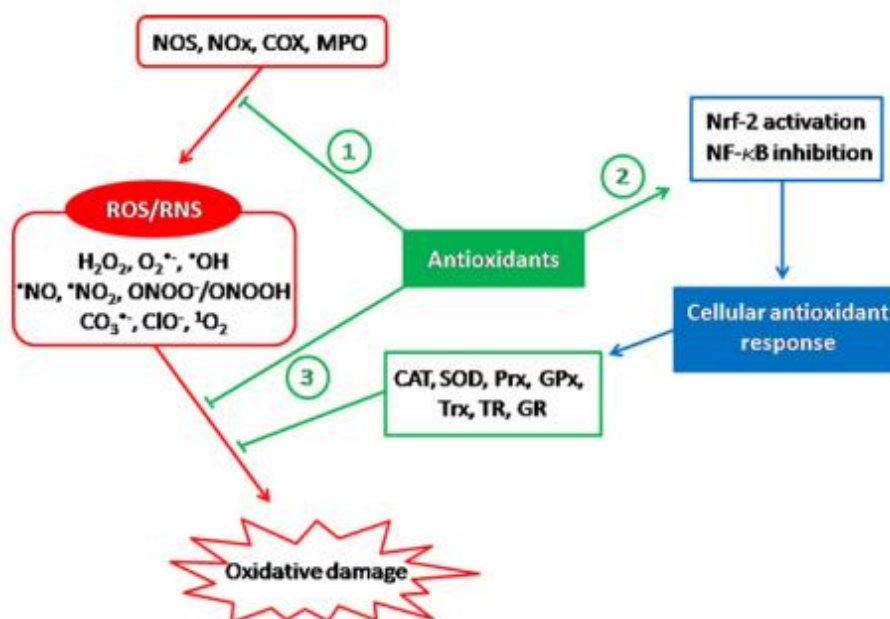
La teoría del estrés oxidativo se originó a partir de 1954. Posteriormente, en el año 1987 aparecen revistas especializadas en el tema y de amplio impacto como por ejemplo *Free Radical Biology and Medicine*. La temática se instaló masivamente en la comunidad científica a partir del año 2000, aproximadamente.

Inicialmente, la doctora argentina Rebeca Greshman (Greshman *et al.*, 1954) propuso mediante un artículo en la revista *Science*, que las radiaciones y el oxígeno ejercían toxicidad en enzimas *in vitro* y en ratones, a través de un mecanismo en común. Luego, Denham Harman (1956) propone una teoría señalando específicamente a los radicales libres y al efecto de la radiación como causantes del envejecimiento.

En sus orígenes esta teoría del envejecimiento fue opacada por el descubrimiento de la estructura del ADN, que acaparó el protagonismo y atención de la comunidad científica. Por ello, el envejecimiento y numerosas enfermedades intentaron explicarse con el énfasis puesto en los genes (Weinert y Timiras, 2003; Jin, 2010). Más tarde, en las décadas de 1970 y 1980, de la mano de un amplio desarrollo de la biología celular y molecular, adquirieron relevancia las teorías focalizadas en las hormonas y las rutas metabólicas y moleculares (Weiner y Timiras, 2003). Finkel y Holbrock (2000) retoman y revisan la teoría del envejecimiento causada por las especies reactivas del oxígeno, describiendo el proceso básico general del envejecimiento, importante tanto a nivel celular como de todo el organismo. Winterbourn *et al.* (2008) plantean la importancia biomédica del estrés oxidativo y de la comprensión de los mecanismos antioxidantes frente a las EROS como un campo de sumo interés que debe abordarse integrando la química y la biología.

Los antioxidantes pueden actuar a nivel celular y fisiológico mediante diferentes mecanismos: (1) inhibiendo enzimas oxidantes, (2) interactuando con la señalización redox en la célula vía activación del factor Nrf-2 o inhibición del factor NF- $\kappa$ B, (3) reacción directa con EROS y

especies oxidantes, bajando el nivel de especies tóxicas (este es el concepto más clásico de los antioxidantes como neutralizadores directos de radicales libres). Estos mecanismos se esquematizan a continuación en la Figura 3.3.



**Figura 3.3.** Principales mecanismos de acción de los antioxidantes a nivel celular y fisiológico. 1) Inhibición de enzimas prooxidantes e inflamatorias 2) interacción con vías de señalización redox a través de los factores Nrf-2 y NF-κB que aumentan la expresión de enzimas antioxidantes y 3) neutralización directa de EROS (López-Alarcón y Denicola, 2013). NOS: ácido nítrico sintasa. NOx: NADPH oxidasa. COx: ciclooxigenasa. MPO: mieloperoxidasa. CAT: catalasa. SOD: superóxido dismutasa. Prx: peroxirredoxina. GPx: glutatión peroxidasa. Trx: tioredoxina. TR: tioredoxina reductasa. GR: glutatión reductasa.

### 3.1.2 Las infusiones de plantas medicinales y aromáticas como fuentes dietarias de antioxidantes

En los últimos años se ha incrementado el interés por nuevas fuentes naturales de antioxidantes debido a dos razones principales: la primera es que, a nivel de la fisiología humana, presentan comprobados efectos benéficos sobre la salud, ya que contrarrestan la acción de los radicales libres, lo cual se asocia a la prevención y/o tratamiento de diversas patologías (Reddy *et al.*, 2003; Bennet *et al.*, 2012); la segunda es que algunos antioxidantes sintéticos utilizados en la industria alimenticia, como por ejemplo el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), poseen efectos tóxicos, se acumulan en el tejido graso y han mostrado ser carcinógenos en modelos animales (murinos) (Conacher *et al.*, 1986; Moch, 1986; Hirose *et al.*, 1997). Por ello existe un creciente interés por alternativas a los antioxidantes sintéticos tanto desde la óptica de los investigadores y la industria, como desde los consumidores.

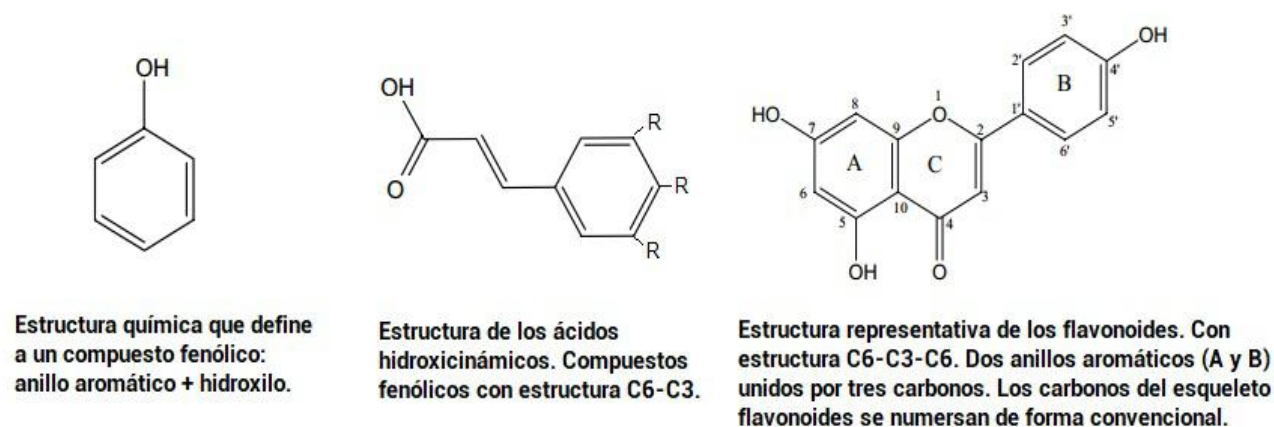
En dicho marco resulta relevante investigar nuevas fuentes naturales de antioxidantes dietarios, como pueden ser las plantas aromáticas y medicinales (Borneo *et al.*, 2009; Krishnaiah *et al.*, 2011, Xu 2012). Las infusiones, extractos acuosos que suelen consumirse como una bebida caliente, son la principal forma de utilización de las plantas medicinales, a la vez que constituyen un valioso recurso dietario como fuentes de antioxidantes y fitonutrientes (Krishnaiah *et al.*, 2011;

Li *et al.*, 2013). En este sentido pueden citarse algunos trabajos desarrollados recientemente en todo el mundo. La reconocida infusión de *Camelia sinensis* (L.) Kuntze (té Verde) ha sido ampliamente estudiada por sus propiedades antioxidantes atribuibles al compuesto epigallocatequina galato y otros compuestos fenólicos (Farzaneh y Carvahlo, 2015). Una amplia investigación fue desarrollada por Carlsen *et al.* (2010), en la que estudiaron el contenido total de antioxidantes en más de 3100 sustancias alimenticias consumidas alrededor del mundo, incluyendo plantas medicinales y aromáticas. Li *et al.* (2013) caracterizaron 223 infusiones de plantas medicinales tradicionalmente consumidas en China. Otras investigaciones han sido desarrolladas con un menor número de infusiones popularmente consumidas en distintos lugares del mundo como Grecia (Kaliora *et al.*, 2014), Turquía (Dalar *et al.*, 2013), Thailandia (Detaee *et al.*, 2012) y Brasil (Da Silva-Port's *et al.*, 2013). Si bien en Argentina los estudios realizados mediante este abordaje son escasos, pueden nombrarse trabajos puntuales: Celaya *et al.* (2014) investigaron infusiones de las plantas de la provincia de Jujuy, mientras que Borneo *et al.*, (2009) evaluaron plantas aromáticas y medicinales de la provincia de Córdoba con un enfoque de posible utilidad para la industria alimenticia. Hasta el momento no existe una investigación centrada en las infusiones de plantas de la Patagonia Argentina.

### 3.1.3. Una primera aproximación a los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilos unidos directamente a un anillo aromático, y pueden poseer uno o más anillos aromáticos en su estructura. Los principales compuestos fenólicos presentes en los tejidos vegetales que poseen solamente un anillo aromático, en general tienen la estructura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, y se agrupan bajo el nombre de ácidos hidroxicinámicos (o ácidos cinámicos). Otro grupo de compuestos fenólicos, importante en las plantas y en los extractos acuosos obtenidos de éstas, son los flavonoides, con un esqueleto típico de 15 carbonos y dos anillos aromáticos en su estructura (Figura 3.4) (Vermeris y Nicholson, 2006).

Como se señaló previamente, la estructura de anillos aromáticos y grupos hidroxilos hacen que estos compuestos posean notorias propiedades antioxidantes. Esto se explicará con más detalle en el Capítulo 4.



**Figura 3.4.** Estructuras generales típicas de compuestos fenólicos. De izquierda a derecha: fenol simple, ácidos hidroxicinámicos y flavonoide. En los ácidos hidroxicinámicos, R puede corresponder a uno o más grupos -OH, lo que da lugar a las distintas especies químicas dentro de esta categoría de compuestos.

### 3.1.4. Métodos para medir la actividad antioxidante, contenido de fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides

Las técnicas para medir la actividad antioxidante son diversas, y pueden ser colorimétricas, fluorométricas, electroquímicas (voltrametría cíclica, amperometría, biamperometría) e incluso cromatográficas (Pisoichi *et al.*, 2011). Las más utilizadas para medir actividad antioxidante en extractos de plantas se pueden categorizar en tres grupos principales de ensayos:

I) Ensayos que involucran transferencia de electrones -reacciones redox- entre los componentes del extracto y un radical libre orgánico (DPPH, ABTS).

II) Ensayos que evalúan la capacidad del extracto para evitar la oxidación de un sustrato. En general se busca determinar si el extracto es capaz de evitar o detener la peroxidación de lípidos ( $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, TBARS),

III) Ensayos que analizan si el extracto puede evitar la oxidación de un sistema biológico complejo en un entorno oxidante, por ejemplo de cultivos celulares o de algunos microorganismos como bacterias o levaduras (Silva *et al.*, 2005).

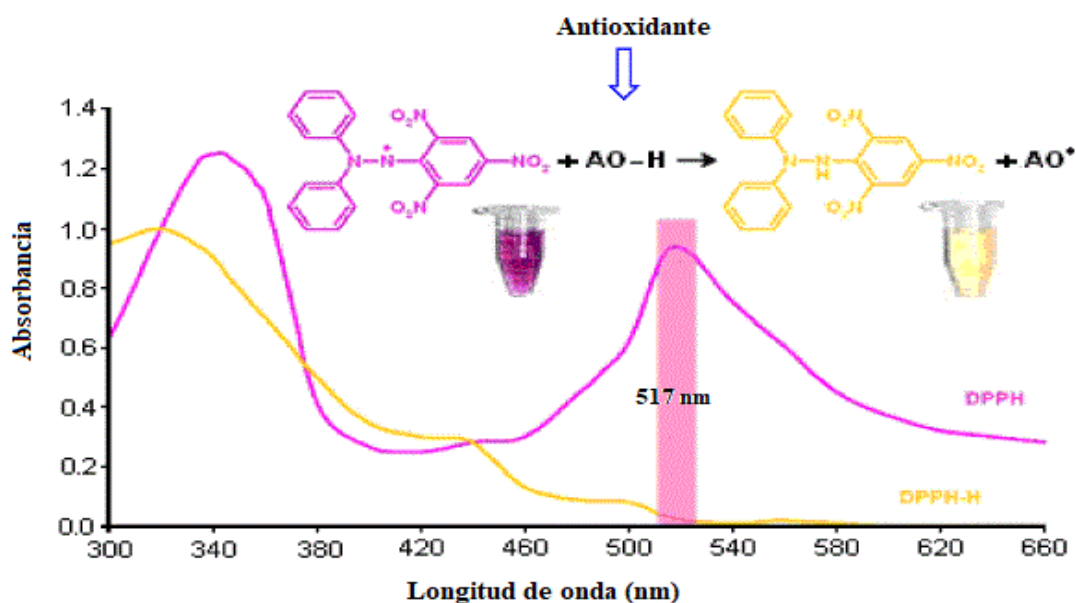
Para medir la actividad antioxidante de una muestra, de acuerdo con diferentes autores, es aconsejable utilizar más de un método, dada la complejidad de sustancias que conforman un extracto y las distintas variables que pueden influir en estas mediciones (Chanda *et al.*, 2009; Fraga *et al.*, 2014; PISOCHI *et al.*, 2016). De acuerdo con lo antedicho, en este trabajo se seleccionaron tres métodos para evaluar la actividad antioxidante de las infusiones de las plantas bajo análisis:

I) el ensayo del DPPH que utiliza el radical orgánico 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) como reactivo principal;

II) el ensayo del  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, en el que se forma un sistema micelar que va decolorándose a medida que aumenta la peroxidación;

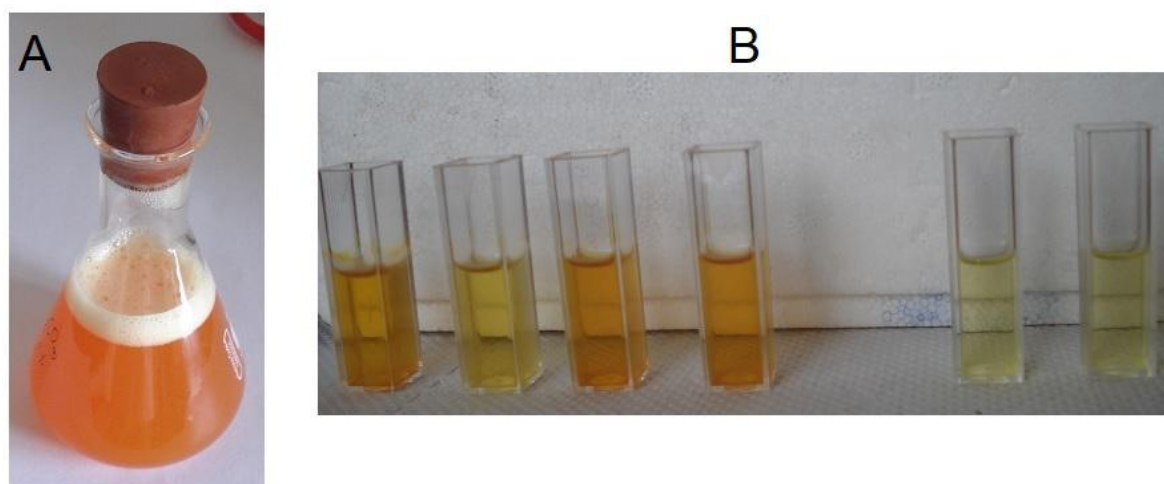
III) el ensayo de protección de *Saccharomyces cerevisiae* en un entorno oxidante.

El DPPH• es un radical libre estable debido a su estructura, donde el electrón desapareado se estabiliza por resonancia entre tres anillos aromáticos. El (DPPH•) en su estado cristalino es de color violeta, así como también en solución etanólica; al reaccionar con sustancias antioxidantes, vira a color amarillo (Brand-Williams *et al.*, 1995). Este cambio de color es medible espectrofotométricamente a 517 nm y los valores de la absorbancia antes (tiempo cero) y después de la reacción (tiempo estable) se utilizan para el cálculo de la cantidad de DPPH reducido. En su forma radical el DPPH• presenta altos valores de absorbancia a 517 nm, pero éstos disminuyen ante la presencia de sustancias antioxidantes, debido a que la forma radical capta un hidrógeno radical, transformándose en DPPH reducido (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Espectro de absorción del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. En color violeta se observa la forma radicalaria DPPH•, en amarillo la forma reducida DPPH-H. A 517 nm ocurre la máxima diferencia de absorbancia entre estas dos formas de la molécula. El reactivo pasa de violeta (DPPH•) a amarillo (DPPH-H) al reaccionar con sustancias antioxidantes (adaptada de Arteaga *et al.*, 2012).

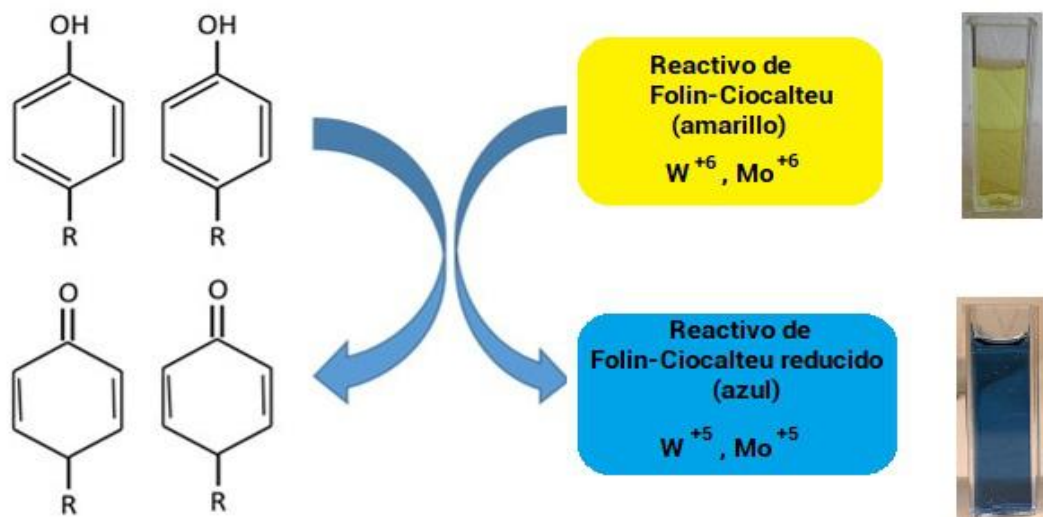
En el ensayo del  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico se prepara una emulsión micelar de color anaranjado-rojizo, que se va decolorando con el paso de las horas (Figura 3.6). Al agregar un extracto con actividad antioxidante es de esperar que esa pérdida de color no ocurra o se retarde respecto a un control sin extracto. Por lo tanto, se considera la inhibición de esa pérdida de color, como actividad antioxidante, la cual se expresa como % de inhibición de la oxidación (Chanwitheesuk *et al.*, 2005; da Silva Port's *et al.* 2013). En este caso el objetivo del ensayo es determinar si es posible que un determinado extracto vegetal proteja a un sustrato de la oxidación.



**Figura 3.6.** Emulsión con  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (A) y cubetas de espectrofometría con distintos grados de decoloración (B).

En el ensayo de protección de *Saccharomyces cerevisiae*, se busca someter al organismo modelo a un entorno oxidante generado por alguna sustancia específica (Silva *et al.*, 2005). Se analiza la supervivencia en presencia y ausencia de los extractos vegetales (infusiones), una mayor supervivencia de organismos se atribuye a una mayor actividad antioxidante.

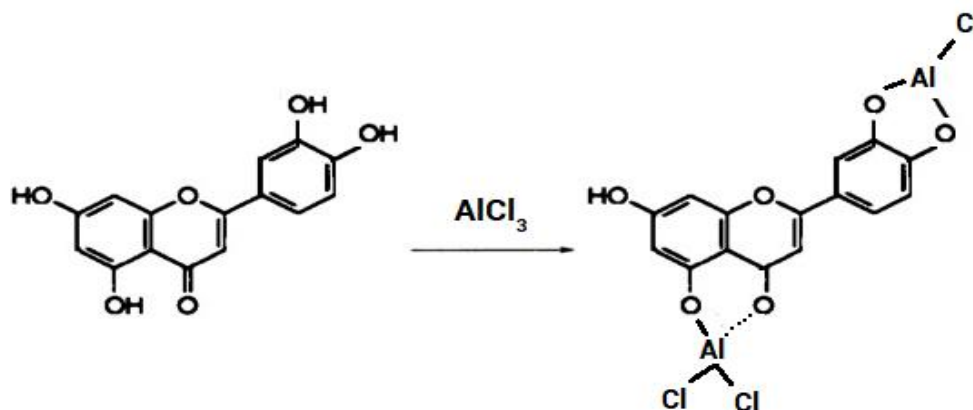
El nivel de compuestos fenólicos presentes en los extractos polares de plantas y en las infusiones en particular, es usualmente cuantificado por distintos protocolos ampliamente consensuados en la comunidad científica (Ricco *et al.*, 2015). El método más utilizado para cuantificar el nivel total de compuestos fenólicos en general se denomina Folin-Denis, Folin-Ciocalteu ó Folin-Denis-Ciocalteu. Las primeras publicaciones sobre este ensayo fueron Folin y Denis (1912) y Folin y Ciocalteu (1927). El método fue ampliamente utilizado durante el siglo XX y se popularizó en gran medida por el trabajo de Singlenton *et al.* (1999). El ensayo se basa en la reacción de óxido-reducción entre los compuestos fenólicos de la muestra y el reactivo (mezcla de ácido fosfomolibdico y ácido fosfotungsténico), que cambia del color amarillo al azul cuando se reduce (Figura 3.7). El reactivo reducido puede cuantificarse por espectrofotometría a través de una curva de calibración a 765 nm usando ácido gálico como patrón. La lectura de una mayor absorbancia se correlaciona con un mayor contenido de fenoles en la muestra.



**Figura 3.7.** Esquema de la reacción redox entre compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfomolibdico y ácido fosfotungsténico).

En concordancia con [Sánchez-Rangel et al. \(2013\)](#) y [Li et al. \(2013\)](#) cabe señalar que químicamente es un ensayo de óxido-reducción, por ello algunos autores lo consideran un método adicional para medir actividad antioxidante en lugar de un ensayo específico para determinar compuestos fenólicos. De todas formas, hay amplio consenso en utilizarlo para medir los compuestos fenólicos en extractos acuosos ([Detaee et al., 2012](#); [Da Silva-Port's et al., 2013](#)). Los valores son fiables y reproducibles al trabajar con una curva de calibración. En general, para las infusiones de plantas, existe una fuerte correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales determinado por este procedimiento ([Katsube et al., 2004](#)).

Existen además otros métodos para cuantificar específicamente el nivel de determinados compuestos fenólicos, como los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides. Como se mencionó anteriormente un grupo muy importante de compuestos fenólicos de acuerdo a su abundancia en extractos acuosos, son los ácidos hidroxicinámicos, los cuales son un grupo de fenoles con la estructura típica C6-C3 (Fig 3.4). La cantidad de ácidos hidroxicinámicos de una muestra puede medirse directamente por espectrofotometría a 328 nm, en cubetas de cuarzo ([Ricco et al., 2015](#)), utilizando una curva de calibración realizada con ácido clorogénico. A un mayor valor de absorbancia se corresponde un mayor contenido de ácidos hidroxicinámicos totales. La mayoría de los fenoles simples (con un solo anillo aromático) presentes en las plantas pertenecen a este grupo de compuestos. Por otro lado también es posible medir el nivel de compuestos fenólicos del tipo flavonoide, los flavonoides totales se determinan universalmente mediante el método colorimétrico del tricloruro de aluminio. La técnica está basada en la formación de un quelato entre este tipo de polifenoles con el tricloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) ([Bouyaded et al., 2007](#)) (Fig. 3.8). Esta interacción es medible espectrofotométricamente a 425 nm.



**Figura 3.8.** Reacción de quelación entre un flavonoide y el tricloruro de aluminio. El producto formado posee absorbancia a 425 nm, mayor absorbancia indica mayor nivel de flavonoides totales en una muestra. Esta propiedad de los flavonoides también determina que estos compuestos posean acción quelante con otros metales pesados.

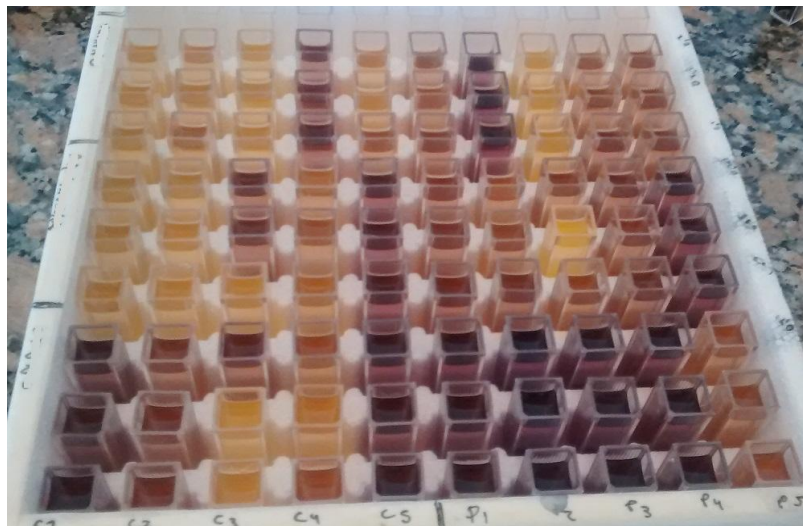
El objetivo de este capítulo fue analizar las características generales de las infusiones obtenidas de las partes aéreas de las especies estudiadas: actividad antioxidante, fenoles totales, ácidos hidroxycinámicos totales y flavonoides totales (objetivo específico -b-).

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1. Determinación de la actividad antioxidante por método del DPPH

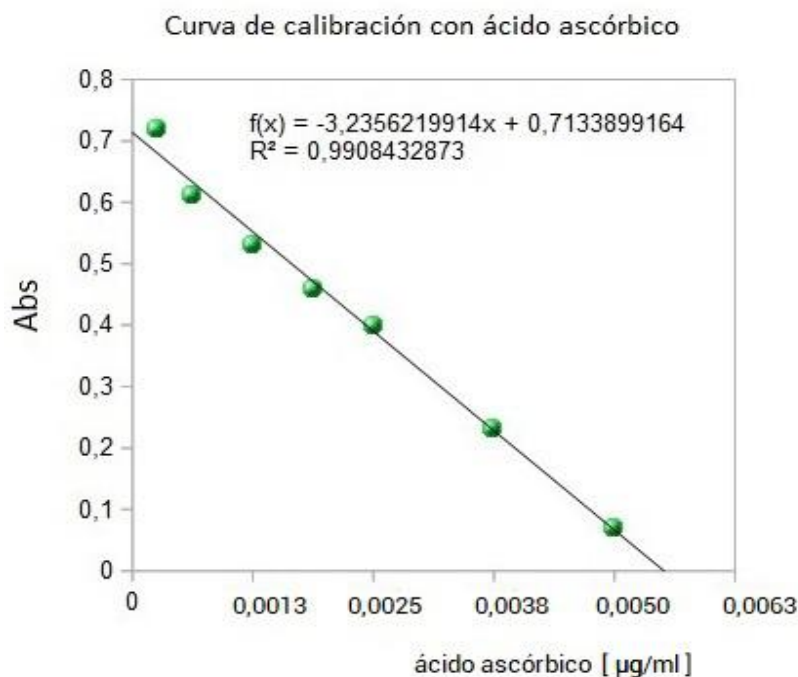
La actividad antioxidante se determinó por el método basado en el reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) (Brand-Williams *et al.*, 1995; da Silva Port's *et al.* 2013). Inicialmente se preparó una solución etanólica de DPPH (20 mg/l). Se usaron cubetas de espectrofotometría de 4,5 ml. En cada una se agregaron 100 µl de los liofilizados resuspendidos en agua destilada (15 mg/ml) y 3,9 ml de la solución de DPPH•. Cada muestra se midió por triplicado. Adicionalmente se prepararon tres cubetas blanco que solo contenían 3,9 ml solución de DPPH• y un control positivo con ácido ascórbico (3 cubetas). Las cubetas se dejaron reposar 30 min en la heladera (4 °C), para completar la reacción (Figura 3.9), Se determinó la absorbancia a 517 nm de la solución blanco de DPPH• y de la misma forma, se midió la absorbancia para cada una de las muestras. Para cada cubeta se calculó el porcentaje de DPPH• neutralizado (% DPPH<sub>neutralizado</sub>), mediante la siguiente fórmula, en la cual Abs<sub>blanco</sub> hace referencia al valor de absorbancia del blanco de DPPH• y Abs<sub>muestra</sub> hace referencia al valor de absorbancia de cada una de las muestras:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{neutralizado}} = (\text{Abs}_{\text{blanco}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}) / \text{Abs}_{\text{blanco}} \times 100$$



**Figura 3.9.** Fotografía de cubetas de espectrofometría con distintas muestras luego de concluir el ensayo del DPPH. Las cubetas color amarillo contienen muestras de mayor actividad antioxidante que las cubetas color violeta.

Adicionalmente se realizó una curva de calibración con vitamina C en un rango de 0 a 0,0050  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 3.10), por lo que los resultados se expresan además en términos de equivalentes de vitamina C (VCEAC), de acuerdo con los trabajos de [Toit et al. \(2001\)](#), [Detaee et al. \(2012\)](#) y [da Silva Port's et al. \(2013\)](#). La curva de calibración se realizó tres veces, en experimentos independientes. Se eligió esta expresión dado que es muy útil para la caracterización nutricional de bebidas, ya que se puede calcular, por ejemplo, el total de antioxidantes por taza de infusión (200 ml) expresado en equivalentes de un antioxidante naturalmente presente en diversas matrices alimenticias, como lo es el ácido ascórbico (vitamina C). Además de las infusiones analizadas en este trabajo, se trabajó con la infusión de *Camelia sinensis* (té verde, muestra comercial), la cual es mundialmente reconocida por su alta actividad antioxidante ([Subhayan y Panda, 2017](#)), la misma se incluyó con fines comparativos y a fin de enriquecer la discusión de los resultados.



**Figura 3.10.** Curva de calibración con ácido ascórbico (vitamina C) para el ensayo de actividad antioxidante por el método de DPPH. A mayor concentración de ácido ascórbico disminuye la absorbancia, debido a una mayor reducción del reactivo.

En cuanto al diseño experimental para este ensayo se realizó un modelo lineal simple trabajando con muestras compuestas de material vegetal por cada especie y 5 repeticiones. Cada muestra compuesta se obtuvo a partir de 7 individuos de la población. La unidad experimental fue cada cubeta de 4,5 ml sobre la que se realizó un único tratamiento (100 µl de muestra, constituida por liofilizado resuspendido en agua estéril a 15 mg/ml). En este caso la unidad de medición fue el valor de absorbancia por cubeta y la variable de respuesta fue el % de DPPH neutralizado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey (comparaciones múltiples) con un nivel de significancia  $\alpha < 0,05$ , se verificó que se cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Software GraphPad v6, USA; Infostat, Argentina).

### 3.2.2. Determinación de la actividad antioxidante por $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

El segundo método utilizado para medir la actividad antioxidante fue el sistema micelar  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (BCB) (Chanwitheesuk *et al.*, 2005; da Silva Port's *et al.* 2013). Para el protocolo utilizado, inicialmente se preparó una emulsión (sistema micelar) mezclando 0,5 mg de  $\beta$ -caroteno, 1 ml de cloroformo, 25 µl de ácido linoleico y 200 mg de Tween 40. El cloroformo fue completamente evaporado y luego se agregaron 100 ml de agua destilada saturada en oxígeno. Se agitó la mezcla vigorosamente (Chanwitheesuk *et al.*, 2005; da Silva Port's *et al.* 2013). Luego se colocaron en cubetas para espectrofotometría 3 ml de la emulsión y 0,5 ml de liofilizados resuspendidos en agua destilada (15 mg/ml), también se dejaron cubetas blanco sin agregado de muestras. La mezcla se dejó reaccionar por 48 horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

Luego se midió la absorbancia a 470 nm. Un mayor porcentaje de inhibición de la decoloración significa una mayor actividad antioxidante. Los resultados se expresan como % de inhibición de la decoloración respecto del blanco de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición de la decoloración} = [1 - ((\text{Abs}_{\text{inicial de la muestra}} - \text{Abs}_{\text{a las 48 hs de la muestra}}) / (\text{Abs}_{\text{inicial del blanco}} - \text{Abs}_{\text{a las 48 hs del blanco}}))] \times 100$$

En cuanto al diseño experimental para este ensayo se realizó un modelo lineal simple trabajando con muestras compuestas de material vegetal por cada especie y 5 repeticiones. Cada muestra compuesta se obtuvo a partir de 7 individuos de la población. La unidad experimental fue cada cubeta de 4,5 ml sobre la que se realizó un único tratamiento (0,5 ml de muestra, constituida por liofilizado resuspendido en agua estéril a 15 mg/ml). En este caso la unidad de medición fue el valor de absorbancia por cubeta y la variable de respuesta fue el % de inhibición de la decoloración. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey (comparaciones múltiples) con un nivel de significancia  $\alpha < 0,05$ , se verificó que se cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Software GraphPad v6, USA; Infostat, Argentina).

### 3.2.3. Determinación de la actividad antioxidante con el bioensayo de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó el protocolo adaptado de [Silva et al. \(2005\)](#) en instalaciones del Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagonico (CIEFAP), en colaboración con la Lic. Sofía Lopez y la Dra. María Belén Pildain. Se inició el cultivo de *S. cerevisiae* en medio sólido (1% de extracto de levadura, 2% de glucosa, 2% de peptona y 2% de agar) y luego se repicó en medio líquido de igual composición (sin agar) hasta que el cultivo alcanzó la mitad de la fase exponencial de crecimiento, el recuento se hizo mediante cámara de Neubauer. La levadura volvió a inocularse en placas de Petri con medio sólido y se constituyeron los tratamientos evaluados: blanco (solo levadura), control positivo de ambiente oxidante (levadura + *terc*-butilhidroperóxido), tratamientos con infusiones (levadura + infusión de cada especie vegetal + *terc*-butilhidroperóxido). En todos los casos se trabajó el *terc*-butilhidroperóxido puro a una concentración final de 3 mM ([Silva et al., 2005](#)) y liofilizados resuspendidos en agua estéril a 15 mg/ml. Para cada tratamiento se contabilizó el % de viabilidad de *S. cereviceae* por el método de recuento de colonias. Se asignó al valor del blanco 100% de viabilidad.

En cuanto a los aspectos generales del diseño experimental se utilizó un modelo lineal simple trabajando con muestras compuestas de material vegetal por cada especie y 3 repeticiones. Cada muestra compuesta se obtuvo a partir de 7 individuos de la población. La unidad experimental fue cada placa de Petri. En este caso la unidad de medición fue el número de colonias de *S. cereviceae* en cada placa de petri y la variable de respuesta fue el % de viabilidad de *S. cereviceae*. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey (comparaciones múltiples) con un nivel de significancia  $\alpha < 0,05$ , se

verificó que se cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Software GraphPad v6, USA; Infostat, Argentina)

### 3.2.4. Determinación del contenido de fenoles totales

Para determinar el contenido total de fenoles se utilizó un protocolo colorimétrico adaptado de Deetae *et al.* (2012) y da Silva Port's *et al.* (2013). Inicialmente se realizó una curva de calibración con ácido gálico a partir de una solución madre de 1 mg/ml de dicho compuesto, con un rango de concentración final de 0 a 6,67  $\mu\text{g/ml}$ . Se preparó una solución acuosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 16%. El reactivo de Folin-Ciocalteu puro (Sigma) se diluyó a  $\frac{1}{4}$  en agua destilada. Para el análisis se utilizaron cubetas de espectrofotometría de 4,5 ml de volumen final. Inicialmente se colocaron 2 ml de agua destilada, luego 50  $\mu\text{l}$  de infusiones, 0,2 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y finalmente 0,8 ml de la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Las cubetas se dejaron reaccionar durante 20 min a temperatura ambiente (Figura 3.11).

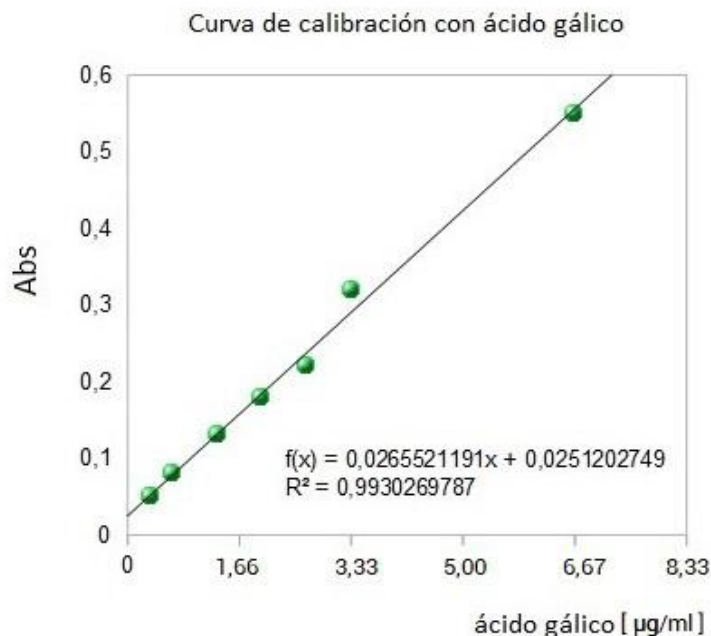


**Figura 3.11.** Ensayo de determinación de fenoles totales. Curva de calibración con ácido gálico (A) y cubetas con muestras para realizar medición en el espectrofotómetro (B).

Posteriormente se midieron los valores de absorbancia a 765 nm, se construyó la gráfica de la curva de calibración, se realizó el ajuste a una función lineal y se extrajo la fórmula de la misma (Figura 3.12). El contenido de fenoles se obtuvo reemplazando el valor de la absorbancia de cada muestra obtenido y despejando el valor de masa a partir de la función lineal de la gráfica correspondiente a la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg eq de ácido gálico (GAE) por ml de infusión y por gramo de material vegetal seco.

En cuanto al diseño experimental para este ensayo se realizó un modelo lineal simple trabajando con muestras compuestas de material vegetal por cada especie y 5 repeticiones. Cada muestra compuesta se obtuvo a partir de 7 individuos de la población. La unidad experimental fue cada cubeta de 4,5 ml sobre la que se realizó un único tratamiento (50  $\mu\text{l}$  de muestra, constituida por liofilizado resuspendido en agua estéril a 15 mg/ml). En este caso la unidad de medición fue el

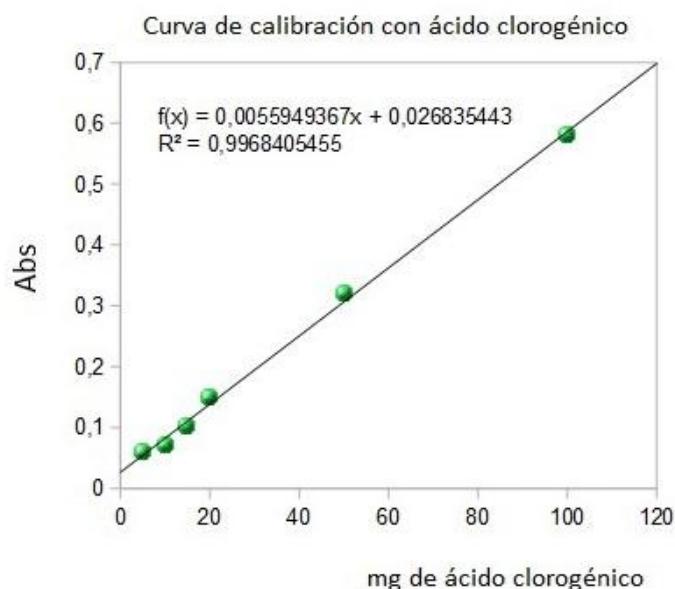
valor de absorbancia por cubeta y la variable de respuesta fue el el contenido de fenoles totales por ml de infusión, expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey (comparaciones múltiples) con un nivel de significancia  $\alpha < 0,05$ , se verificó que se cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Software GraphPad v6, USA; Infostat, Argentina).



**Figura 3.12.** Curva de calibración con ácido gálico, para el ensayo de fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. A mayor concentración de ácido gálico (compuesto fenólico) aumenta la absorbancia, debido a la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu.

### 3.2.5. Determinación de los ácidos hidroxicinámicos totales

Se utilizó un protocolo sencillo adaptado de [Ricco et al. \(2015\)](#). Se construyó una curva de calibración con ácido clorogénico en un rango de 0 a 100 µg/ml (Figura 3.13). De forma similar a los ensayos previamente descritos se utilizaron cubetas para espectrofotetría de 4,5 ml, aunque en este caso se utilizan del material cuarzo, debido a la longitud onda a la cual se realiza la medición. En cada cubeta se agregaron 50 µl de muestras y 3 ml de etanol. Luego de reposar por 30 min se realiza la lectura a 328 nm. El contenido de ácidos hidroxicinámicos totales se obtuvo reemplazando el valor de la absorbancia de cada muestra obtenido y despejando el valor de masa a partir de la función lineal de la gráfica correspondiente a la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg eq de ácido clorogénico (CAE) por ml de infusión y por gramo de material vegetal seco.



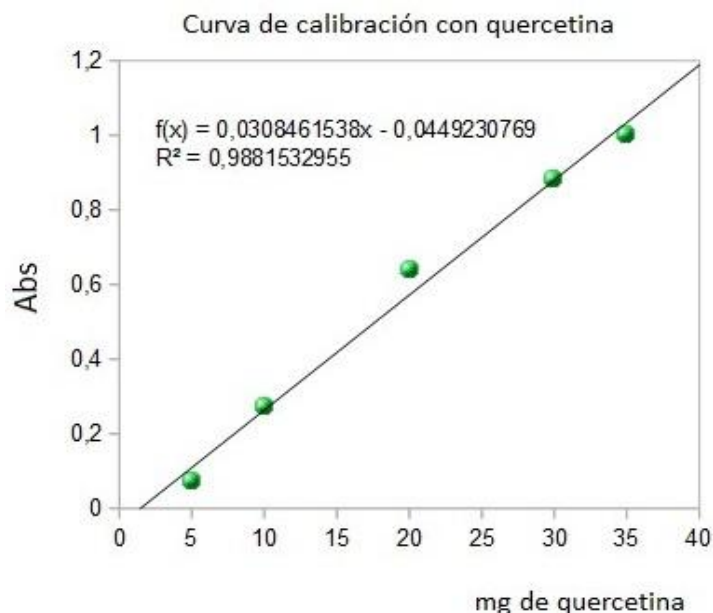
**Figura 3.13.** Curva de calibración con ácido clorogénico, para el ensayo de ácidos hidroxicinámicos totales mediante absorbancia directa a 328 nm. A mayor concentración de ácido clorogénico aumenta la absorbancia, debido a la interacción directa entre este compuesto fenólico (del tipo ácido hidroxicinámico) y luz UV 328 nm.

En cuanto al diseño experimental para este ensayo se realizó un modelo lineal simple trabajando con muestras compuestas de material vegetal por cada especie y 5 repeticiones. Cada muestra compuesta se obtuvo a partir de 7 individuos de la población. La unidad experimental fue cada cubeta de 4,5 ml sobre la que se realizó un único tratamiento (50  $\mu$ l de muestra, constituida por liofilizado resuspendido en agua estéril a 15 mg/ml). En este caso la unidad de medición fue el valor de absorbancia por cubeta y la variable de respuesta fue el contenido de ácidos hidroxicinámicos totales por ml de infusión, expresados como mg equivalentes de ácido clorogénico (CAE). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey (comparaciones múltiples) con un nivel de significancia  $\alpha < 0,05$ , se verificó que se cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Software GraphPad v6, USA; Infostat, Argentina).

### 3.2.6. Determinación de los flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó por el método colorimétrico del tricloruro de aluminio, de acuerdo a [Bouayed et al. \(2007\)](#). Para este protocolo se realizó una curva de calibración a partir de una solución madre del flavonoide quercetina (1 mg/ml) con un rango de concentraciones finales de 0 a 35  $\mu$ g/ml (Figura 3.14). Se preparó una solución etanólica al 5 % de  $AlCl_3$ . De forma similar a las determinaciones previas, se utilizaron cubetas de espectrofotometría de 4,5 ml, en las cuales se colocaron inicialmente 1,5 ml de etanol, luego 100  $\mu$ l de cada muestra y finalmente 1 ml de la solución de  $AlCl_3$ . Luego de dejar en reposo 20 min a temperatura

ambiente y en oscuridad se realizó la medición a 425 nm. El contenido de flavonoides totales se obtuvo reemplazando el valor de la absorbancia de cada muestra obtenido y despejando el valor de masa a partir de la función lineal de la gráfica correspondiente a la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg eq de quercetina (QE) por ml de infusión y por gramo de material vegetal seco.

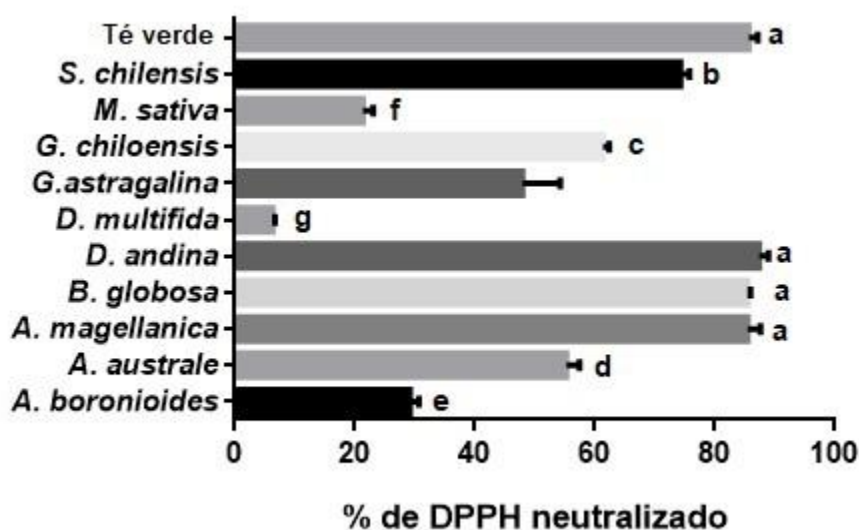


**Figura 3.14.** Curva de calibración con el flavonoide quercetina, para la determinación de flavonoides totales mediante el ensayo del  $\text{AlCl}_3$ . A mayor concentración de quercetina aumenta la absorbancia, debido a la formación de complejos entre el flavonoide y el  $\text{AlCl}_3$ , los cuales absorben a 425 nm.

En cuanto al diseño experimental para este ensayo se realizó un modelo lineal simple trabajando con muestras compuestas de material vegetal por cada especie y 5 repeticiones. Cada muestra compuesta se obtuvo a partir de 7 individuos de la población. La unidad experimental fue cada cubeta de 4,5 ml sobre la que se realizó un único tratamiento (100  $\mu\text{l}$  de muestra, constituida por liofilizado resuspendido en agua estéril a 15 mg/ml). En este caso la unidad de medición fue el valor de absorbancia por cubeta y la variable de respuesta fue el contenido de flavonoides totales por ml de infusión, expresados como mg equivalentes de quercetina (QE). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey (comparaciones múltiples) con un nivel de significancia  $\alpha < 0,05$ , se verificó que se cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Software GraphPad v6, USA; Infostat, Argentina).

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. Determinación de la actividad antioxidante por los métodos del DPPH, $\beta$ -caroteno/ácido linoleico y *S. cerevisiae*

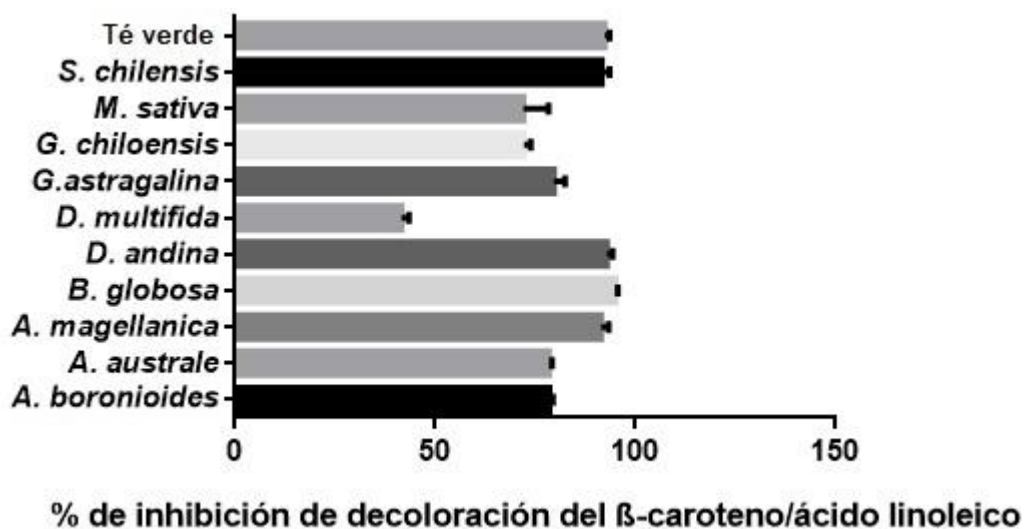


**Figura 3.15.** Actividad antioxidante mediante el método del DPPH. Un valor más alto de % de DPPH neutralizado indica una mayor actividad antioxidante.

En cuanto a la determinación de la actividad antioxidante por el método del DPPH (Figura 3.15), se destacaron los altos valores para *A. magellanica* (85,0 %  $\pm$  5,3), *B. globosa* (85,0 %  $\pm$  0,3) y *D. andina* (88,1 %  $\pm$  3,4). Estas tres especies presentan valores similares al té verde (86,3 %  $\pm$  3,2) y significativamente más altos que las otras especies evaluadas. El té verde es una infusión consumida alrededor del mundo y muy reconocida en cuanto a su alta actividad antioxidante (Subhayan y Panda, 2017), por lo que los datos obtenidos para *A. magellanica*, *B. globosa* y *D. andina* son de sumo interés. Por otro lado *D. multifida* presenta el menor valor (6,0 %  $\pm$  0,5).

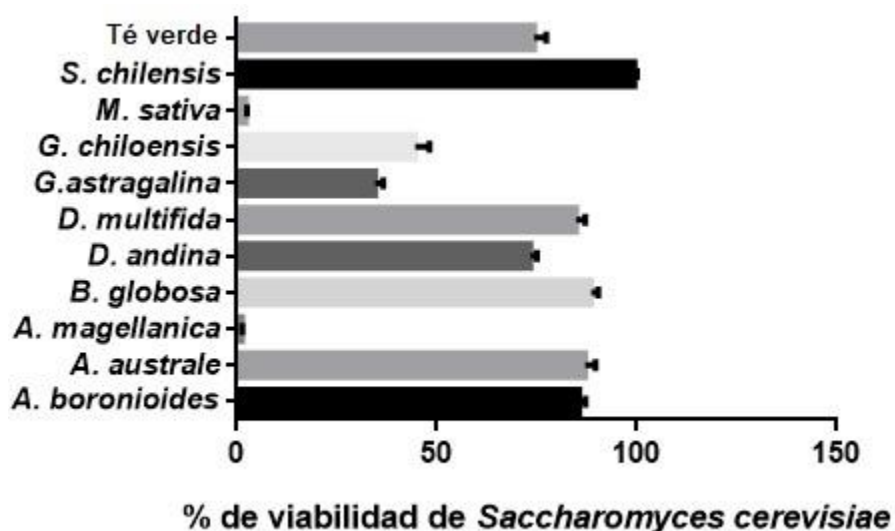
El resto de las especies analizadas quedan organizadas en el siguiente orden decreciente de actividad antioxidante, significativamente diferentes entre todas ellas: *S. chilensis* (72,5 %  $\pm$  0,1) > *G. chilensis* (60,2 %  $\pm$  1,4) > *A. australe* (55,0 %  $\pm$  2,0) > *G. astragalina* (44,8 %  $\pm$  9,9) > *A. boronioides* (28,6 %  $\pm$  2,3) > *M. sativa* (22,2 %  $\pm$  5,3).

De forma similar a como indican algunos autores (Wojdylo *et al.*, 2007; Dudonné *et al.*, 2009), este método resultó muy útil para comparar la actividad antioxidante de un elevado número de muestras en un mismo sistema experimental, obteniendo diferencias significativas de gran utilidad y clara interpretación. De acuerdo a este método, las infusiones analizadas poseen una actividad antioxidante para neutralizar directamente radicales libres en solución acuosa que resulta diferencial entre especies.



**Figura 3.16.** Actividad antioxidante mediante el método del  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Un valor más alto de % de inhibición indica una mayor actividad antioxidante.

Respecto del método del BCB (Figura 3.16.) se observó que *A. magellanica* (89,2 %  $\pm$  3,9), *B. globosa* (94,7 %  $\pm$  2,1), *D. andina* (92,3 %  $\pm$  3,3) y *S. chilensis* (91,3  $\pm$  2,1) presentan valores equiparables al té verde (93,0 %  $\pm$  3,2) y significativamente más altos que las otras especies evaluadas. *D. multifida* también presenta el menor valor para este método (6,0 %  $\pm$  0,5). En orden decreciente, por actividad significativamente diferente, quedaron ordenadas: *A. boronioides* (79,0 %  $\pm$  0,4) = *A. australe* (79,0 %  $\pm$  0,7) = *G. astragalina* (79,1 %  $\pm$  3,6) > *G. chiloensis* (92,3 %  $\pm$  3,3) = *M. sativa* (92,3 %  $\pm$  3,3).



**Figura 3.17.** Actividad antioxidante mediante el método de *S. cerevisiae*. Un valor más alto de % de viabilidad indica una mayor protección frente a un ambiente oxidativo y por lo tanto mayor actividad antioxidante. El control sin tratamientos, *S. cerevisiae*, posee una viabilidad del 100 % (dato no graficado).

En el ensayo de actividad antioxidante por el método de *S. cerevisiae*, se destacó *S. chilensis* como valor más alto, significativamente diferente del resto de los extractos, ya que arrojó

un valor del  $100\% \pm 1,3$  de viabilidad (Figura 3.17). En contraposición, los extractos que resultaron en una menor viabilidad y por lo tanto menor actividad antioxidante por este método fueron *A. magellanica* ( $1,3\% \pm 0,9$ ) y *M. sativa* ( $2,0\% \pm 0,9$ ); estos datos también podrían deberse a un posible efecto tóxico de los extractos acuosos sobre la levadura (el aspecto de toxicidad es discutido posteriormente en el Capítulo 5). El resto de las infusiones se ordenaron de la siguiente manera decreciente: *A. boronioides* ( $85,7\% \pm 1,3$ ) = *A. australe* ( $85,7\% \pm 5,9$ ) = *B. globosa* ( $88,6\% \pm 2,9$ ) = *D. multifida* ( $85,7\% \pm 3,9$ ) > té verde ( $72,1\% \pm 4,3$ ) = *D. andina* ( $72,3 \pm 1,3$ ) > *G. chilensis* ( $47,6 \pm 5,3$ ) > *G. astragalina* ( $34,7\% \pm 2,3$ ).

En el caso particular de *A. magellanica*, se observó que el análisis de la infusión mediante los métodos de DPPH y BCB arroja valores de alta actividad antioxidante. Sin embargo, el tercer ensayo referido a la viabilidad de *S. cerevisiae*, brindó el porcentaje más bajo de los obtenidos. Esta discordancia podría deberse a un posible efecto tóxico de la infusión sobre la levadura (la toxicidad de la especie se discute en mayor detalle en el Capítulo 5).

En cuanto a la utilización de estos ensayos para examinar la actividad antioxidante de las infusiones, puede observarse que el primer método (% DPPH neutralizado) destaca las diferencias entre las distintas plantas evaluadas, mientras que las otras dos metodologías (BCB y test de *S. cerevisiae*) agrupan a las especies en un menor número de categorías de significancia. Es decir, la variabilidad en la actividad antioxidante de estas plantas fue más notoria mediante el experimento del DPPH. En este ensayo se obtuvieron 8 categorías de significancia, con un valor máximo de % de DPPH neutralizado de  $88,1\%$  para *D. andina*, y un valor mínimo de  $6,0\%$  para *D. multifida*.

En el método de *S. cerevisiae*, se encontró actividad antioxidante superior al té verde para varias de las especies estudiadas (*S. chilensis*, *D. multifida*, *A. australe*, *B. globosa*, *A. boronioides*), mientras que mediante los otros dos métodos utilizados algunas especies alcanzaron el valor del té verde pero nunca lo superaron de manera significativa.

Según Pérez-Jimenez *et al.* (2008) pueden establecerse las siguientes categorías de actividad antioxidante: 0-35 % baja actividad, 35-70% actividad media, 70% o más, alta actividad; teniendo en cuenta esta clasificación se observó que por los métodos BCB y de *S. cerevisiae* la actividad antioxidante es principalmente media o alta (salvo para *A. magellanica* y *M. sativa* en el ensayo de *S. cerevisiae*). Por lo expuesto cabe pensar que los extractos aquí presentados, en general son buenos agentes para evitar la peroxidación lipídica, tanto del sistema micelar como de la membrana de la levadura. Por ello, algunas infusiones con baja capacidad para neutralizar directamente radicales libres en solución (o sea baja actividad antioxidante por el método del DPPH) podrían ser, contrariamente, buenos antioxidantes para proteger de la oxidación a las membranas lipídicas, esto ocurre por ejemplo para *A. boronioides* y *D. multifida*. Resultados similares, en cuanto al comportamiento comparativo de distintas infusiones en distintos ensayos de actividad antioxidante fue reportado por da Silva Port's *et al.* (2013) al trabajar con 9 infusiones de plantas del Amazonas.

### 3.3.2. Caracterización general de las infusiones, contenido de antioxidantes, compuestos fenólicos totales, ácidos hidroxicinámicos totales y flavonoides totales.

En la Tabla 3.1. se presentan los datos obtenidos para la caracterización general de las infusiones: contenido de antioxidantes, fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos totales y flavonoides totales. El enfoque presentado y sobre el que se centrará la discusión es principalmente nutricional, por ello los datos se muestran como el aporte de fitonutrientes que brindaría una taza de infusión (200 ml). Además, se presenta el valor de los parámetros para un gramo de material vegetal seco, acorde a una caracterización fitoquímica más clásica ([Gentile et al., 2016](#)).

**Tabla 3.1.** Caracterización general de las infusiones: contenido de antioxidantes, fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos totales y flavonoides totales.

Infusión	En 200 ml de infusión (una taza)				En un gramo de material vegetal seco			
	VCEAC (mg)	GAE (mg)	CAE (mg)	QE (mg)	VCEAC (mg)	GAE (mg)	CAE (mg)	QE (mg)
<i>A. boronioides</i>	27.6 ± 1.3 (i)	40.7 ± 0.6 (h)	9.1 ± 0.9 (fg)	24.3 ± 2.1 (g)	2.8 ± 0.3 (h)	4.1 ± 0.3 (i)	0.9 ± 0.1 (g)	2.5 ± 0.3 (h)
<i>A. australe</i>	145.7 ± 2.0 (e)	88.3 ± 1.2 (d)	61.4 ± 0.4 (b)	37.3 ± 1.2 (e)	13.8 ± 0.4 (d)	9.2 ± 0.4 (c)	6.1 ± 0.3 (b)	3.8 ± 0.4 (e)
<i>A. magellanica</i>	148.9 ± 2.7 (e)	78.8 ± 1.6 (e)	52.3 ± 1.2 (c)	29.0 ± 1.4 (f)	15.0 ± 0.5 (c)	7.9 ± 0.3 (e)	5.2 ± 0.4 (d)	2.9 ± 0.6 (g)
<i>B. globosa</i>	294.3 ± 1.6 (ab)	121.7 ± 2.5 (ab)	81.1 ± 2.0 (a)	31.7 ± 0.6 (f)	31.0 ± 1.2 (a)	12.2 ± 0.5 (a)	8.1 ± 0.9 (a)	3.2 ± 0.7 (f)
<i>D. andina</i>	303.7 ± 2.0 (a)	121.7 ± 3.8 (ab)	52.4 ± 1.3 (c)	67.0 ± 1.7 (a)	30.2 ± 2.7 (a)	12.2 ± 1.3 (a)	5.2 ± 0.8 (d)	6.7 ± 0.2 (a)
<i>D. multifida</i>	22.7 ± 1.5 (j)	28.3 ± 2.1 (i)	8.1 ± 0.7 (fg)	46.3 ± 4.9 (cd)	2.4 ± 0.1 (i)	3.1 ± 0.5 (j)	0.8 ± 0.3 (g)	4.5 ± 0.6 (c)
<i>G. astragalina</i>	40.8 ± 1.9 (h)	46.2 ± 1.9 (g)	7.2 ± 0.8 (g)	37.5 ± 2.2 (e)	4.1 ± 0.4 (g)	4.5 ± 0.7 (h)	0.7 ± 0.5 (g)	3.8 ± 0.1 (e)
<i>G. chilensis</i>	128.2 ± 1.6 (f)	80.8 ± 3.2 (e)	58.7 ± 1.3 (b)	15.9 ± 1.3 (h)	12.5 ± 0.8 (de)	8.2 ± 0.6 (d)	5.9 ± 0.3 (c)	1.6 ± 0.4 (i)
<i>M. sativa</i>	95.2 ± 2.0 (g)	52.4 ± 2.2 (f)	48.6 ± 1.1 (d)	5.2 ± 1.2 (i)	9.6 ± 0.2 (f)	5.2 ± 0.3 (g)	4.9 ± 0.4 (e)	0.5 ± 0.2 (j)
<i>S. chilensis</i>	156.5 ± 2.5 (d)	77.3 ± 2.1 (e)	15.4 ± 0.9 (e)	58.3 ± 2.1 (b)	15.5 ± 0.9 (c)	7.7 ± 0.2 (f)	1.5 ± 0.2 (f)	5.8 ± 0.3 (b)
Té Verde*	225.7 ± 3.2 (c)	108.0 ± 7.2 (bc)	62.1 ± 0.9 (b)	42.3 ± 2.1 (d)	22.2 ± 1.1 (b)	10.8 ± 0.4 (b)	6.2 ± 0.4 (b)	4.3 ± 0.5 (d)
Té Verde**	273.3 ± 25.2 (b)	135.7 ± 22.1 (a)	---	---	---	---	---	---

VCEAC: contenido de antioxidantes, equivalentes de vitamina C. GAE: fenoles totales, equivalentes de ácido gálico. CAE: ácidos hidroxicinámicos totales, equivalentes de ácido clorogénico. QE: flavonoides totales, equivalentes de quercetina. \* valor obtenido para té Verde (*Camelia sinensis*), se muestra con fines comparativos. \*\* valor de referencia para té Verde obtenido como promedio de bibliografía: [Deetae et al. \(2012\)](#), [Toit et al. \(2001\)](#), [Floegel et al. \(2011\)](#), [Morales de Souza et al. \(2008\)](#) y [Malgalhães et al. \(2006\)](#). Los valores se presentan ± ES. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre especies para cada método por test de ANOVA con  $\alpha < 0,05$  (test de Tukey). La letra "a" indica el valor más alto dentro de cada columna de forma independiente. "---" indica la ausencia de datos bibliográficos encontrados.

Respecto al contenido de antioxidantes expresado como equivalentes de ácido ascórbico (VCEAC) en 200 ml de infusión puede observarse que de las diez especies analizadas, *D. andina* y *B. globosa* mostraron los valores significativamente más altos para este parámetro, con un

contenido de antioxidantes equivalente a 300 mg de ácido ascórbico. Estos valores son superiores al del té verde. Los valores encontrados varían entre un máximo de 303.7 mg / 200 ml  $\pm$  2.0 (*D. andina*) y un mínimo de 22.7 mg / 200 ml  $\pm$  1.5 (*D. multifida*). El resto de las especies vegetales estudiadas quedan organizadas en el siguiente orden decreciente de contenido de antioxidantes: *S. chilensis* > *A. magellanica* = *A. australe* > *G. chiloensis* > *M. sativa* > *G. astragalina* > *A. boronioides*. En el trabajo de [Toit et al. \(2001\)](#) reportaron un contenido de antioxidantes equivalente a 200 mg de ácido ascórbico para 200 ml de té herbal de menta.

Para el contenido de fenoles totales expresado como equivalentes de ácido gálico (GAE) por cada 200 ml de infusión, nuevamente se destacan *D. andina* y *B. globosa* con los valores significativamente más altos del conjunto de plantas analizadas: 121,7 mg eq GAE/200 ml. El valor de contenido fenólico encontrado en estas dos especies es similar al máximo registrado por bibliografía para el té verde (135.7  $\pm$  22.1 GAE/200 ml) y al del té verde analizado en este ensayo espectrofotométrico (108.0  $\pm$  7.2 GAE/200 ml). El orden decreciente para las restantes infusiones evaluadas es: *A. australe* > *G. chiloensis* = *S. chilensis* = *A. magellanica* > *M. sativa* > *G. astragalina* > *A. boronioides* > *D. multifida*.

La evaluación de los ácidos hidroxycinámicos totales (CAE) permite aportar más información al análisis referido a los compuestos fenólicos, ya que representarían de forma general al grupo de los fenoles con solo un anillo aromático presentes en los extractos. En este caso, *B. globosa* exhibe el valor significativamente mayor entre las especies estudiadas (81.1  $\pm$  2.0 CAE / 200 ml). A este valor le siguen *A. australe* y *G. chiloensis*, que exhiben valores comparables al té verde. Las siete infusiones restantes quedan organizadas de la siguiente forma, en orden decreciente: *A. magellanica* = *D. andina* > *M. sativa* > *S. chilensis* > *A. boronioides* = *D. multifida* = *G. astragalina*.

En el contenido de flavonoides totales se destacan *D. andina*, con el valor significativamente más alto del grupo de especies estudiadas (67.0  $\pm$  1.7 QE/200 ml) y *S. chilensis* (58.3  $\pm$  2.1 QE/200 ml), ambas con valores superiores al té verde. Las plantas restantes, se presentan en orden decreciente en cuanto al contenido de flavonoides totales: *D. multifida* > *G. astragalina* = *A. australe* > *B. globosa* = *A. magellanica* > *A. boronioides* > *G. chiloensis* > *M. sativa*.

Las determinaciones realizadas son de utilidad para comparar el nivel de fitonutrientes que puede aportar una taza de las infusiones estudiadas con respecto a otras fuentes alimentarias. Por ejemplo, utilizando la base de datos Phenol Explorer ([Neveu et al., 2010](#)) se puede afirmar que 200 ml de infusión de *B. globosa* aportan a la dieta humana una cantidad de fenoles equivalente a la suministrada por 50 gramos frescos de frambuesas o por 56 ml de vino tinto.

La ingesta diaria recomendada de compuestos fenólicos está estimada en 1 gramo por día y dicha cantidad debe obtenerse a partir de numerosos alimentos (bebidas, hortalizas, frutas, legumbres, cereales) ([Gonzalez et al., 2017](#)). En base a estas afirmaciones y a los datos mostrados en esta sección, puede apreciarse como una taza de infusión de una planta nativa patagónica puede contribuir significativamente a la ingesta diaria de fitonutrientes fenólicos. Por ejemplo, solo una taza de *B. globosa* puede aportar un 12% de la ingesta diaria recomendada, *S. chilensis* un 7,7% y *A. boronioides* un 4%.

Algunas de las especies nativas analizadas y consumidas como infusión presentan similar o mayor actividad antioxidante, contenido de antioxidantes y contenido de fenoles totales que el té verde. Esto destaca la importancia de las infusiones analizadas como fuente dietaria de antioxidantes y compuestos fenólicos, en particular de las especies *B. globosa* y *D. andina* que destacan por sus altos valores, y también *S. chilensis* y *A. australe* que presentan valores interesantes y son dos de las que tienen mayor consumo popular.

Adicionalmente los resultados encontrados para las plantas nativas aquí analizadas son similares o superiores a otras reconocidas infusiones de amplio consumo actual e histórico, se pueden citar los siguientes contenidos de GAE / 200 ml de infusión para la manzanilla (54), la menta (80), la salvia (40), y el tomillo (75) (Detee *et al.*, 2012; Kogiannou *et al.*, 2013; Kaliora *et al.*, 2014).

Las especies *B. globosa* y *S. chilensis* ya han sido estudiadas anteriormente en cuanto a su actividad antioxidante y contenido de flavonoides; la primera por Backhouse *et al.* (2008 a y b) y la segunda por varios trabajos señalados en la revisión de Russo y Garbarino (2008). En ambos casos los análisis se basan en extractos orgánicos y compuestos aislados, ésta es la primera vez que se analizan las infusiones de estas especies, destacándose la alta actividad antioxidante de ambas y en particular el elevado contenido de flavonoides de *S. chilensis*. Todos los datos presentados para *D. andina* constituyen el primer reporte para la especie, que se destacó por la magnitud de los valores obtenidos en la mayoría de los parámetros, indicando la importancia de profundizar estudios sobre esta planta. Para el resto de las especies se determinó por primera vez el contenido de compuestos fenólicos en sus infusiones. En el siguiente capítulo se profundiza el análisis de la identidad química de los compuestos presentes en extractos acuosos.

### 3.4. CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo que determina el nivel de antioxidantes y compuestos fenólicos en infusiones de plantas nativas consumidas en la Patagonia. Varias de las especies analizadas mostraron altos niveles de antioxidantes y compuestos fenólicos, superiores a los de numerosas especies consumidas como infusión en otras partes del mundo, y en algunos casos incluso superiores al té verde.

Considerando en conjunto a los tres métodos utilizados, las infusiones de *B. globosa*, *D. andina* y *S. chilensis* son las que presentaron la mayor actividad antioxidante. En cuanto a los valores de fenoles totales *B. globosa* y *D. andina* fueron las especies que se destacaron. El contenido de ácidos hidroxycinámicos totales fue mayor para *B. globosa*. Por último *D. andina*, seguida de *S. chilensis*, fueron las especies con mayor contenido de flavonoides.

Los resultados obtenidos muestran la importancia y el potencial de algunas de las especies nativas patagónicas analizadas como fuente novedosa de antioxidantes y compuestos fenólicos dietarios.

## **CAPÍTULO 4.**

# **FITOQUÍMICA, IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS y VOLÁTILES**

## 4.1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 4.1.1. *Compuestos fenólicos*

Los compuestos fenólicos de las plantas constituyen un grupo heterogéneo con más de 10.000 moléculas descritas hasta el momento, por lo cual poseen una gran diversidad estructural y funcional. En el Capítulo 1 se mencionó que son moléculas químicamente definidas por poseer una estructura básica que consiste en al menos con un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo. En la Figura 4.1 se muestra una clasificación de los principales compuestos fenólicos basada en su estructura molecular; enmarcados en verde se resaltan los ácidos fenólicos, los ácidos cinámicos y los flavonoides, considerados los principales grupos de relevancia para el enfoque de este trabajo, ya que los mismos son los principales compuestos presentes en extractos acuosos vegetales y que pueden reportar actividad antioxidante y citotóxica de interés, y por ello de importancia en la salud humana ([Anantharaju et al., 2016](#)). Los principales tipos de flavonoides se presentan en la Figura 4.2.

El fenol simple se aisló en el año 1834 a partir del asfalto y su estructura se determinó en 1842 ([Hugo, 1978](#)). El descubrimiento de los compuestos fenólicos en las plantas se atribuye al premio nobel de fisiología y medicina (descubridor también de la vitamina C) Albert Szent-Györgyi, cuando en 1930 aisló el flavonoide rutina de la cáscara de limón y lo llamó inicialmente vitamina P ([Quiñones y Alexandre, 2012](#); [Nobel Media, 2018](#)).

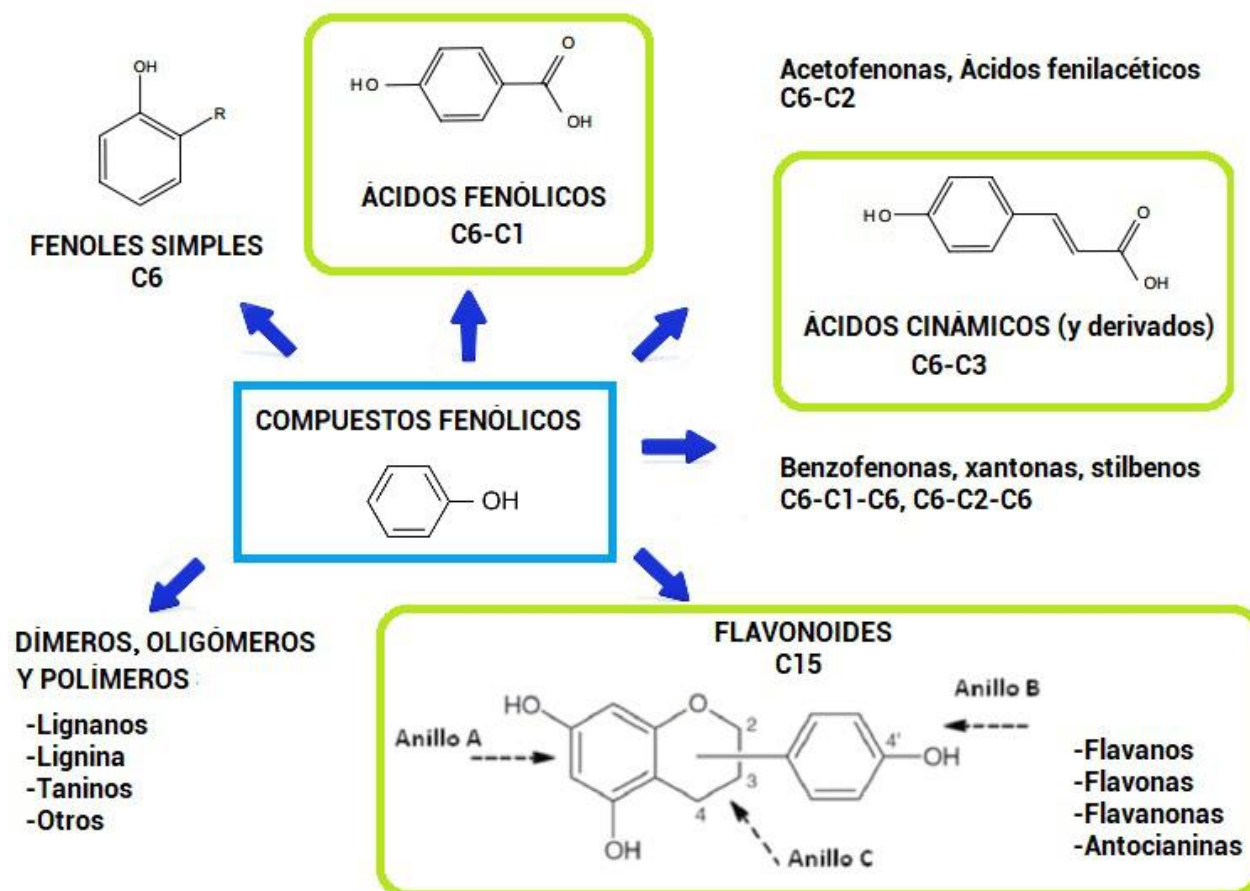
Se calcula que el 40 % del carbono orgánico del planeta existe en forma de fenoles. En las plantas la mayoría de estos compuestos son constituyentes de las paredes celulares en forma de lignina ([Cseke y Kaufman, 2006](#)). Se ha señalado la importancia de los compuestos fenólicos para la taxonomía vegetal, principalmente se reportó la imposibilidad de formar algunos intermediarios fenólicos por parte de algunas familias botánicas ([Bate-Smith, 1962](#)), aunque este enfoque no está en vigencia actualmente.

Estas moléculas son muy importantes en la interacción de una planta con su entorno. Se ha reportado en detalle su rol en la alelopatía ([Li et al., 2010](#)). Los compuestos fenólicos producidos por una especie pueden influir en el crecimiento de otra especie a través de diversos mecanismos tales como I) producir cambios en la permeabilidad de la membrana y absorción de nutrientes, II) inhibir la división celular y elongación de tejidos y III) generar efectos sobre la función y actividad de numerosas enzimas.

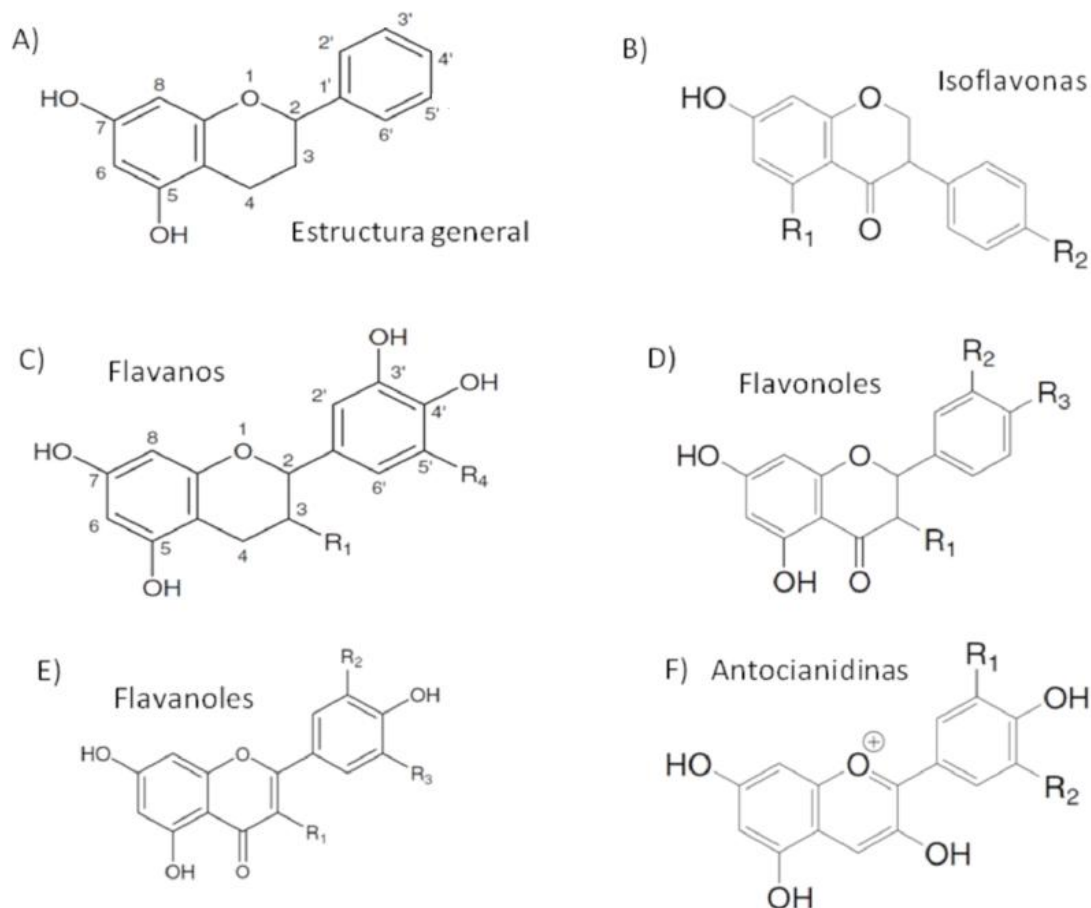
Otro aspecto interesante es que pueden ser atrayentes o repelentes de insectos. Se les atribuye un rol importante en la defensa del vegetal frente a insectos y hongos patógenos ([Lattanzio et al., 2006](#)). Algunos de estos compuestos también actúan como moléculas de señalización que regulan el proceso de simbiosis entre algunas especies vegetales y microorganismos ([Mandal et al., 2010](#)). Por otro lado, dan color y sabor a flores y frutos ([Cseke y Kaufman, 2006](#)).

En los cloroplastos, además de poseer un rol como antioxidante activos, estos compuestos actúan como filtros de defensa contra la luz UV. Recientemente se ha señalado el aumento de la concentración de determinados grupos de compuestos fenólicos (y también terpenos) en función

de la longitud de onda predominante en la luz que recibe la hoja; particularmente para luz con longitud de onda de entre los 400 y 500 nm aumenta la concentración de más de 30 compuestos (Holopainen *et al.*, 2017).

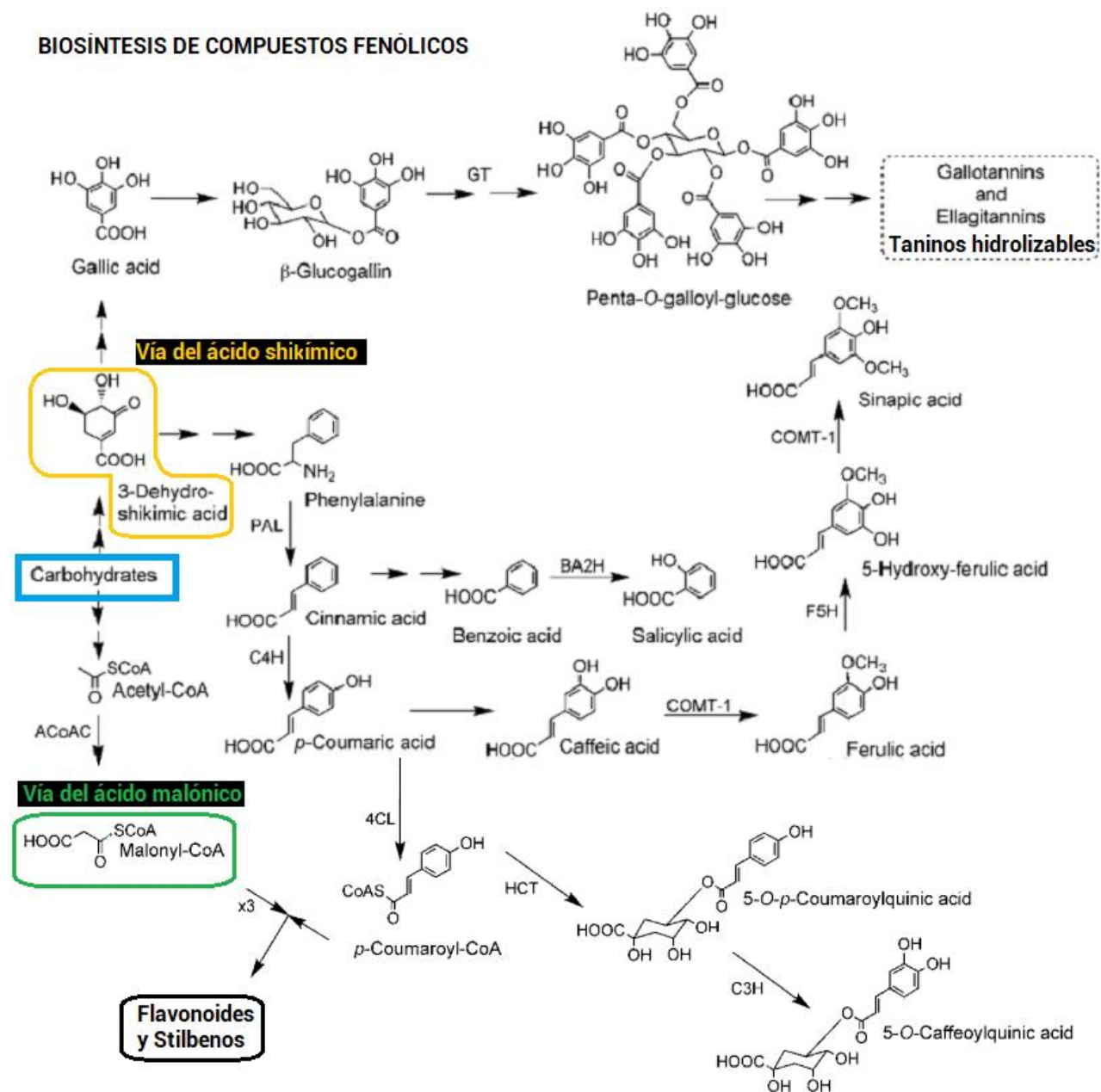


**Figura 4.1.** Clasificación de los compuestos fenólicos según sus estructuras, elaborada en base a Vermerris y Nicholson (2006). En verde se indican los principales grupos de importancia para este trabajo. Los flavonoides presentan el esqueleto característico con tres anillos A-B-C, los carbonos se numeran arbitrariamente, el anillo B puede unirse al C en la posición 2 ó 3. Distintas sustituciones en los diferentes carbonos de los anillos dan lugar a los diversos grupos de flavonoides.



**Figura 4.2.** Clasificación de los principales esqueletos de los flavonoides (en base a [Vermeris y Nicholson, 2006](#); [Fraga, 2010](#)). Distintas sustituciones en los carbonos dan lugar a la diversidad de estos compuestos. En general en el grupo -OH del carbono número 3 pueden unirse distintos tipos de azúcares dando lugar a los flavonoides glicosidos.

La gran diversidad estructural y funcional de estas moléculas vegetales es producto de un metabolismo complejo. En el Capítulo 1 se presentó esquema general del metabolismo vegetal. En la Figura 4.3 se presenta con mayor detalle la biosíntesis de los compuestos fenólicos. La biosíntesis de los polifenoles como productos del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico (también conocida como ruta de los policétidos o de los poliacetatos). La ruta del ácido shikímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina) y de los ácidos cinámicos y sus derivados. La ruta del ácido malónico proporciona malonil coenzima A, un importante precursor, necesario para la biosíntesis de flavonoides y otros compuestos fenólicos complejos.



**Figura 4.3.** Esquema simplificado de la compleja biosíntesis de compuestos fenólicos, adaptada de [Fraga \(2010\)](#). En naranja se resalta el ácido 3-dehidroshikímico, metabolito a partir del cual se sintetizan la mayoría de los ácidos fenólicos y los ácidos cinámicos. En verde se resalta el malonil coenzima A, metabolito importante en la ruta del ácido malónico, a partir del cual se sintetizan los flavonoides (al unirse la vía del ácido shikímico y la vía del ácido malónico).

La ruta del ácido shikímico es dependiente de la luz, se inicia en los cloroplastos por condensación de dos productos de la fotosíntesis, la eritrosa-4-fostato y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis. Tras numerosas modificaciones, se obtiene el ácido shikímico, del que derivan directamente algunos fenoles, como por ejemplo el ácido gálico. Al ácido shikímico puede adicionarse una segunda molécula de fosfoenolpiruvato dando lugar a la fenilalanina, un aminoácido esencial propio del metabolismo primario de las plantas. Luego de modificaciones en la fenilalanina (eliminación de un grupo amonio, incorporación de un grupo hidroxilo) se llega al ácido p-cumárico y al p-cumaroyl coenzima A, que es el precursor activo de la biosíntesis de mayoría de los fenoles de origen vegetal.

La ruta del ácido malónico comienza a partir de una molécula inicial de acetil coenzima A que da lugar a malonil coenzima A. A través de procesos de descarboxilación y condensación se originan los policétidos, los cuales son bloques de construcción de un amplio rango de productos naturales. En el caso de la biosíntesis de los compuestos fenólicos, los productos de esta ruta se combinan en una ruta mixta con precursores de la vía del ácido shikímico, dando lugar a un elevado número de moléculas, principalmente flavonoides (Figura 4.3).

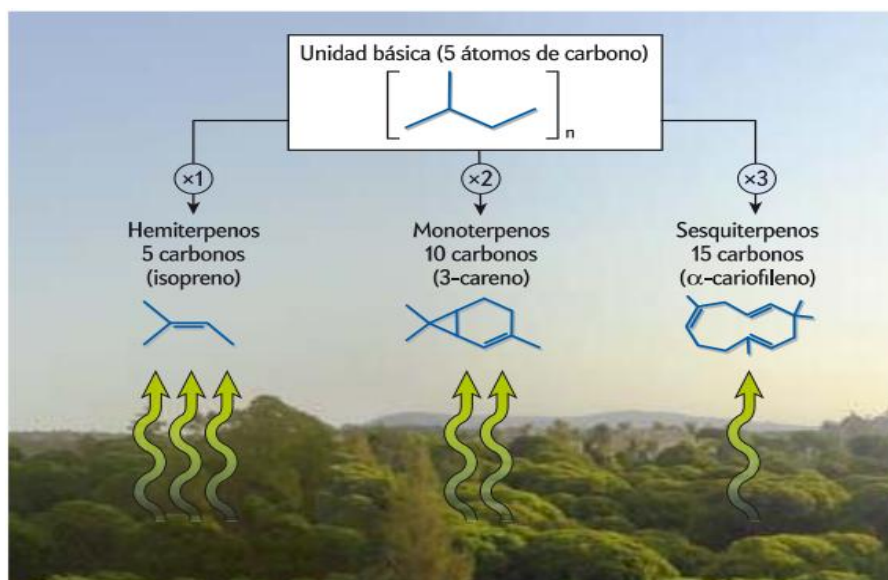
Una función importante para las plantas es la participación de los fenoles como filtros de la radiación ultravioleta, debido a los dobles enlaces presentes en los anillos aromáticos pueden absorber la luz UV que llega a los tejidos vegetales. Cada molécula tiene un espectro de absorción característico. Los ácidos fenólicos absorben típicamente alrededor de 320-330 nm; por su parte los flavonoides suelen presentar dos bandas de absorción típicas, la de mayor absorción (conocida como Banda I) ocurre entre los 310 y 380 nm y la de menor absorción (conocida como Banda II) ocurre entre los 230 y 280 nm (Mabry *et al.*, 1970).

En el caso particular de los flavonoides, pueden observarse corrimientos típicos en sus espectros de absorción al reaccionar con reactivos específicos como metóxido de sodio, acetato de sodio, tricloruro de aluminio, ácido clorhídrico y ácido bórico (Mabry *et al.*, 1970). En la capacidad de los flavonoides para interactuar con el espectro de luz UV-vis se fundamenta su visualización con luz UV a 365 nm en sistemas cromatográficos (Wagner y Baltd, 2001), su cuantificación por métodos espectrofotométricos y la identificación en base al espectro UV-Vis completo (Mabry *et al.*, 1970; Andersen y Markham, 2006). Actualmente los principales métodos para identificar compuestos fenólicos se basan en técnicas de cromatografía en capa delgada, espectros UV/Vis característicos, cromatografía líquida de alta presión y resonancia magnética nuclear (RMN) en el caso de compuestos puros. La identificación de estos compuestos en un extracto analiza combinando el tiempo de retención, la máxima absorción del espectro UV-vis y los fragmentos del espectro de masa como el ion molecular ( $m/z$ ) (Andersen y Markham, 2006; Vermerris y Nicholson, 2006; Kaliora *et al.*, 2014).

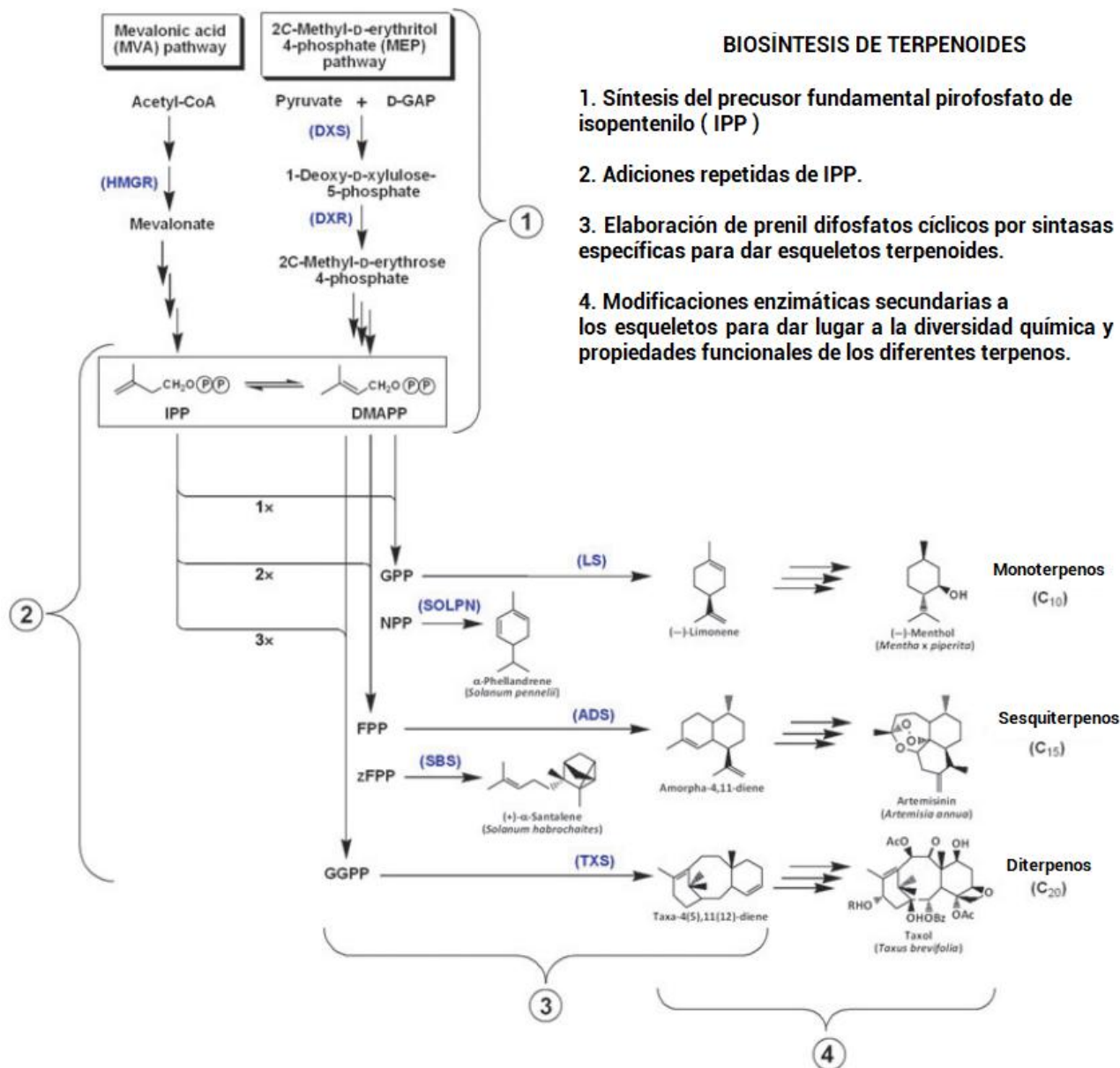
Hasta el momento no existen registros de los compuestos fenólicos presentes en las infusiones de las plantas seleccionadas en este trabajo.

#### 4.1.2. Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles que producen las plantas aromáticas pertenecen, en su gran mayoría, al grupo químico de los terpenoides, siendo principalmente hemiterpenoides, mono y sesquiterpenoides (Figura 4.4) (Maffei, 2010; Omeño y Fernandez, 2012). Los terpenoides, a veces mal llamados terpenos de forma indistinta, son compuestos que derivan del pirofosfato de isopentenilo (IPP) y pueden contener oxígeno en su estructura, por ello químicamente pueden ser alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y cetonas (Dewick, 2009; Omeño y Fernandez, 2012). En la Figura 4.5 se muestran de forma simplificada la biosíntesis de este complejo grupo de compuestos volátiles y sus principales etapas: síntesis de IPP, adiciones repetidas de IPP, modificaciones por sintasas específicas y modificaciones por enzimas secundarias.

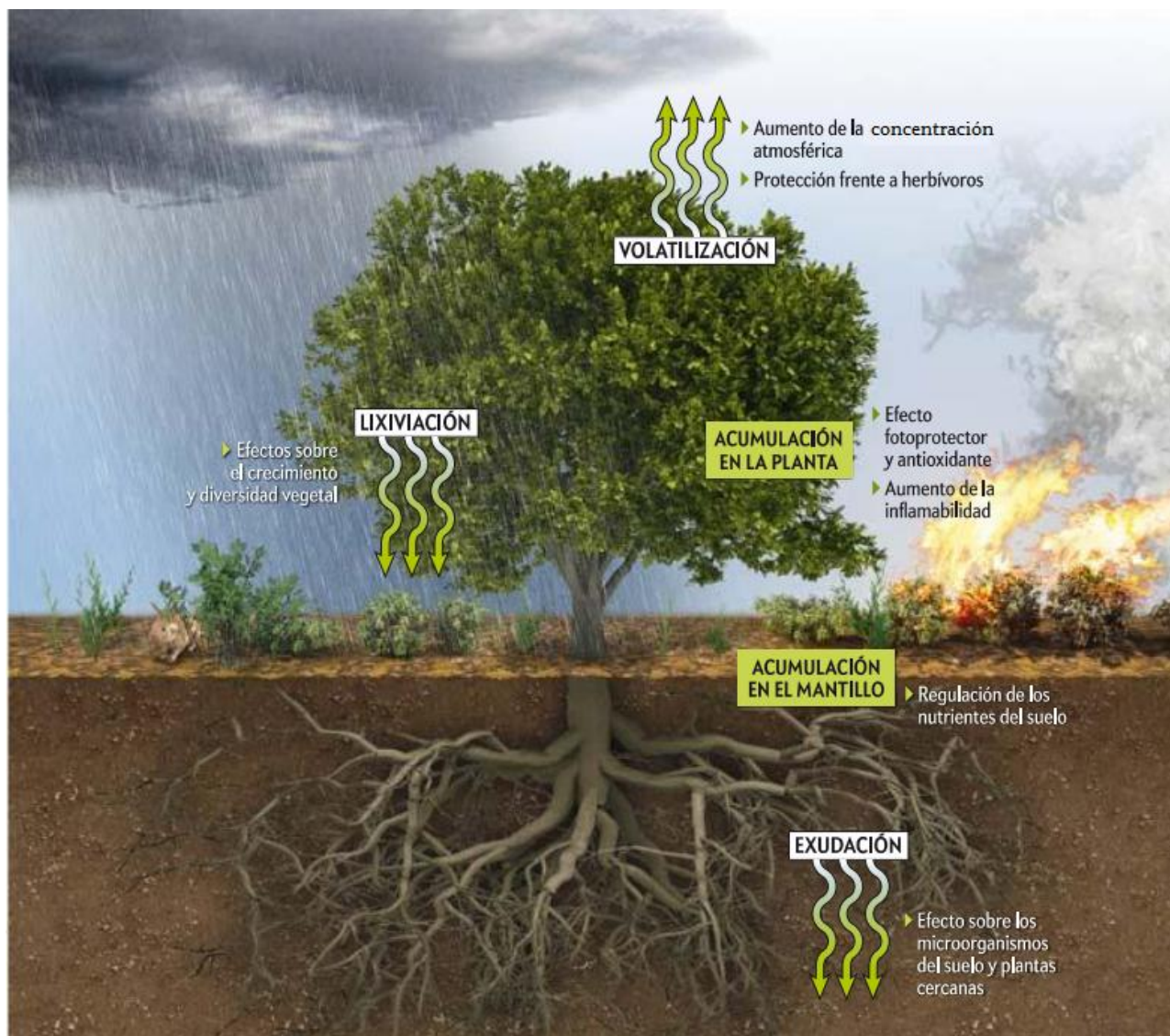


**Figura 4.4.** Principales clases de terpenos volátiles producidos por las plantas, hemiterpenos, mono y sesquiterpenos, mayor cantidad de flechas indican mayor volatilidad (adaptada de Omeño y Fernandez, 2012).



**Figura 4.5.** Biosíntesis simplificada de terpenoides a partir del precursor fundamental pirofosfato de isopentenilo (IPP) (adaptada de Lange y Ahkamy, 2013).

La variedad de estructuras químicas que pueden presentar los terpenoides volátiles es muy alta, por ello comprender su función en las plantas ha sido una tarea ardua para la ciencia. La función ecológica de protección frente a herbívoros es la que presenta mayor consenso. Se los considera responsables de otras interacciones ecológicas muy importantes para determinadas especies vegetales, como por ejemplo inhibir el crecimiento de otras plantas (alelopatía), regular del ciclo de nutrientes y el crecimiento de microorganismos en el suelo, proteger frente a la luz y la sequía, o producir un aumento de la inflamabilidad del follaje, generando mayor probabilidad de incendios (Figura 4.5).



**Figura 4.6.** Principales funciones e interacciones ecológicas de importancia para los compuestos volátiles de las plantas (adaptada de [Omeño y Fernandez, 2012](#)).

Debido a su diversidad química y funcional, estos compuestos volátiles tienen diversos usos y aplicaciones potenciales como son la obtención de principios activos para la industria farmacéutica, la utilización como aromatizantes y conservantes de alimentos, y el uso en la elaboración de perfumes y productos para la piel ([Bandoni, 2003](#); [Christaki et al., 2012](#); [Luengo, 2004](#)). Los usos y aplicaciones son atribuibles tanto a compuestos aislados como a las mezclas, denominadas aceites esenciales ([Bandoni, 2009](#); [Ayaz et al., 2017](#)).

#### 4.1.3. Otros metabolitos secundarios potencialmente bioactivos: lactonas sesquiterpénicas, diterpenos y cumarinas.

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un gran grupo de metabolitos secundarios fuertemente amargos, que están ampliamente diversificados en la familia Asteraceae y en la cual se conocen más de 7.500 tipos (Padilla-González *et al.*, 2016). Sus funciones en las plantas son variadas, incluyen el rol de protección ante herbívoros, el actuar como sustancias antimicrobianas o inhibidoras del crecimiento de las plantas competidoras. Debido a su toxicidad inespecífica, se encuentran compartimentalizadas principalmente en los tricomas glandulares de las partes aéreas. La industria farmacéutica ha motorizado la búsqueda de metabolitos novedosos de este tipo debido a que poseen actividad citotóxica, antimalárica y anticáncer (Matejic *et al.*, 2010). La artemisina (aislada de *Artemisia annua*) es un ejemplo icónico de lactona sesquiterpénica con uso farmacológico y médico, su descubrimiento, aislamiento y utilización como agente antimalárico fue tan relevante para la salud humana que le valió el premio nobel de fisiología y medicina en 2015 a la Dra. Youyou Tu de nacionalidad China (Bora y Sharma, 2011; Novel Media 2018b). Estos compuestos suelen identificarse por espectroscopía infrarroja (IR). Una de las grandes ventajas de esta técnica es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquido, solución, pasta, polvo, fibra, film o gas. El efecto observado en los espectros de líquidos y sólidos es la aparición de bandas anchas en el intervalo de frecuencias permitido por el equipo. En un espectro típico se representa el % T (transmitancia) frente al número de ondas expresado en  $\text{cm}^{-1}$  ( $1/\lambda$  que es proporcional a la frecuencia  $\nu$  y por tanto a la energía  $E = h\nu$ ) y se observan absorciones de distinta intensidad en el intervalo en estudio.

Los diterpenos son terpenoides de 20 carbonos, no volátiles debido a su alto peso molecular. En las plantas tienen relevancia fisiológica; por ejemplo el diterpeno fitol es parte de la molécula de clorofila. Además, un grupo de hormonas muy importantes, las giberelinas, son diterpenos (Yamaguchi, 2008). Adicionalmente constituyen las resinas de las coníferas y otras especies aromáticas. Algunos representantes de este grupo de moléculas son farmacológicamente importantes, por ejemplo el taxol, un diterpeno de estructura compleja aislado del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*), que presenta poderosa actividad antitumoral y es utilizado actualmente para el tratamiento de algunos tipo de cánceres. En particular los diterpenos del tipo labdano reportan actividades biológicas como antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoarios, antiinflamatorios y protectores gástricos-antiulcerosos (Banerje *et al.*, 2008).

Las cumarinas son compuestos con un esqueleto básico 1,2-benzopirona que derivan biosintéticamente de la ruta del ácido shikímico en las plantas. De acuerdo a este origen biosintético muchas veces se las considera un grupo particular de compuestos fenólicos, aunque esta inclusión es incorrecta desde el punto de vista de la evaluación rigurosa de su estructura

química. En las plantas pueden estar en forma libre o como glicósidos, pueden ser cumarinas simples o complejas. También son sintetizadas por otros organismos como hongos y bacterias. La capacidad de ejercer interacciones no covalentes con muchas enzimas y receptores en organismos vivos hace que las cumarinas exhiban una amplia gama de actividades y aplicaciones biológicas (Pereira *et al.*, 2018). Entre los usos biomédicos, han sido utilizadas como agentes anticoagulantes, anticáncerígenos, antioxidantes, antivirales, antidiabéticos, antiinflamatorios, antibacterianos, antimicóticos y antineurodegenerativos. En el caso particular de cáncer, en los últimos años se ha incrementado la búsqueda de nuevas cumarinas de síntesis (Sairam *et al.*, 2016).

En este capítulo se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

(c) determinar la identidad química de los principales compuestos fenólicos presentes en las infusiones.

(d) determinar la identidad química de los componentes volátiles mayoritarios presentes en los aceites esenciales de las especies aromáticas.

(e) analizar la presencia de otros metabolitos secundarios potencialmente bioactivos: lactonas sesquiterpénicas, diterpenos y cumarinas.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los análisis y determinaciones presentados en esta sección se realizaron sobre muestras compuestas de cada especie vegetal, obtenida a partir de 7 individuos al azar. Las muestras compuestas fueron hojas y tallos (parte aérea) en todos los casos.

### 4.2.1. *Compuestos fenólicos*

La identificación de los principales compuestos presentes en las infusiones se realizó a través del análisis integrado de técnicas de cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía líquida con detector de díodos (HPLC-DAD) y cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (HPLC-ESI-MS). Inicialmente se elaboró una imagen fotográfica de una TLC que incluía todas las infusiones analizadas, en la que se visualizaron claramente los principales compuestos fenólicos en cada una de las muestras (Figura 4.7). A continuación se elaboró la Figura 4.8 en la que se muestran los resultados de HPLC-DAD para los patrones disponibles de 1-ácido clorogénico, 2-ácido cafeico, 3-rutina. Seguidamente, en las Figuras 4.9 a 4.18 se integraron los resultados obtenidos por TLC y HPLC-DAD, presentando además las estructuras correspondientes a los principales compuestos detectados para cada una de las infusiones analizadas. Las moléculas fueron representadas en base a PubChem (2018) y Chemspider (2018). En los cromatogramas a 280nm, se asignó un número a cada compuesto que coincidió en su tiempo de retención con algún patrón utilizado en este sistema. Finalmente se elaboró la Tabla 4.1, que resumió los resultados obtenidos para el análisis de HPLC-ESI-MS; con esta técnica de gran sensibilidad (Simirgotis *et al.* 2012; Schmeda-Hirschman *et al.* 2015), se buscó confirmar la

presencia de los compuesto mayoritarios detectados previamente por TLC y HPLC-DAD, además de indagar acerca de otras moléculas que pudieran estar presentes en menor concentración.

Cabe aclarar que el sistema cromatográfico de TLC utilizado tiene un límite de detección de  $\approx 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , mientras que la detección por HPLC-DAD a 280 nm es mucho más sensible ya que tiene un límite menor, entre 0,001 y 0,005  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (ó ppm). Por esta razón en el cromatograma a 280 nm pueden aparecer una mayor cantidad de picos que los compuestos visualizados como manchas puntuales en TLC. Otra razón adicional sería que la lectura a 280 nm tiene un rango de detección de moléculas más amplio que la visualización obtenida a 365 nm por cromatografía en capa delgada (Andersen y Markham, 2006). Finalmente la detección por HPLC-ESI-MS brinda un límite aún menor al obtenido por HPLC-DAD, el cual se encuentra por debajo de 1 ppm (o 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### *Análisis por cromatografía en placa delgada TLC*

Se utilizaron placas de silica gel (Merck) 60 F<sub>254</sub> de 20 x 10 cm. En cada placa se sembró una muestra compuesta de cada especie y una muestra con patrones puros de ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetina y rutina (Sigma). De esta manera, cada placa tiene 11 columnas de corrida, cada una corresponde a una especie analizada y la columna de la derecha a los compuestos puros patrones. El análisis en placa se repitió 5 veces (con muestras compuestas distintas), debido a la obtención de perfiles de compuestos fenólicos idénticos entre las distintas placas se eligió mostrar solo una imagen representativa de una de las placas en la sección 4.3. Resultados y Discusión (Figura 4.7).

Con una micropipeta se sembraron 5  $\mu\text{l}$  de cada una de las infusiones a 1 cm del borde inferior de la placa (línea de siembra). Las placas se colocaron en una cuba cromatográfica que contenía la mezcla del solvente de corrida: acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético glacial/agua (100:11:11:26). Las placas se retiraron de la cuba cuando el solvente estaba a 0,5 centímetros del borde superior, se dejaron secar por 5 min bajo campana. Luego se procedió al revelado físico-químico de acuerdo a Wagner y Blatd (2001), se roció la placa con una solución metanólica al 1% del reactivo 2-Aminoetil difenilborinato (reactivo natural products, NP), se dejó secar el solvente por 5 min y luego se roció con una solución etanólica al 10% de polietilenglicol (PEG), se dejó secar la placa por 5 min adicionales. Las manchas correspondientes a los distintos compuestos fenólicos se visualizaron finalmente a luz UV-365 nm. Los ácidos fenólicos se visualizaron en color celeste azulado y los flavonoides en colores naranjas y verdes típicos. En este sistema de detección el color está sumamente ligado al tipo de compuesto fenólico (ácido fenólico o flavonoide) (Wagner y Blatd, 2001). Al visualizar el compuesto se midió la distancia recorrida por el solvente (frente de corrida) desde la base de la placa (línea de siembra) y la distancia recorrida por el compuesto; de esta forma se procedió a calcular el parámetro “relación de frentes” (Rf), característico de cada compuesto y que actúa como criterio de identificación (Wagner y Blatd, 2001). Además como control y como criterio de indentificación se realizó una corrida de patrones puros obtenidos de Sigma: ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetina y rutina.

### Análisis por HPLC-DAD

En una etapa posterior de trabajo, se realizaron análisis por cromatografía líquida de alta presión en instalaciones del Instituto Nacional de Química del Noroeste Argentino (INQUINOA), Tucumán, junto al Co-Director, durante una estadía de investigación en los meses de Mayo y Junio del año 2017. Se trabajó con muestras compuestas, debido limitaciones de tiempo durante la estadía y de acceso al cromatógrafo se corrieron tres muestras compuestas para cada una de las especies, obteniendo perfiles similares, razón por la cual se presenta un único perfil cromatográfico correspondientes a los compuestos detectados para cada especie estudiada en la sección 4.3. Resultados y Discusión.

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta presión con detector de diodos (HPLC-DAD). Se analizaron los liofilizados de las infusiones y se corrieron paralelamente los compuestos puros disponibles. Se utilizaron ácido clorogénico, ácido cafeico, y rutina como patrones puros (Sigma), diluidos en metanol absoluto a 100 p.p.m. Los liofilizados se resuspendieron en solución acuosa a 5 mg/ml (en concordancia con el criterio de [Schmeda-Hirschman et al., 2015](#)). Se inyectó 20 µl de solución de cada una de las muestras y de los patrones puros en un equipo Shimadzu UFLC, modelo Prominence con detector de arreglo de diodos SPD-M20A, módulo de bomba: LC20AT, autosampler: SIL-20A. En el equipo se utilizó una columna de fase reversa C18 con un tamaño de partícula de 5 micrones, de 4.6 mm de diámetro x 250 mm de largo. El volumen de inyección fue de 20 µl. Se realizó una corrida para cada una de las muestras y la solución de patrones estándares con el detector de diodos configurado a 280 nm. La corrida se realizó a 25 °C y se utilizó un gradiente lineal con dos solventes, solvente A (solución al 2% de ácido acético en agua), solvente B (Metanol):

Tabla 4.1. Protocolo de corrida cromatografía en gradiente con dos solventes.

Tiempo	A (agua con 2% de ác. acético)	B (metanol)
0 a 30 min	85 a 60 %	15 a 40 %
30 a 40 min	60 a 25 %	40 a 75 %
40 a 45 min	5 a 15 %	75 a 85 %
45 a 60 min	15%	85%

### Análisis por HPLC-ESI-MS

Como análisis adicional se enviaron dos muestras compuestas de cada especie en dos ocasiones distintas a la empresa INMET S. A. (Rosario, Argentina). Se optó por esta opción ya que en el país existen pocos equipos de HPLC acoplados a espectrómetros de masa que sean de fácil acceso (en cuanto a tiempo y costos). Los dos cromatogramas obtenidos para las dos muestras compuestas de cada especie no presentaron diferencias apreciables entre sí; adicionalmente los resultados obtenidos fueron similares al análisis HPLC-DAD previo. Por estas razones se presenta el resultado más relevante de este análisis que consiste en la detección del

ión molecular (m/z) correspondiente a cada compuesto, el mismo hace referencia a la masa molecular de los compuestos detectados, estos resultados se presentan en la Tabla 4.2 (sección 4.3. Resultados y Discusión).

Las condiciones cromatográficas fueron similares a las utilizadas en el análisis anterior de HPLC-DAD, los liofilizados de las muestras se analizaron en un cromatógrafo líquido de alta presión con un detector UV/Vis de cuatro longitudes de onda (254, 280, 330 y 365 nm) acoplado a un detector de masas. El equipo utilizado para esta ocasión fue el modelo Ultimate 3000 RSLC Dionex model de Thermo Scientific, que cuenta con un detector UV-vis VWD-3400RS y está acoplado a un detector de masas TSQ Quantum Access Max. Se utilizó una columna C18 Hypersil-GOLD de 50 x 2.1 mm, con un tamaño de partícula de 1.9  $\mu\text{m}$ . El protocolo de corrida se realizó a 25 °C, con un flujo de solventes de 0.20 ml/min durante 63 min. Se utilizó el mismo el mismo gradiente lineal de dos solventes indicado en el análisis anterior. Dada las características de este equipo el análisis fue monitoreado a 254, 280, 330 y 365 nm. Se utilizó el modo ESI positivo con un temperatura de sonda de 360°C, a un voltaje de 4.5 kV en concordancia con el protocolo utilizado por [Schmeda-Hirschman et al.\(2015\)](#).

#### 4.2.2. Compuestos volátiles

##### *Extracción*

La fracción volátil de cada muestra compuesta fue obtenida por hidrodestilación, a partir del material vegetal oreado por 48 horas, durante al menos 5 horas, con trampa tipo Clevenger, como la descrita en la [Farmacopea Argentina 7° Ed. \(2003\)](#).

Para cada especie de destilaron y analizaron tres muestras compuestas.

##### *Análisis por TLC*

Se utilizaron placas de silica gel (Merck) 60 F<sub>254</sub> de 20 x 10 cm. Con un capilar se sembraron las muestras de aceites esenciales a 1 cm del borde inferior de la placa (línea de siembra). Las placas se colocaron en una cuba cromatográfica que contenía como solvente de corrida Tolueno/Acetato de Etilo (93:7). Las placas se retiraron de la cuba cuando el solvente estaba a 0,5 centímetros del borde superior, se dejaron secar por 5 min en campana. Luego se procedió al revelado químico de acuerdo a [Wagner y Blatd \(2001\)](#), rociando la placa con una solución de vainillina al 1% en etanol, que se dejó secar por 5 min y luego se roció con una solución etanólica al 10% de ácido sulfúrico; se dejó secar por 5 min, seguidamente la placa se llevó a estufa a 110 °C por 1 minuto. Las manchas correspondientes a los distintos compuestos se visualizaron con luz visible y se calculó el parámetro R<sub>f</sub>. El análisis se repitió tres veces y se eligió una placa representativa para mostrar en la sección 4.3. Resultados y Discusión.

##### *Análisis por CG-FID-MS*

Los aceites esenciales se analizaron por CG-FID-MS, utilizando un equipo Perkin Elmer GC modelo Clarus 500 con una configuración especial. El mismo está provisto de un muestreador

automático Autosampler conectado a un único inyector tipo split (relación de split: 1:100) conectado mediante un divisor de flujos a dos columnas capilares de sílice fundido: a) polietilenglicol de PM aprox. 20.000 y b) 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano, ambas de 60 m x 0,25 mm de diámetro y 25 µm de espesor de fase estacionaria. La columna polar está conectada a un detector FID mientras que la columna no polar está conectada a un detector FID y a un detector de masas cuadrupolar (70 eV), a través de un sistema de venteo (MSVent™). Fase móvil: Helio a 1,87 ml/min. La cantidad inyectada de cada aceite esencial fue de: 0,2 µl de una dilución al 10% en etanol. El programa de temperaturas utilizado fue: 90 °C, luego a 3 °C/min hasta los 225 °C (15 min). Temperaturas del inyector y ambos detectores FID: 255 °C y 275 °C, respectivamente. La temperatura de la línea de transferencia fue de 180 °C. La temperatura de la fuente de iones fue de 150 °C. El rango de masas escaneado fue de 40-300 m/z. La configuración del equipamiento utilizado permite obtener a partir de una única inyección de la muestra los siguientes datos: a) índices de retención de los compuestos calculados con una serie homóloga de alcanos (C6 a C24) en la columna polar y en la columna no polar; b) espectros de masas de cada uno de los compuestos separados en la columna no polar. La identificación de cada uno de los compuestos se realizó por comparación de los índices de retención obtenidos en las dos columnas de distinta polaridad, con los que se obtuvieron a partir de muestras auténticas o con los que figuran en bibliografía, junto a la comparación de los espectros de masa obtenidos con los que figuran en bases de datos propias y comerciales ([Adams, 2007](#); [Willey, 2008](#)).

#### 4.2.3. Otros metabolitos secundarios potencialmente bioactivos

Estos ensayos también se realizaron en instalaciones del Instituto Nacional de Química del Noroeste Argentino (INQUINOA), Tucumán, junto al Co-Director, durante una estadía de investigación en los meses de Mayo y Junio del año 2017. Se trabajó con muestras compuestas de hojas y tallos (parte aérea) y los análisis se repitieron tres veces.

##### *Extractos orgánicos*

Para investigar cumarinas se realizaron extractos orgánicos al 10 % en etanol, metanol y diclorometano de partes áreas de las plantas (hojas y tallos). En el caso particular de la especie perteneciente a la familia Apiaceae (*A. australe*) se analizaron además muestras de las raíces, ya que en raíces de otras especies de la familia está reportada la presencia de furanocumarinas ([Trumble et al., 1990](#)).

Para investigar diterpenos y lactonas sesquiterpénicas se realizaron extractos orgánicos al 10 % en diclorometano, un solvente que extrae compuestos de polaridad baja y media.

##### *Análisis por espectroscopia infraroja (IR) para Lactonas sesquiterpénicas*

Este análisis se realizó únicamente para las especies pertenecientes a las familias Asteraceae y Apiaceae (*Apium australe*, *Artemisia magellanica*, *Drimys andina*, *Grindelia*

*Chiloensis* y *Solidago chilensis*), típicamente productoras de este tipo de compuestos (Da Costa et al., 2005). Se analizaron los extractos de diclorometano por espectroscopia de infrarrojos (IR). Los extractos se resuspendieron en diclorometano y se colocó una gota entre las ventanas de una celda desmontable de cloruro de sodio (NaCl), con un camino óptico de 0,1 mm, durante 5 min. Se registraron los espectros IR con un espectrofotómetro Perkin Elmer 1600 Spectrum GX.

De esta forma se obtuvieron los espectros en los que se busca visualizar la banda típica que producen las lactonas sesquiterpénicas, debida a la absorción característica entre 1750-1800 cm<sup>-1</sup> que produce el grupo carbonilo. Los espectros obtenidos se analizaron detalladamente con el Software Speakwin32

#### *Análisis por TLC para Diterpenos y Cumarinas*

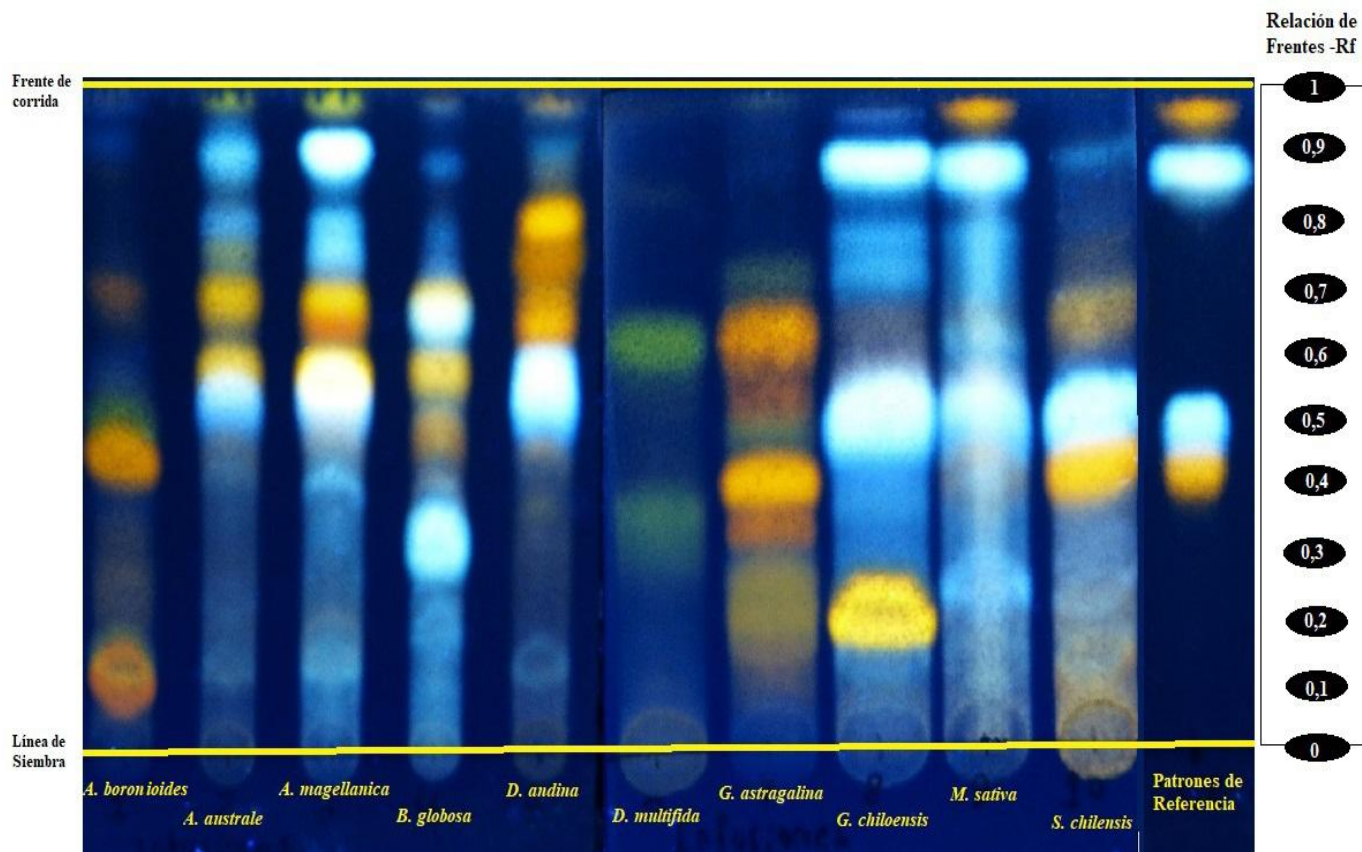
Para la detección de Diterpenos el proceso cromatográfico se realizó con hexano/acetato de etilo (5:1) como solvente de corrida. Se utilizó colesterol como referencia polar en la placa. En general, en el sistema utilizado y debido a su polaridad, los diterpenoides tienen R<sub>f</sub> similar o menor que al colesterol. Se reveló químicamente con una solución etanólica al 10% de ácido sulfúrico con posterior calentamiento en estufa a 110 °C por un minuto (Wagner y Bladt, 2001).

Para detectar cumarinas glicosiladas se realizó una corrida cromatográfica con el sistema acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético glacial/agua (100:11:11:26); para detectar cumarinas agliconas se utilizó el sistema de corrida tolueno/éter (1:1, saturada al 10 % con ácido acético). Ambos sistemas se visualizaron con luz UV 254, UV 365. Además se revelaron con NP-PEG y con KOH al 10% (Wagner y Bladt, 2001). Las cumarinas producen una fluorescencia azul intensa típica en la placa cromatográfica. Se utilizó como control positivo un extracto de *Fabiana imbricata* que contiene la cumarina escopoletina.

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.3.1. *Compuestos fenólicos*

El sistema cromatográfico de TLC empleado permitió separar, detectar y visualizar los principales compuestos fenólicos presentes en las infusiones de cada una de las especies analizadas. La relación de frentes (R<sub>f</sub>) y los colores observados para los patrones de referencia coincidieron con la bibliografía (Wagner y Bladt, 2001; Garrido et al., 2013), lo que avala la utilización de este sistema cromatográfico y confirma su reproducibilidad. La Figura 4.7 muestra la cromatografía en capa delgada, donde las manchas celestes corresponden a ácidos fenólicos (y derivados glicosilados), mientras que las manchas naranjas corresponden típicamente a compuestos fenólicos del tipo flavonoide, y las manchas color verde a flavonoides particulares (crisoeriol, apigenina, camferol, isoramnetina y sus derivados glicosilados). Los compuestos con valores de R<sub>f</sub> bajos en general son moléculas pesadas, diglicósidos o hasta oligoglicósidos (Wagner y Bladt, 2001).



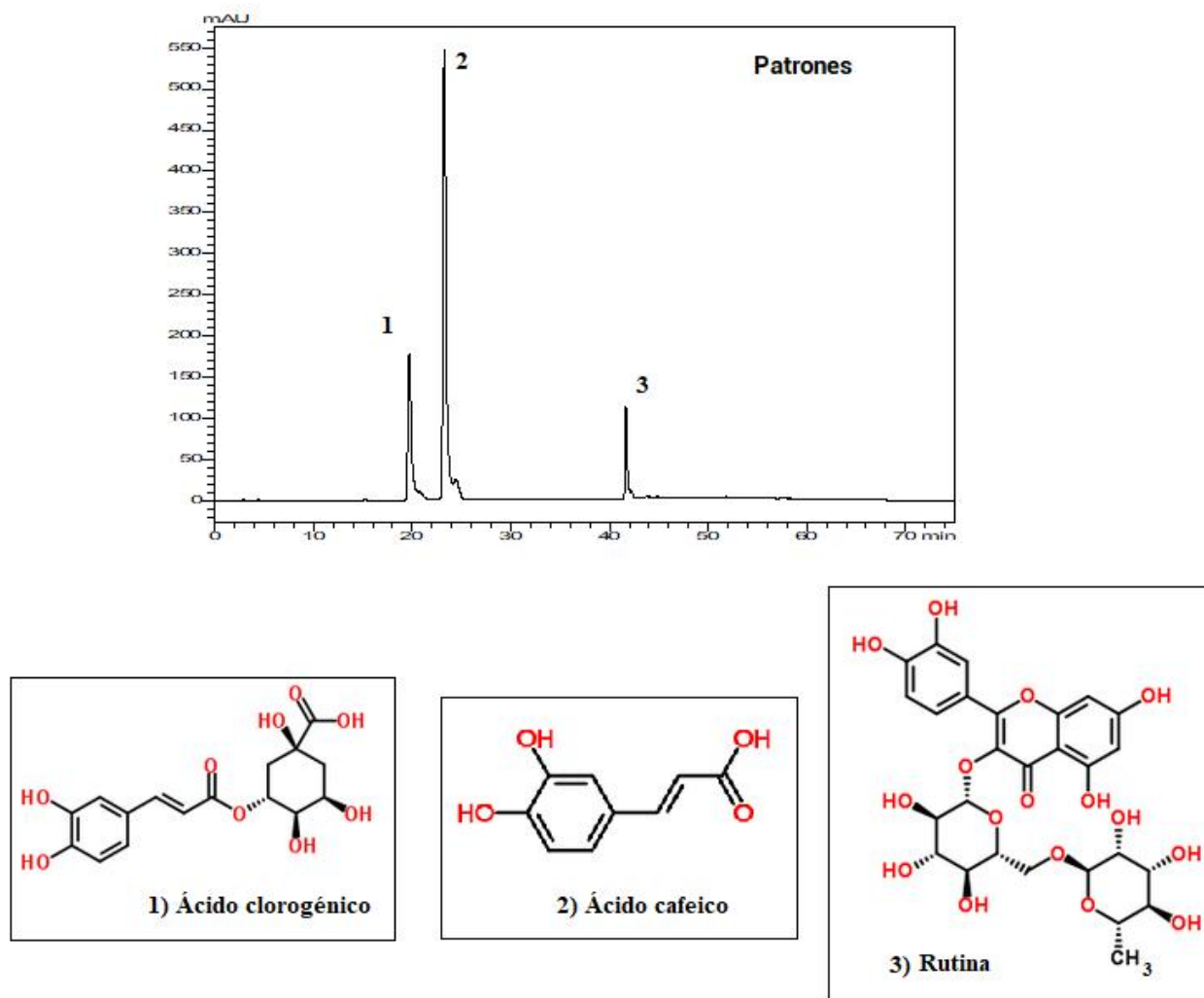
**Fig. 4.7.** Principales compuestos fenólicos de las infusiones de las especies en estudio, visualizados por cromatografía en capa delgada con reactivos NP-PEG y luz UV a 365 nm. Los patrones de referencia son rutina (naranja,  $R_f=0,4$ ), ácido clorogénico (celeste,  $R_f=0,5$ ), ácido cafeico (celeste,  $R_f=0,9$ ) y quercetina (naranja,  $R_f=1$ ).

Respecto a los patrones de referencia, se observó al flavonoide rutina (naranja,  $R_f \approx 0.4$ ) presente de forma notoria en *A. boronioides*, *G. astragalina* y *S. chilensis*. Según [Sharma et al. \(2013\)](#) y [Gullon et al. \(2017\)](#) es un compuesto con numerosas actividades farmacológicas reportadas como antimicrobianas, antifúngicas y antialérgicas, que también presenta beneficios en un rango muy amplio de enfermedades crónicas como cáncer, diabetes, hipertensión e hipercolesterolemia. La actividad antioxidante de este compuesto en particular es superior a la de otros flavonoides y se ha comprobado que aumenta la capacidad antioxidante del plasma sanguíneo en pacientes humanos, además de que disminuye el azúcar en sangre en pacientes diabéticos, la presión y el colesterol ([Sharma et al., 2013](#)). Es un compuesto muy activo que podría explicar las bioactividades observadas para extractos vegetales que lo contengan.

El ácido clorogénico ( $R_f \approx 0.5$ ), un ácido fenólico glicosilado ampliamente distribuido en las plantas, se detectó de forma notoria en seis de los extractos estudiados: *A. australe*, *A. magellanica*, *D. andina*, *G. chilensis*, *M. sativa* y *S. chilensis*. También a este compuesto se le atribuyen numerosas actividades biológicas de interés comprobadas *in vivo*, como actividad antioxidante y antiinflamatoria asociadas a mejoras en el síndrome metabólico. Por ello, [Naveed et al. \(2018\)](#) instan a continuar profundizando cualquier aspecto del conocimiento relacionado con este compuesto, en este sentido las especies mencionadas pueden ser nuevas fuentes naturales de fácil acceso a este compuesto.

Con  $R_f \approx 0.9$  se visualiza al ácido cafeico, un ácido fenólico muy presente en plantas, que deriva directamente del ácido p-cumárico y es un intermediario de importancia en la vía del ácido shikímico. En humanos este compuesto ingresa fácilmente a la sangre, ejerciendo actividad antiinflamatoria al actuar sobre distintas etapas de la cascada de señales productora de interleuquinas proinflamatorias (Naveed *et al.*, 2018). Se reporta su presencia de forma notoria en *A. australe*, *A. magellanica*, *G. chilensis* y *M. sativa*. Por último con  $R_f \approx 0.95$  se observó el flavonoide quercetina, presente en *D. andina* y *M. sativa*. Este esqueleto flavonoide está muy difundido y presente en alimentos de origen vegetal (Erlum, 2004). Esta molécula normalmente puede estar unida a diferentes azúcares dando lugar a diversos glicósidos de quercetina.

En la Figura 4.8 se muestran los patrones ácido clorogénico, ácido cafeico y rutina que fueron detectados en un cromatograma a 280 nm.



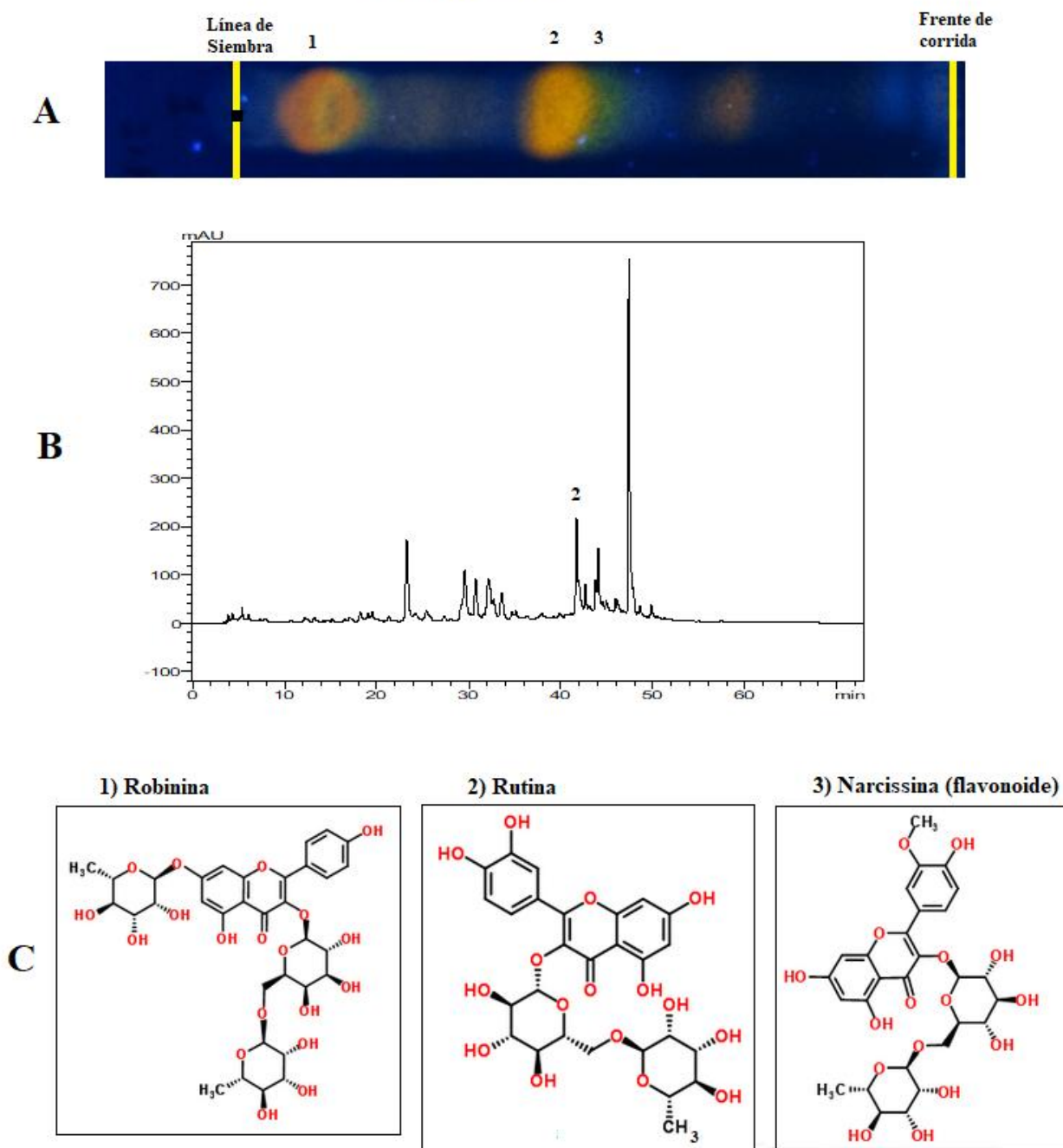
**Figura 4.8.** Cromatograma de HPLC-DAD obtenido a 280 nm para los patrones de referencia 1-ácido clorogénico, 2-ácido cafeico, 3-rutina.

A continuación en las Figuras 4.9 a 4.18 se muestran los principales compuestos fenólicos que fueron detectados para cada una de las infusiones de las plantas estudiadas. En la parte A de las figuras se muestra la imagen de la TLC obtenida la especie correspondiente, en la misma se visualizan los principales compuestos correspondientes a esa infusión, los cuales se numeran consecutivamente para luego presentar sus estructuras en la parte C de la figura. En la parte B se presenta el cromatograma obtenido por HPLC-DAD, en el cual se coloca un número solamente a los compuestos que coinciden en el tiempo de retención con algunos de los patrones utilizados (ácido clorogénico, ácido cafeico y rutina).

Para *A. boronioides* (Figura 4.9) se detectaron rutina, robinina y narcissina como principales compuestos, todos del tipo flavonoide. Esta planta posee amplios usos etnobotánicos reportados como antiinflamatoria (González *et al.*, 2018), los cuales han sido confirmados por estudios *in vitro* (González *et al.*, 2003). Dado que narcissina presenta muy baja fluorescencia debida a una baja concentración, puede pensarse que los compuestos más relevantes en este extracto serían rutina y robinina. Por lo que se podría pensar que la combinación de estos dos flavonoides, presentes en alto concentración, serían determinantes en la bioactividad atribuida a las infusiones de esta especie.

Robinina posee un valor de  $m/z$  de 741, tres monosacáridos y por ello un  $R_f$  bajo en el sistema de TLC utilizado; es un flavonoide bastante conocido, previamente reportado en otras especies vegetales (Lisiuk *et al.*, 2017). Muñoz y Delporte (2015) describen por primera vez la existencia de una molécula similar aislada de las partes aéreas de *A. boronioides* proveniente de poblaciones de Chile, un oligósido de camferol determinado por resonancia magnética nuclear (NMR), con la misma masa que Robinina. El compuesto 1 podría no ser Robinina, sino dicho oligósido de camferol reportado por Muñoz y Delporte (2015). Para asignar su estructura con mayor rigurosidad en el futuro podría aislarse el compuesto y aplicarle técnicas de elucidación estructural como NMR.

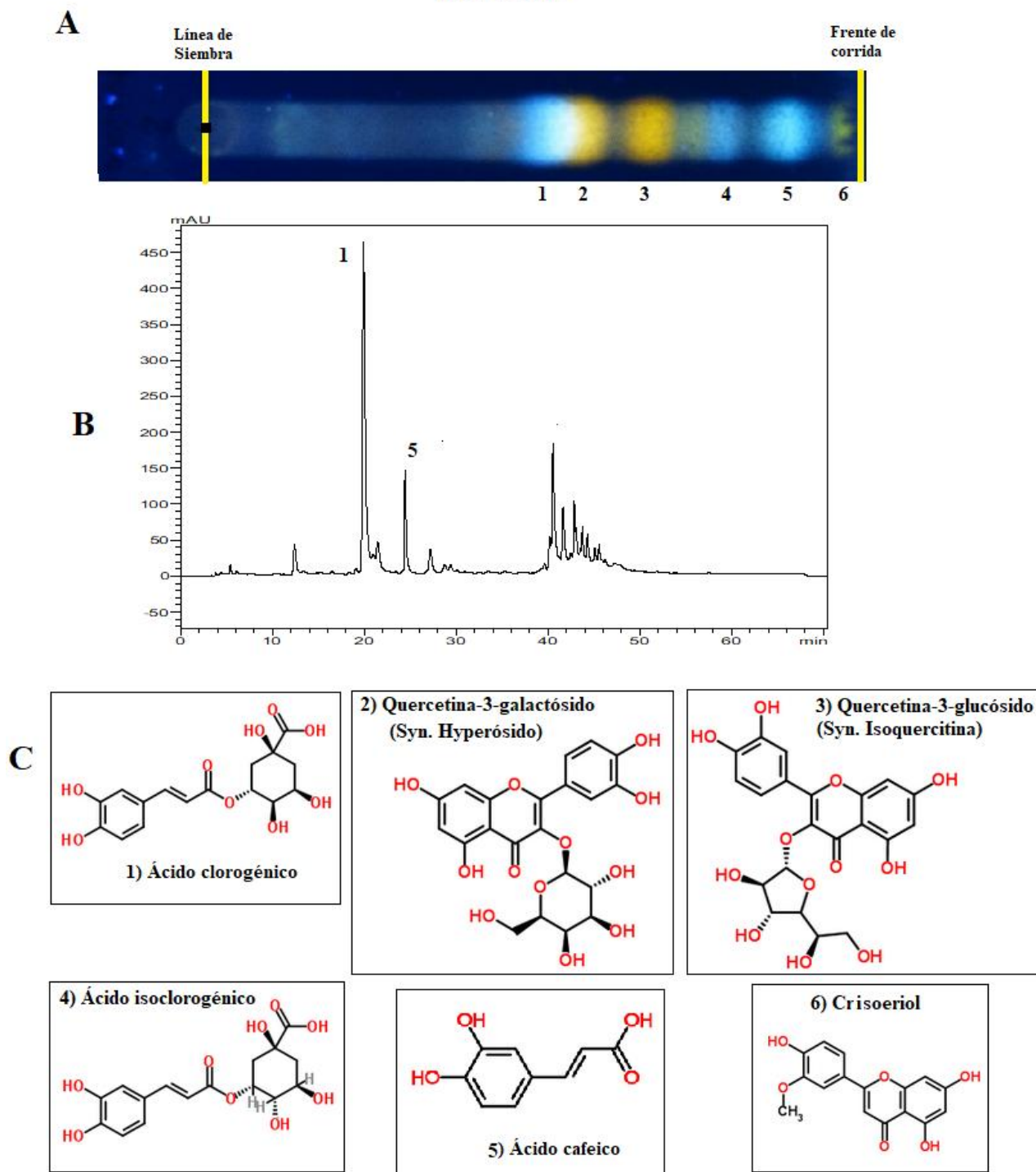
### *A. boronioides*



**Figura 4.9.** Compuestos fenólicos principales para *A. boronioides*. A) visualización de la corrida en TLC B) Cromatograma a 280 nm y C) estructuras propuestas para los compuestos 1, 2 y 3. El compuesto 1 puede ser Robinina o un oligósido de camferol (Muñoz y Delporte 2015).

Para *A. australe* se detectaron seis compuestos principales (Figura 4.10): ácido clorogénico, hiperósido, isoquercetina, ácido isoclorogénico, ácido cafeico y crisoeriol. El presente trabajo constituye el primer análisis de compuestos en esta especie. De acuerdo a la intensidad de la fluorescencia observada en la TLC y la absorbancia detectada por HPLC-DAD (pico 1, Fig. 4.10 B, el componente más abundante es el ácido clorogénico.

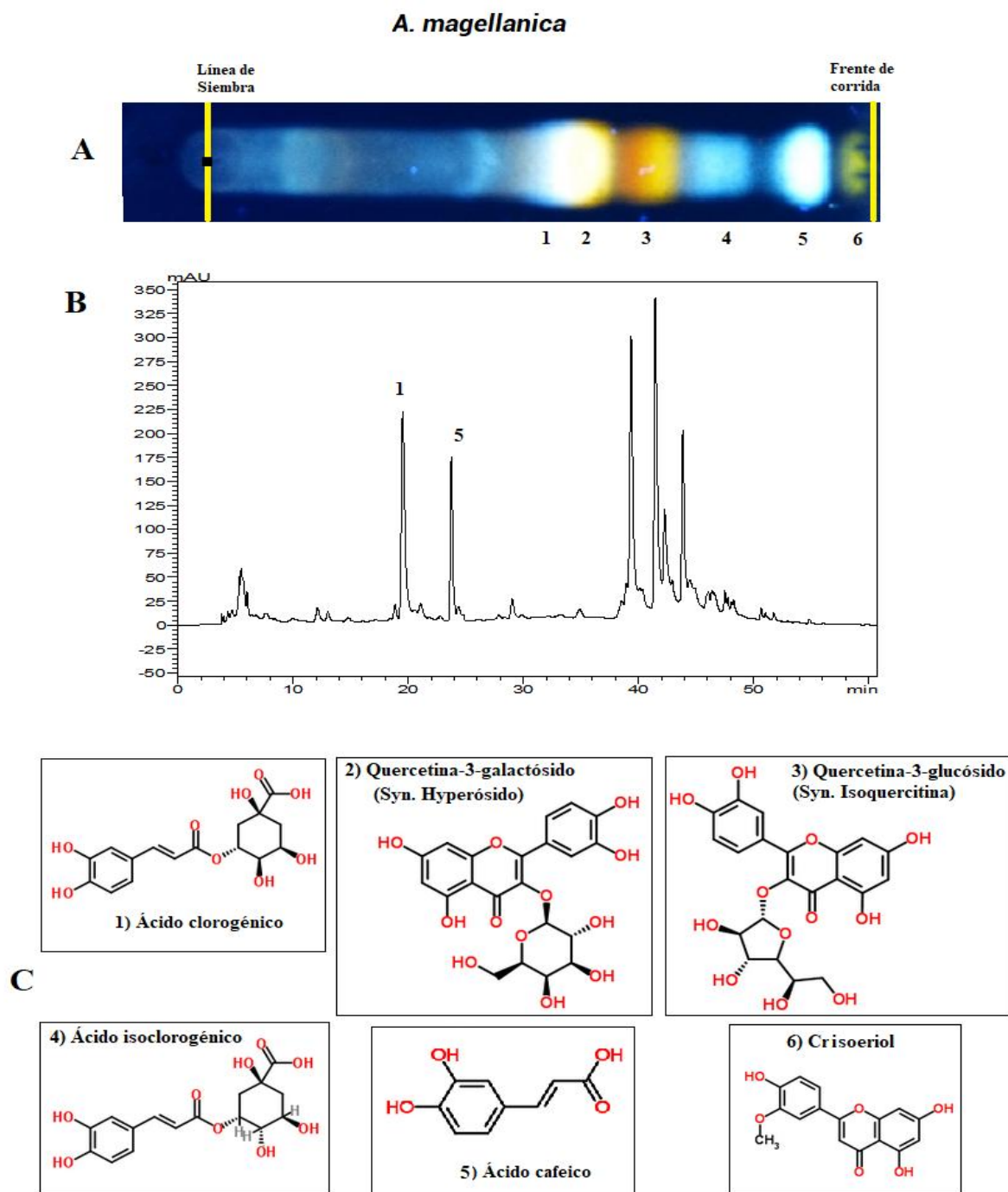
### A. australe



**Figura. 4.10.** Compuestos fenólicos principales para *A. australe*. A) visualización de la corrida en TLC B) Cromatograma a 280 nm y C) estructuras propuestas para los compuestos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Para *A. magellanica* (Figura 4.11) se detectó un patrón de 6 compuestos muy similar a *A. australe*: ácido clorogénico, hiperósido, isoquercetina, ácido isoclorogénico, ácido cafeico y crisoeriol. Un patrón de compuestos tan similar para dos especies diferentes (de distintos géneros) resulta sumamente llamativo, por ello se revisaron las muestras y se repitieron análisis a partir de nuevas muestras, corroborando los resultados encontrados. Lo encontrado podría explicarse desde la influencia ambiental, aunque *A. australe* es de ambientes húmedos mientras que *A.*

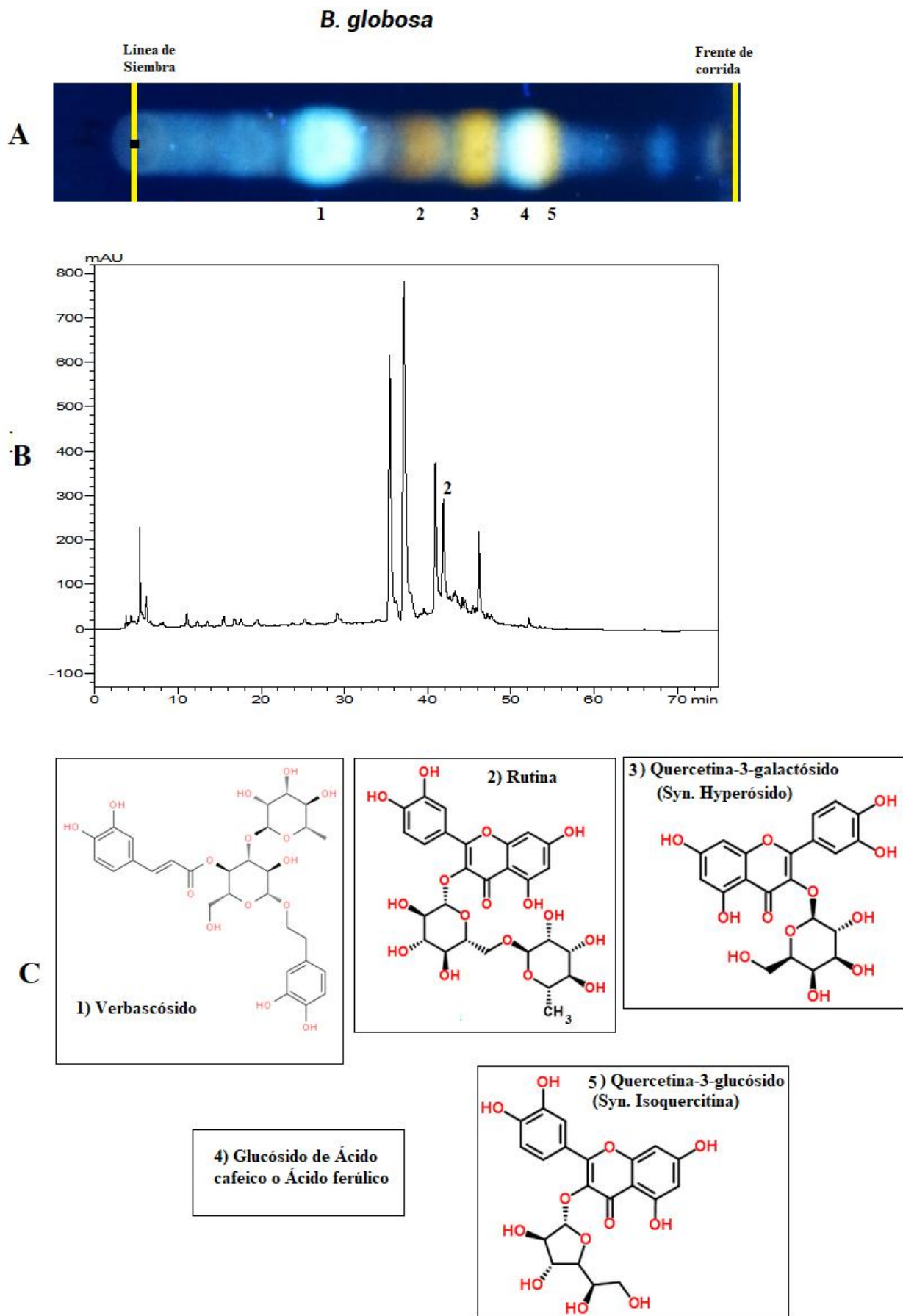
*magellanica* es de ambientes secos, por lo que los patrones encontrados coincidirían de forma casual.



**Figura 4.11.** Compuestos fenólicos principales para *A. magellanica*. A) visualización de la corrida en TLC B) Cromatograma a 280 nm y C) estructuras propuestas para los compuestos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Si se observa en detalle las Figuras 4.10 y 4.11, es claro que todos los compuestos muestran mayor intensidad de fluorescencia para *A. magellanica* que para *A. australe*, por lo podría inferirse que son los mismos compuestos presentes en mayor concentración en *A. magellanica*. Este análisis constituye también la primera descripción de compuestos de este tipo realizada en esta planta. Nuevamente, de acuerdo a la intensidad de la fluorescencia observada en la TLC y la absorbancia en el cromatograma HPLC-DAD, el componente más abundante es el ácido clorogénico.

Para *B. globosa* se detectaron 5 compuestos principales: verbascósido, rutina, hiperósido, un glucósido de ácido fenólico e isoquercetina (Figura 4.12). Se observa una mancha celeste de alta intensidad de fluorescencia (1), de acuerdo su R<sub>f</sub> y el comportamiento esperado de la molécula en este sistema cromatográfico se asignó la identidad de verbascósido, compuesto ampliamente reportado previamente como componente fenólico mayoritario presente en extractos polares de *B. globosa* ([Backhouse et al., 2018a](#)). Este compuesto es característico en las familias del orden Lamiales y resulta muy bioactivo, ya que presenta propiedades antiinflamatorias en los distintos epitelios del cuerpo humano y también propiedades neuroprotectoras de interés ([Alipieva et al. 2014](#)). Su estructura química (con varios sitios reactivos posibles) lo hace muy interesante para la exploración de nuevos compuestos farmacológicos usando la química combinatoria ([Alipieva et al., 2014](#)). Por otro lado, la presencia de derivados de quercetina es congruente con otros reportes del esqueleto quercetina en extractos polares de esta especie ([Bustamante et al., 2015](#)).



**Figura 4.12.** Compuestos fenólicos principales para *B. globosa*. A) visualización de corrida en TLC B) Cromatograma a 280 nm y C) estructuras propuestas para los compuestos 1, 2, 3, 4 y 5.

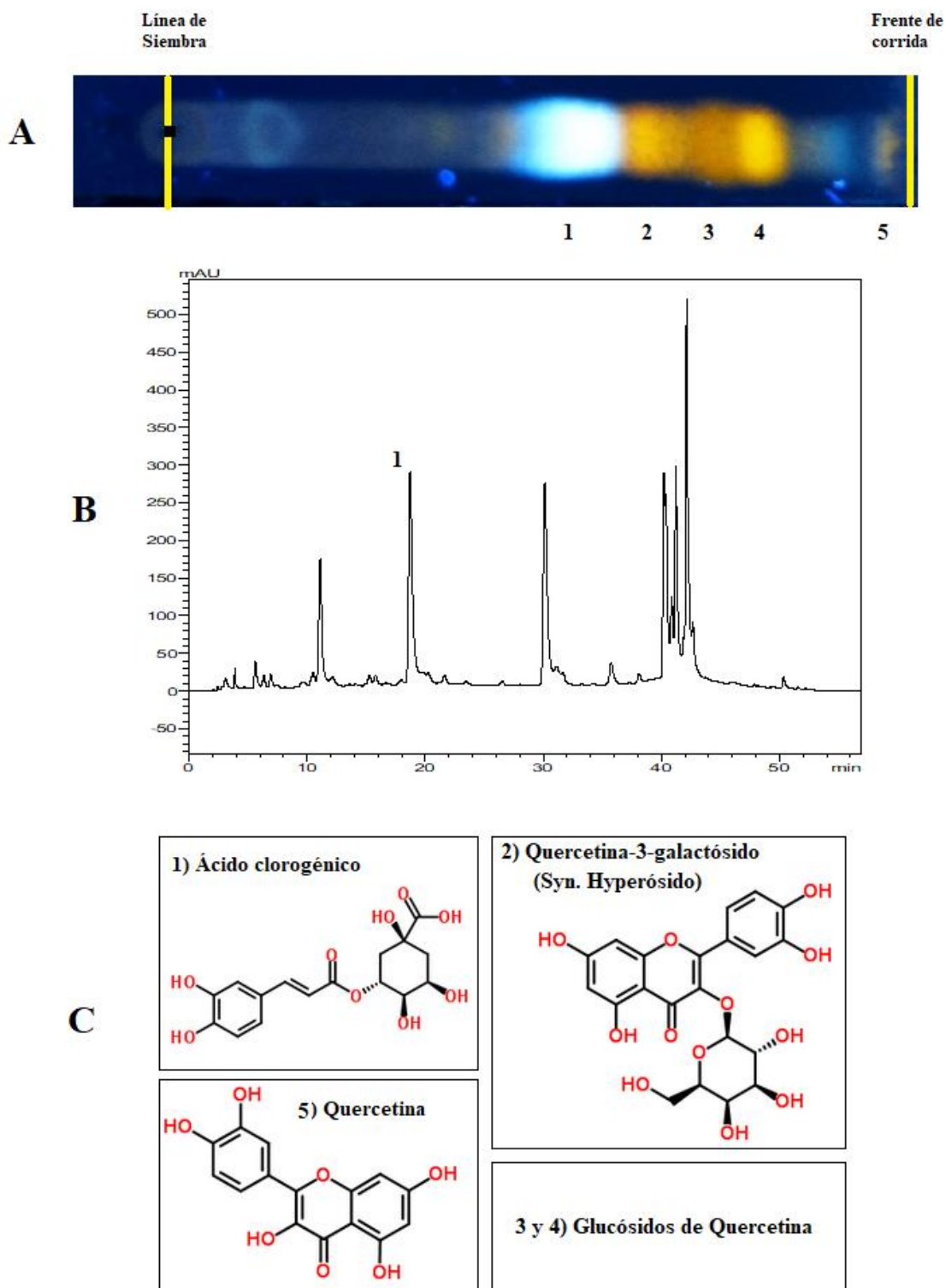
En *D. andina* se detectaron ácido clorogénico, hiperósido, quercetina y dos glicósidos de quercetina como compuestos principales (Figura 4.13). Los flavonoides quercetina y taxifolina han sido reportados para poblaciones de la especie *D. winteri* en Chile ([Cruz et al., 1973](#)); los compuestos fenólicos detectados en este análisis constituyen el primer registro de compuestos fenólicos para extractos acuosos de *D. andina*, la presencia de quercetina probablemente sea algo característico en el género *Drimys*.

La intensa fluorescencia observada indica una elevada cantidad de compuestos, lo cual es concordante con la alta actividad antioxidante y elevado contenido de compuestos fenólicos presentados previamente en el Capítulo 3.

*Dysphania multifida* es una especie que no se destaca en cuanto a los compuestos fenólicos presentes en su infusión. En el caso de esta especie se ven dos manchas verdes con baja intensidad de fluorescencia, correspondientes a los flavonoides isoviolantina y escoparina, y que indican una baja concentración de estos compuestos (Figura 4.14). Esta intensidad de fluorescencia es coherente con lo mostrado en el Capítulo 3, ya que *D. multifida* presentó un bajo contenido de compuestos fenólicos y escasa actividad antioxidante..

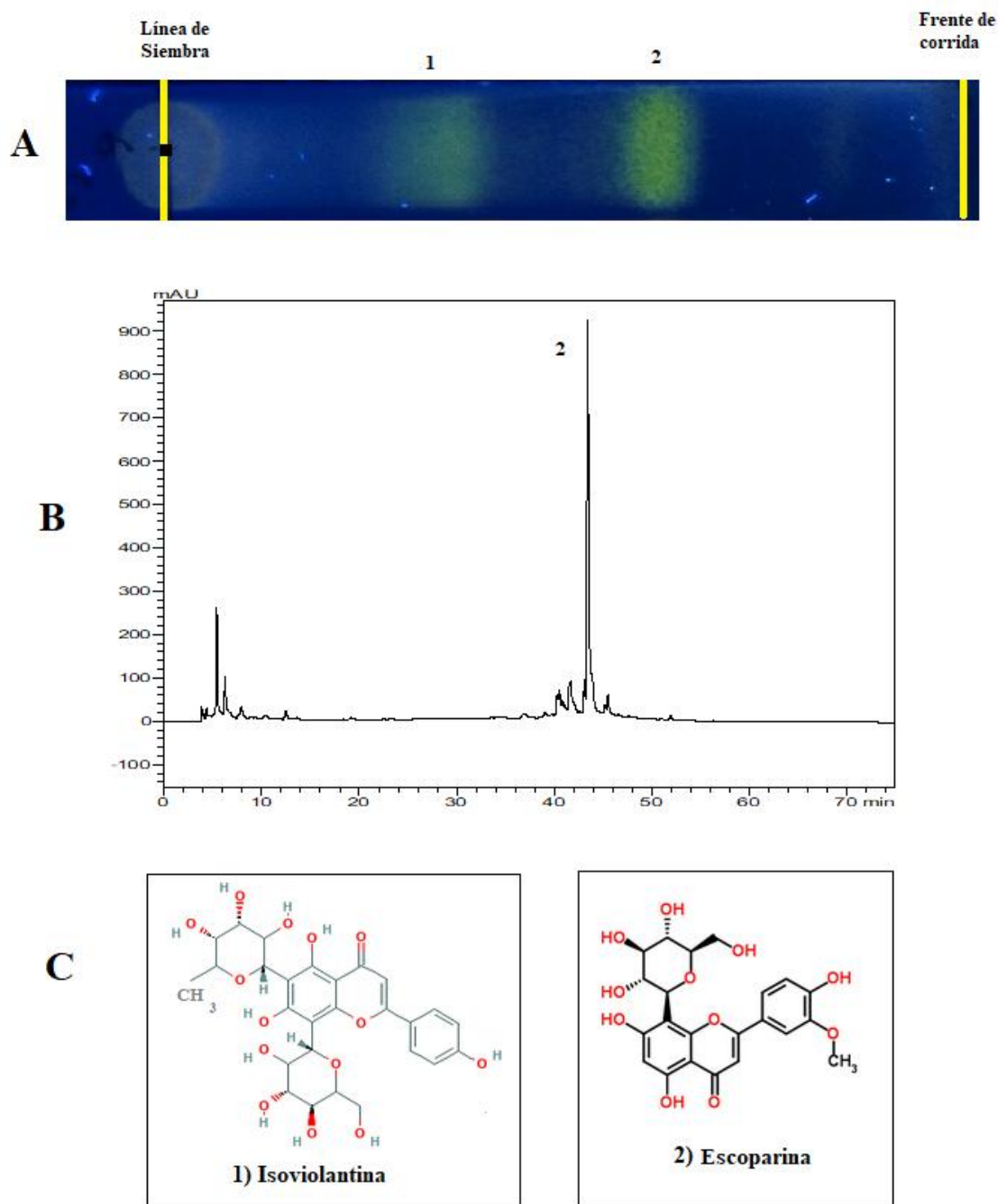
El compuesto escoparina coincide con todas las características propuestas por [Wagner y Bladt \(2001\)](#), además es glicósido de isoramnetina. Los datos obtenidos guardan concordancia con otros reportes existentes para este género, ya que isoramnetina se ha encontrado en otras especies de este género ([Nedialkova et al., 2009](#)).

### *D. andina*



**Figura 4.13.** Compuestos fenólicos principales para *D. andina*. A) visualización de corrida en TLC B) Cromatograma a 280 nm y C) estructuras propuestas para los compuestos 1, 2, 3 y 4.

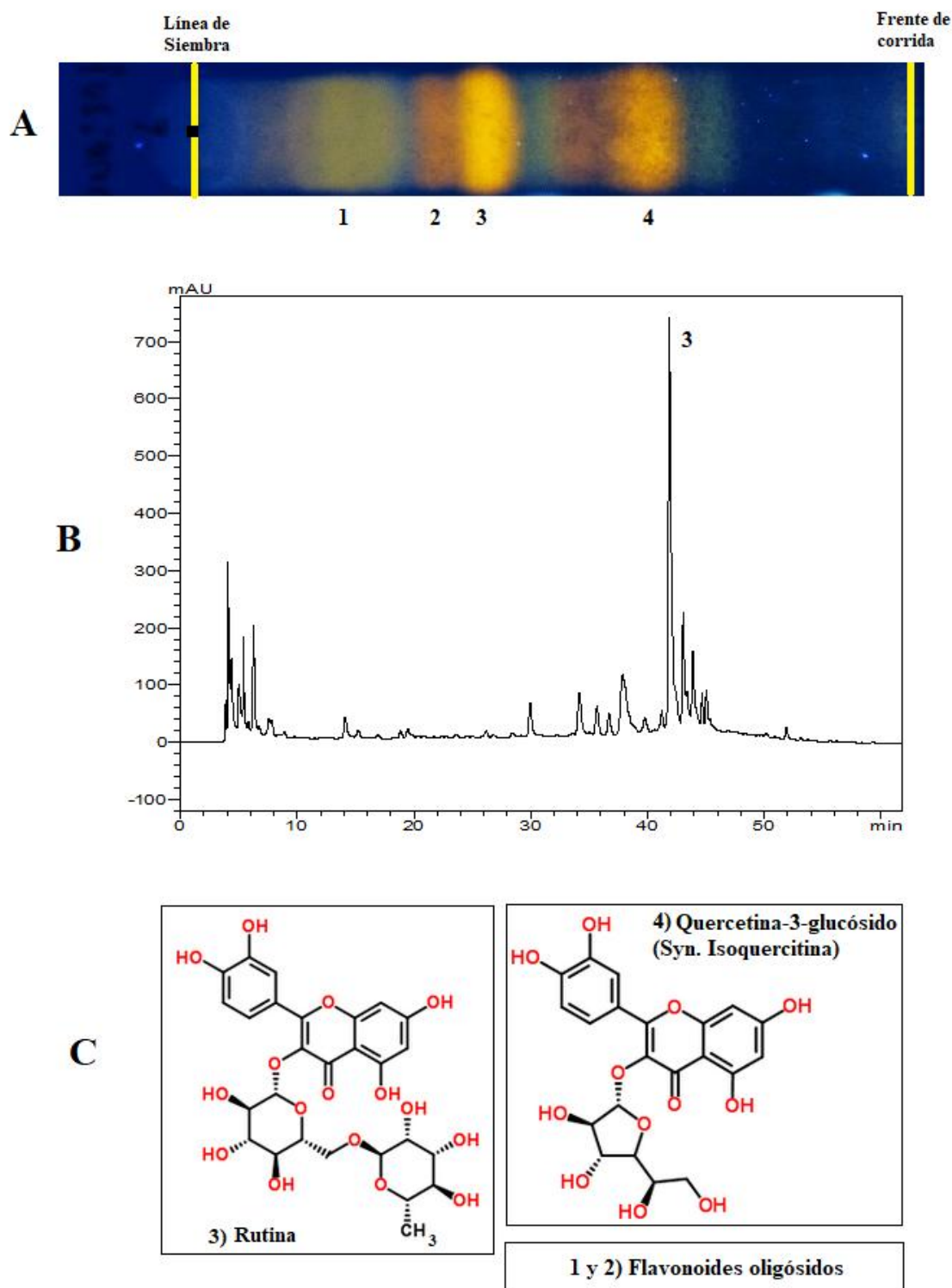
### *D. multifida*



**Figura 4.14.** Compuestos fenólicos principales para *D. multifida* A) visualización de corrida en TLC B) Cromatograma a 280 nm y C) estructuras propuestas para los compuestos 1 y 2.

Para *G. astragalina* se observan solo compuestos fenólicos del tipo flavonoide (sin visualizarse ácidos fenólicos), que corresponden a flavonoides oligósidos de rutina o quercetina, rutina e isoquercetina (Figura 4.15). De acuerdo a su fluorescencia, el compuesto principal es rutina. La actividad antiinflamatoria ha sido reportada para otras especies del género *Glycyrrhiza*, pero no ha sido vinculada con rutina (Hosseinzadeh y Nasiri-Asl, 2015). De todas formas, rutina ha demostrado ser un antiinflamatorio efectivo en modelos animales (Guardia et al., 2001). Dado estos antecedentes y datos obtenidos, podría ser interesante en el futuro evaluar la actividad antiinflamatoria de *G. astragalina* y su vinculación con el compuesto rutina.

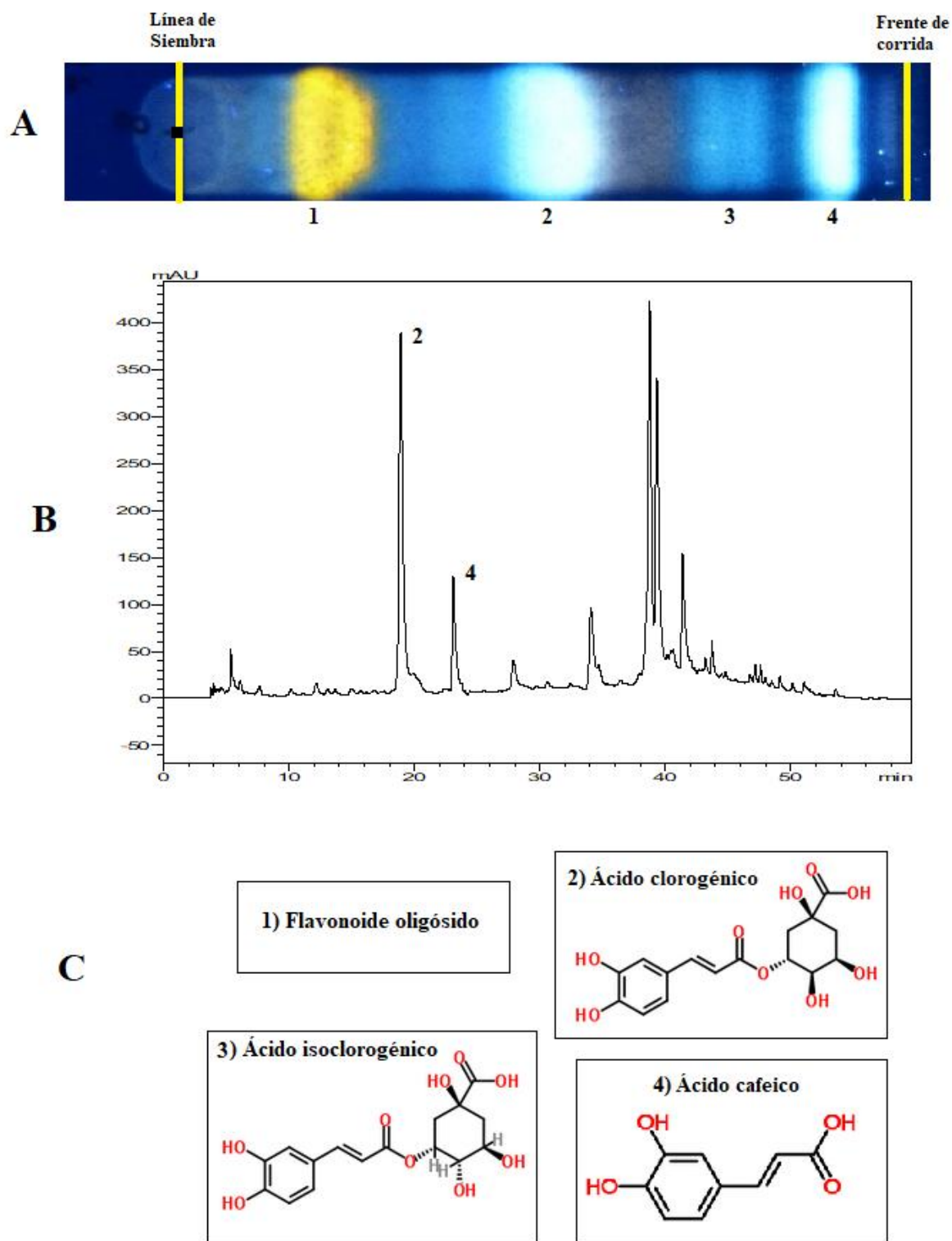
### *G. astragalina*



**Figura 4.15.** Compuestos fenólicos principales para *G. astragalina*. A) visualización de corrida en TLC B) Cromatograma a 280 nm y C) estructuras propuestas para los compuestos 1, 2, 3 y 4.

En *G. chilensis* se detectaron 4 compuestos: un flavonoide oligósido, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico y ácido cafeico; 3 de ellos presentaron una fluorescencia muy intensa (Figura 4.16). El compuesto 1 se trata de un flavonoide oligósido y podría ser un compuesto novedoso. Se observan además dos compuestos muy conocidos y comunes en este tipo de extracto de plantas, ácido clorogénico (2) y ácido cafeico (4). Los datos obtenidos constituyen el primer informe de compuestos fenólicos para *G. chilensis*.

### *G. chilensis*



**Figura 4.16.** Compuestos fenólicos principales para *G. chilensis*. A) visualización de corrida en TLC B) Cromatograma a 280 nm y C) estructuras propuestas para los compuestos 1, 2, 3 y 4.

*Madia sativa* posee los ácidos fenólicos ácido clorogénico y ácido cafeico, también presentes en *G. chilensis* y *A. magellanica*; además está presente el flavonoide quercetina (Figura 4.17). Como se ha mencionado anteriormente, son compuestos frecuentes en este tipo de extractos y en el metabolismo vegetal activo, producto de la ruta del ácido shikímico. Por otro lado

el flavonoide quercetina está en muy en pequeña cantidad. Los compuestos fenólicos de *M. sativa* no habían sido estudiados hasta el momento.

Resulta llamativo que a pesar de la intensa fluorescencia que producen los ácidos fenólicos detectados en la TLC, *M. sativa* no se destacó en cuanto a su actividad antioxidante en el capítulo anterior. Esto lleva a pensar que las actividades antioxidantes reportadas previamente (Capítulo 3) para las infusiones, resultan altas cuando en el mismo extracto se combinan altos niveles de ácidos fenólicos y/o ácidos hidroxicinámicos con altos niveles de flavonoides.

En el caso de *S. chilensis*, esta especie presenta claramente dos compuestos principales, rutina y ácido clorogénico (Figura 4.18.). Ambos compuestos ya han sido reportados para extractos polares de la planta en poblaciones de Brasil (Tamura *et al.*, 2009; Löbler *et al.*, 2013). Se trata de una especie con amplia distribución en Sudamérica y que presenta fenotipos o variedades regionales (Laphitz y Semple, 2015), aunque puede afirmarse que fitoquímica de los compuestos fenólicos es poco variable, de acuerdo a los análisis presentados y a los antecedentes mencionados.

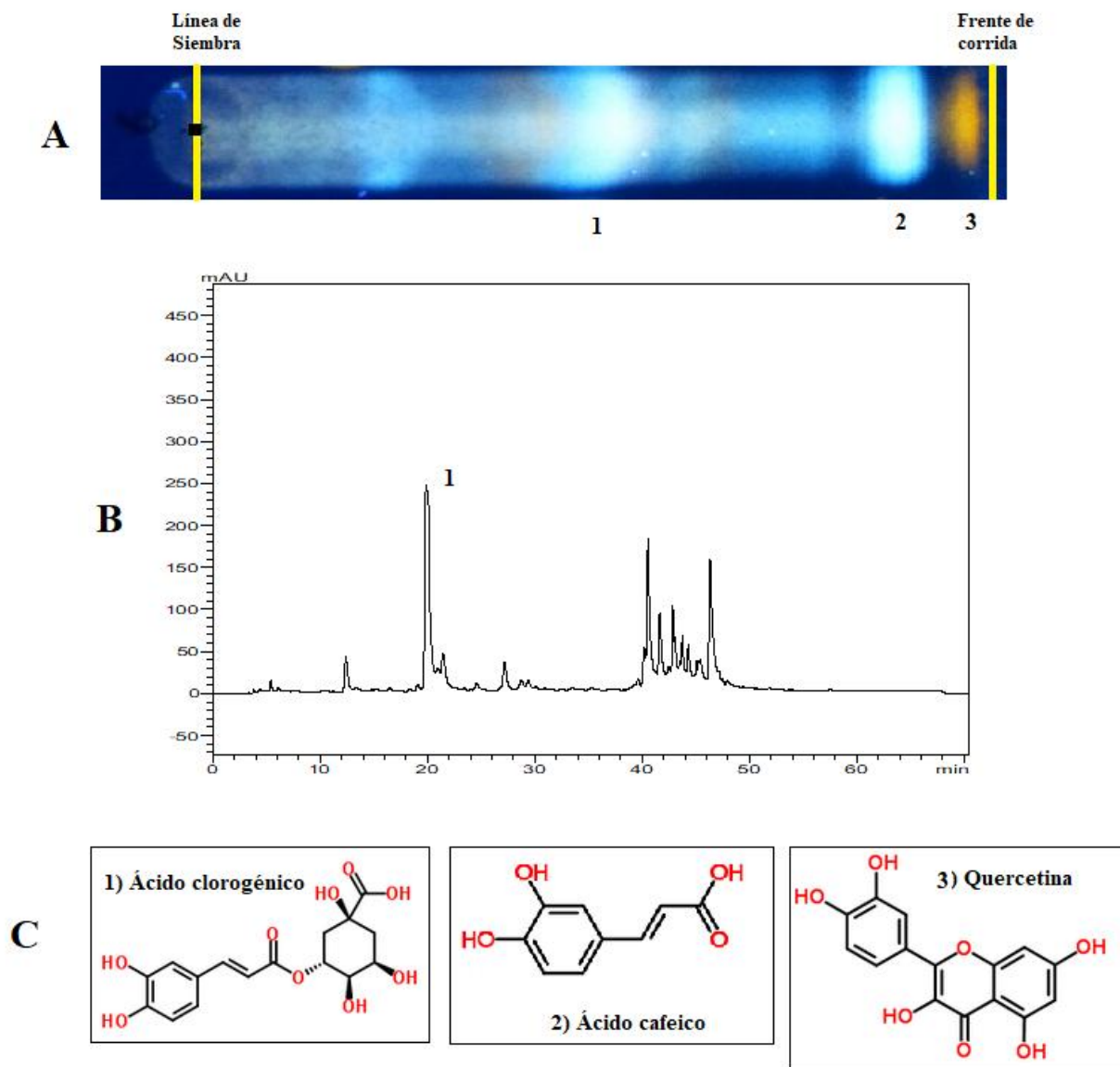
Por otro lado, *S. chilensis* es otra planta que presenta diversos usos antiinflamatorios (Mercandeli *et al.*, 2012), los cuales podrían explicarse en parte por su alto contenido de rutina (Guardia *et al.*, 2001).

Como se mencionó en el Capítulo 2, esta planta es la que cuenta con más estudios de las seleccionadas, de todas formas este es el primer reporte sobre este grupo de compuestos para *S. chilensis* creciendo en la región patagónica.

El análisis adicional de las infusiones por HPLC-ESI-MS permitió identificar 28 compuestos fenólicos: 7 ácidos fenólicos e hidroxicinámicos y 21 flavonoides, listados a continuación en la Tabla 4.2. De esta forma se corroboraron los datos presentados previamente y se detectaron 13 compuestos adicionales que están presentes en los extractos en muy baja concentración.

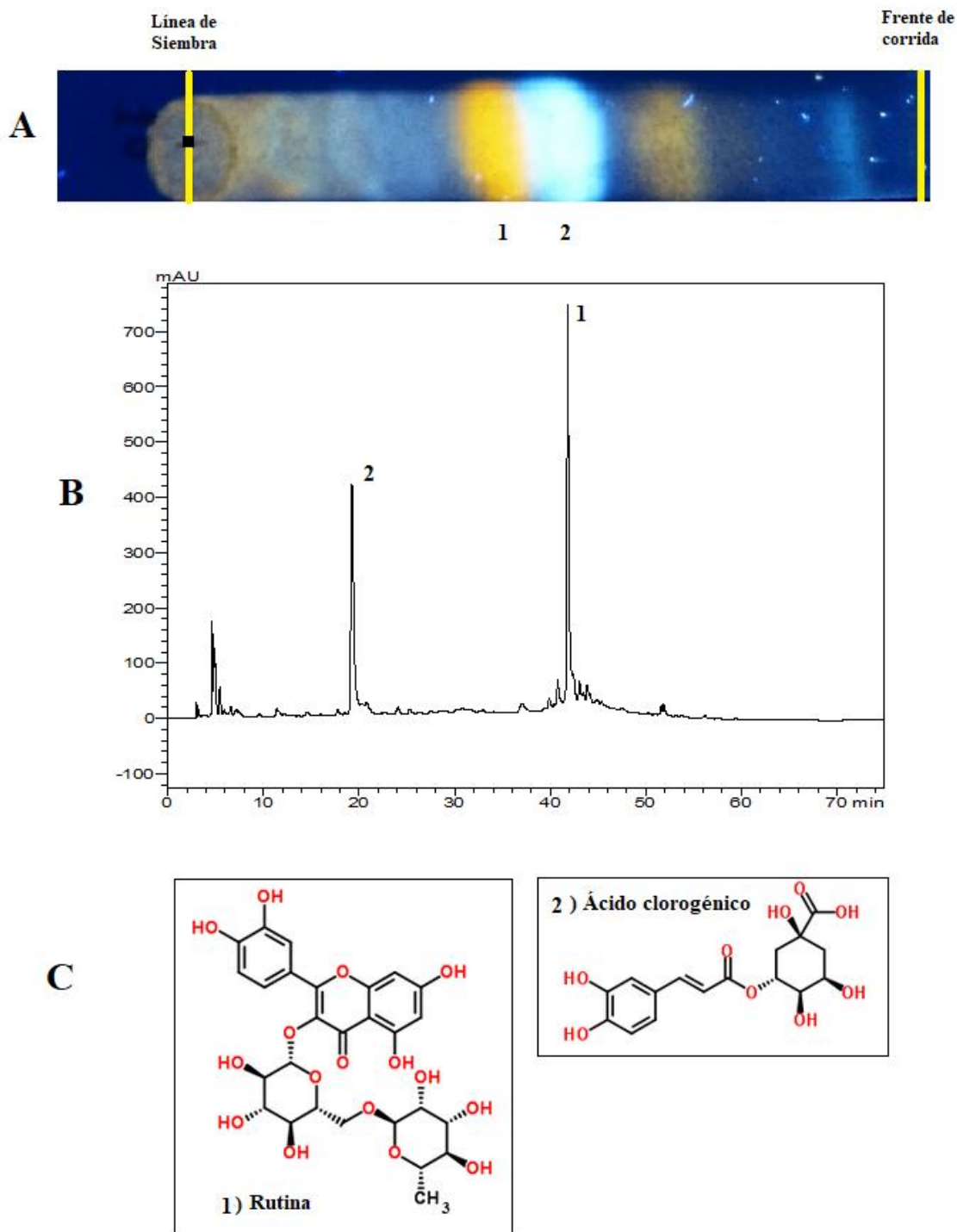
Si bien el alcance de este trabajo finaliza con la identificación de los compuestos principales presentes en las infusiones, sería muy interesante en el futuro poder cuantificar los compuestos o al menos los más interesantes como por ejemplo el ácido clorogénico o rutina. Para ello habría recurrir a técnicas de aislamiento o cuantificar mediante métodos específicos de HPLC, por ejemplo los métodos del estándar interno o estándar externo (Sabir *et al.*, 2012).

### *M. sativa*



**Figura 4.17.** Compuestos fenólicos principales para *M. sativa*. A) visualización de corrida en TLC B) Cromatograma a 280 nm y C) estructuras propuestas para los compuestos 1, 2 y 3.

### *S. chilensis*



**Figura 4.18.** Compuestos fenólicos principales para *S. chilensis* A) visualización de corrida en TLC B) Cromatograma a 280 nm y C) estructuras propuestas para los compuestos 1 y 4.

Tabla 4.2. Compuestos fenólicos identificados por HPLC-ESI-MS.

RT	m/z	$\lambda_{max}$ (nm)	Otras	Estructura	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
3.0	355	330	280 / 254	Chlorogenic acid *	0	●	●	0	●	●	0	●	●	●
4.1	181	330	280	Caffeic acid *	0	●	●	●	0	0	0	●	●	●
7.5	195	330	280 / 254	Ferulic acid *	0	0	0	0	●	●	0	0	0	0
15.2	451	254	330 / 365	Cyanidin glucoside	0	●	0	0	0	0	0	0	0	0
16.3	303	254	365 / 330	Quercetin *	●	●	●	●	●	●	●	0	●	●
16.5	465	254	365 / 330	Quercetin 3-O-glucoside/galactoside	●	●	●	●	●	●	●	0	●	●
16.8	595	330	280 / 254	Apigenine diglucoside / Luteolin, 4'-O-rutinoside	0	●	●	●	0	●	0	0	●	●
16.9	611	254	365 / 330	Rutina *	●	0	0	●	●	0	●	0	●	●
18.2	577	365	330 / 254	6-Hydroxy, 7-O-methyl, luteolin, 3'-O-glucosyl maleate	0	0	0	0	●	0	0	0	0	●
18.5	741	254	330 - 365	Robinin *	●	0	0	●	●	●	0	0	●	●
20.5	435	330	254 / 365	Pentoside of 3' or 4'-O-queretin	0	●	●	●	●	●	●	0	0	●
21.4	579	330	254	Teucrol succinoyl glucoside	0	●	●	●	0	●	0	0	0	0
22.0	449	254	330	Quercitrin	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
23.0	234	330	280 / 254	Unknown	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23.1	463	254	365 / 330	Luteolin 3'-O-glucuronide	●	●	●	0	0	●	0	●	●	●
33.7	593	330	254 / 280	4'-O-Rutinoside of 7-O-methylated apigenin	0	●	●	●	0	●	0	0	0	0
34.1	451	280	-	3-O-Rhamnoside of 3', 4', 2', 6' tetrahydroxy, 4'-methoxy dihydrochalcone	0	0	0	0	0	0	0	●	0	0
35.5	348	365	254	Unknown	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37.8	301	254	280 / 330	6-Methoxy-apigenin	●	●	●	●	●	0	●	●	●	0
39.7	361	365	330 / 254	Rosmarinic acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40.2	345	254	280 / 330	Pentahydroxy aurone, 3-O methylated	●	●	●	0	●	●	0	0	●	●
42.1	285	254	280 / 330	7-O-Methylated apigenin	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
44.4	315	330	280	Cirsimaritrin	●	●	●	●	●	●	0	●	●	●
44.7	171	254	280	Gálic acid *	0	0	0	0	0	0	0	●	●	●
47.4	539	254	330 / 365	Isomer of lithospermic acid	0	0	0	0	●	●	●	0	●	●
50.1	375	280	254	Hexahydroxy flavone tetra-O-methylated	0	0	0	0	0	0	0	●	●	●
51.7	711	280	330 / 254	Luteolin 6,8-di-C-glucoside succinate	0	0	0	0	●	●	●	●	●	0
51.8	609	254	280 / 365 / 330	3'-O-Rutinoside of 7-methylated flavone	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
54.0	360	254	330	Unknown	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57.4	505	330 / 365	280	Hypericin	●	●	0	0	0	0	0	0	0	0
58.3	625	365	330 / 254 / 280	Isorhamnetin glucosyl-rhamnoside	●	●	●	●	●	●	0	●	●	0

RT: tiempo de retención. m/z: ión molecular.  $\lambda_{max}$  (nm): longitud de onda de máxima absorción. Otras: otras longitudes de onda en las que se produce absorción.

Los números romanos corresponden a las distintas especies analizadas: I) *A. australe* III) *A. magellanica* IV) *B. globosa* V) *D. andina* VI) *D. multifida* VII) *G. astragalina* VIII) *G. chilensis* IX) *M. sativa* X) *S. chilensis*. \* compuestos que además se utilizaron como patrones de referencia puros. Unknown: corresponde a un ión molecular no identificado.

#### 4.3.2. *Compuestos volátiles*

En las Figuras 4.19 a 4.27 se muestran los compuestos volátiles identificados en los aceites esenciales de las especies aromáticas estudiadas. Para cada planta se presentan en forma tabulada los compuestos identificados en la parte A; también se muestran los cromatogramas correspondientes a la columna no polar en la parte B y la cromatografía en capa delgada en la parte C.

Para *A. boronioides* se observó la presencia de los compuestos esquelenona (17,8%) e iso-esquelenona (7,6%), exclusivos de esta especie que fueron previamente reportados por [González et al. \(2002\)](#) (Figura 4.19). Recientemente [Cerdeira-García-Rojas et al. \(2015\)](#) plantearon una corrección en la estructura de la molécula bisnorbisesquiterpénica, la esquelenona, consistente en la reasignación de la configuración absoluta para esta molécula novedosa. Coincidiendo con reportes previos para el aceite esencial de esta planta en Patagonia ([González et al., 2004](#)) se detectó un elevado número de constituyentes, los cuales resultan clave para determinar los atributos organolépticos distintivos de este aceite esencial; dicho aceite presenta un aroma interesante (dulce, maderoso, especiado y balsámico), lo que ha despertado un interés comercial que culminó con el desarrollo de una línea de perfumes por parte de una reconocida empresa, actualmente discontinuado ([González et al., 2018](#)).

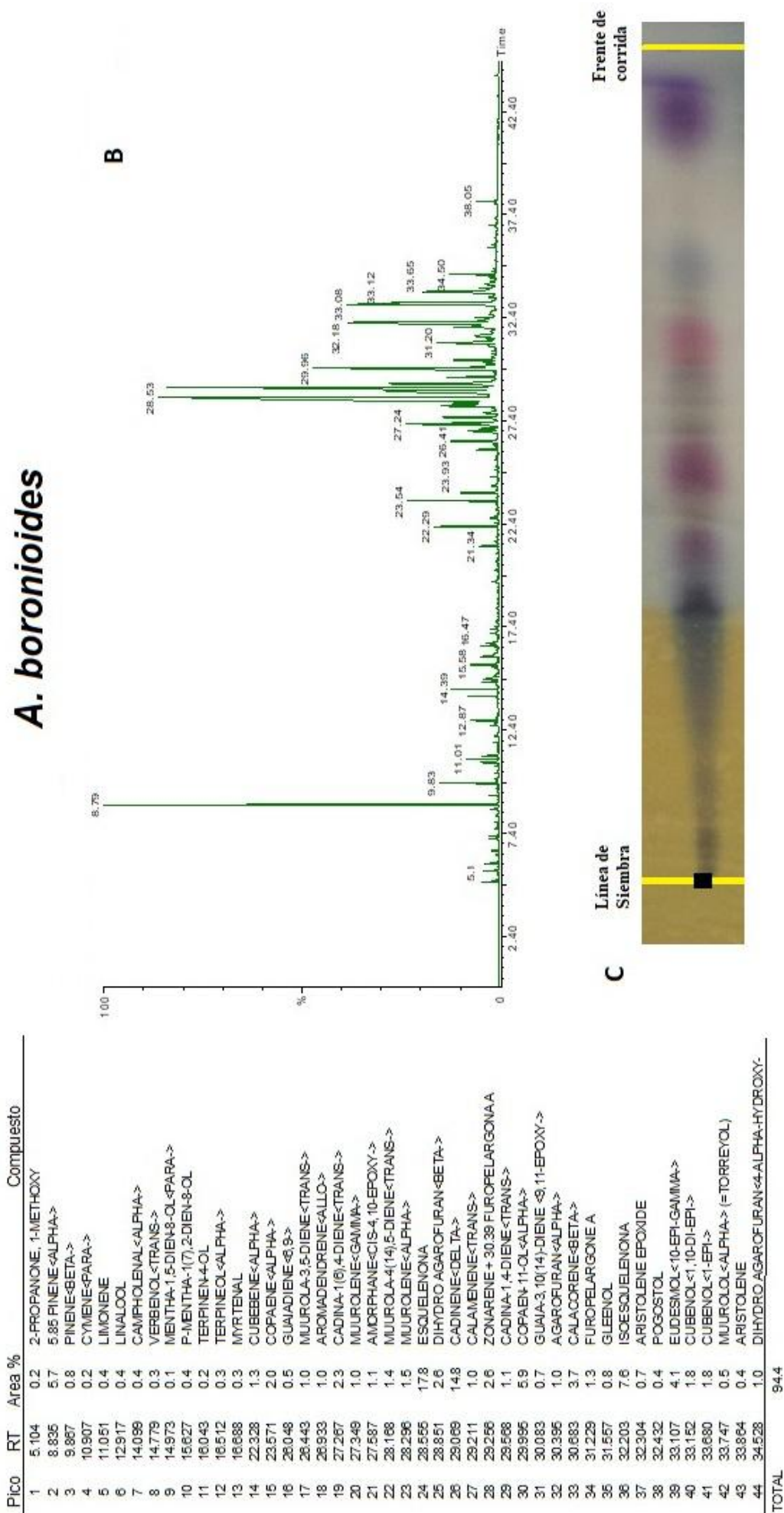


Fig 4.19. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de *A. boronioides*. A) Tabla de compuestos, B) Cromatograma, C) Cromatografía en capa delgada.

Esta es la primera caracterización química del aceite esencial de *A. australe*. Entre sus componentes se destacan  $\alpha$ -pineno (20.4%), sabineno (28 %) y terpinen-4-ol (10%), lo que coincide con los tres manchas principales observadas por cromatografía en capa fina (Figura 4.20 C). El sabineno, principal componente detectado en *A. australe*, es actualmente utilizado como un aditivo en perfumes; además según [Zhang et al. \(2014\)](#) es una molécula de interés para el desarrollo de nuevos combustibles de aviones, aunque para dicho uso debería producirse a partir de biorreactores con microorganismos y no extraerse de las plantas.

En el aceite esencial de *Apium australe* analizado se detectaron componentes en común con *A. graveolens* (especie hortícola) recolectado en Egipto:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno,  $\gamma$ -terpineno y humuleno [Saleh et al. \(1985\)](#).

En el caso de *A. magellanica*, este trabajo también presenta la primera caracterización de su aceite esencial. Se destacan los compuestos principales  $\gamma$ -costol (21.0%), 2-metilbutill 2-metilbutirato (8.2 %), selina-4,11-dieno (5.9%), cis- $\beta$ -ocimeno(4.1 %), (E)- $\beta$ -farneseno (4.2%) y espiroeter-Z (3.5 %) (Figura 4.21). Las cantidades mayoritarias de  $\gamma$ -costol y selina-4,11-dieno detectadas constituyen una característica peculiar del aceite esencial de esta especie, ya que estos compuestos se encuentran solo en trazas o en muy pequeñas cantidades en otras especies del genero *Artemisia* ([Pandey y Sing, 2017](#)).

Otro aspecto de interés destacable de este aceite esencial es la variedad de ésteres saturados e insaturados que le proporcionan a la esencia un aroma frutado. Se trataría de un aceite muy interesante para la industria de las fragancias, siempre y cuando se garantice el suministro y la sostenibilidad del material vegetal. La mayoría de las poblaciones de esta especie se encuentran en ambientes particulares de la Patagonia y los individuos crecen en forma dispersa. Por ello en caso de existir un interés industrial por esta especie debería abogarse por su conservación, evaluando y promoviendo su cultivo.

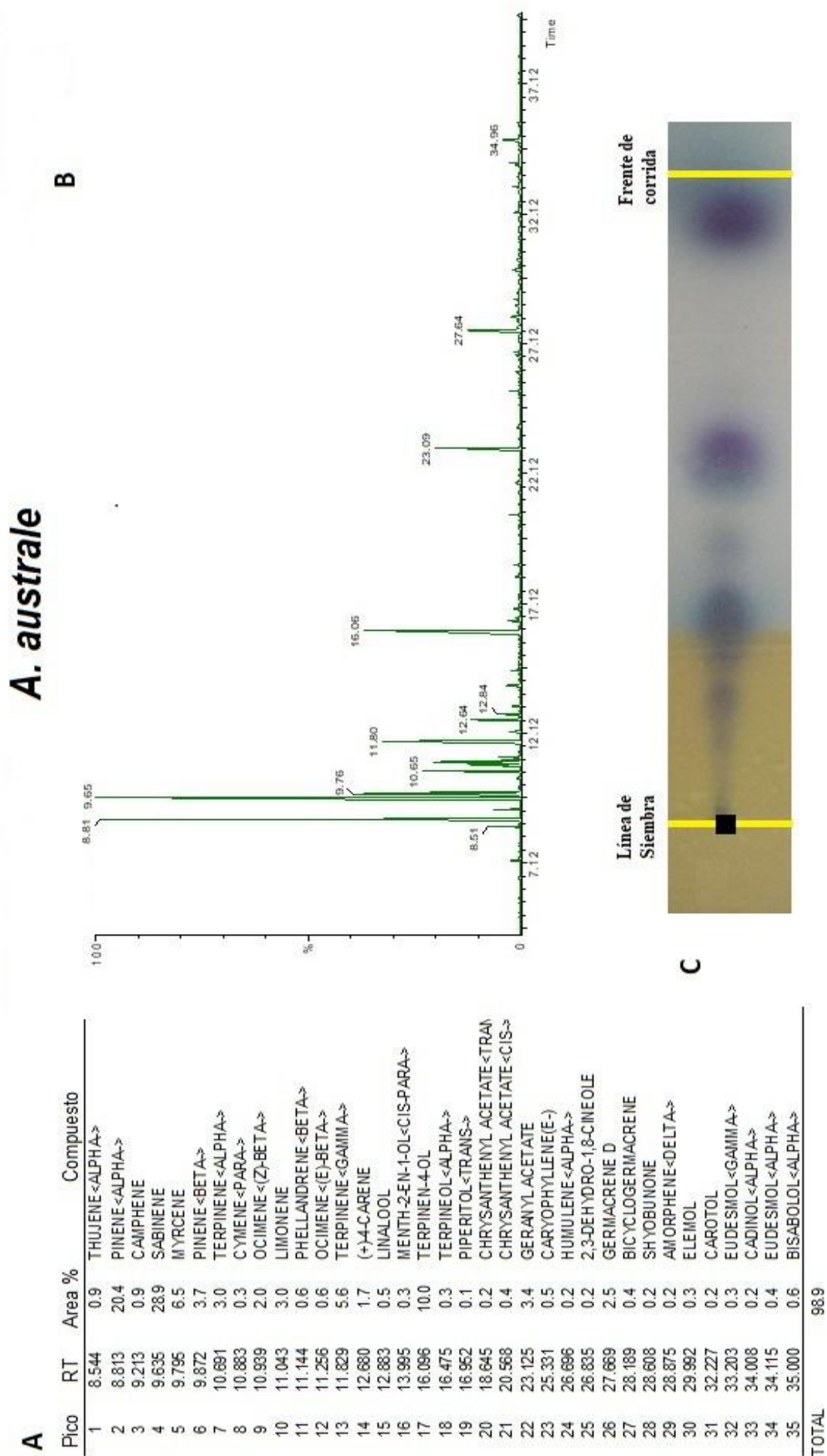


Fig 4.20. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de *A. australe*. A) Tabla de compuestos, B) Cromatograma, C) Cromatografía en capa delgada.

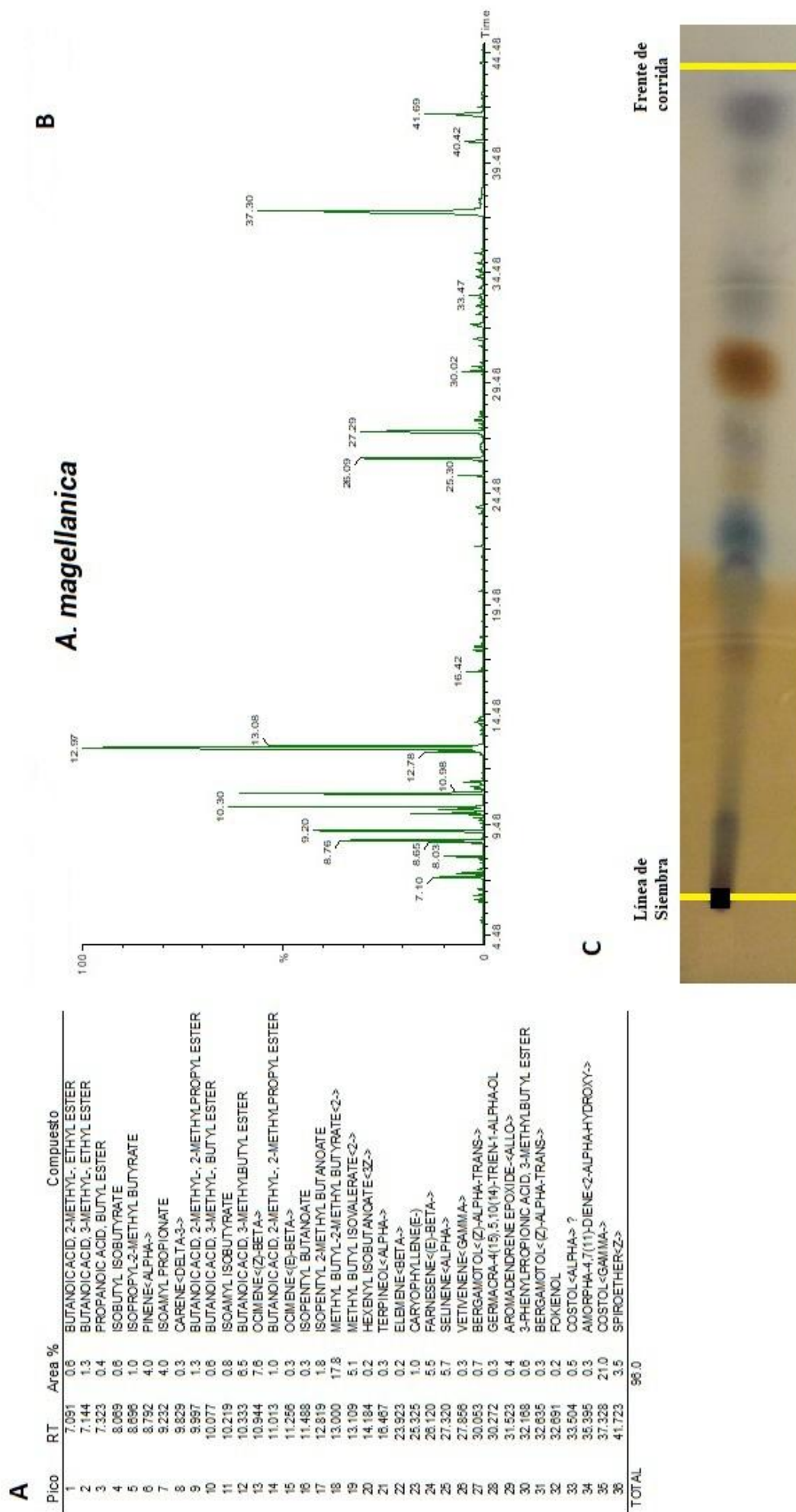


Fig 4.21. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de *A. magellanica*. A) Tabla de compuestos, B) Cromatograma, C) Cromatografía en capa delgada.

El aceite esencial de *D. andina* también es estudiado en este trabajo por primera vez. Se destaca la abundancia de  $\alpha$ -pineno (15,5 %) y  $\beta$ -pineno (18,4 %). Se trata de un aceite esencial muy complejo, con una gran variedad de componentes, muchos de los cuales están presentes en un 0.1% o en trazas (Figura 4.22). Un estudio realizado con *D. winterii* también demostró una composición compleja para su aceite esencial, y además dio resultados muy interesantes actuando como repelente del gorgojo de la harina (*Tribolium castaneum*) Zapata y Smaghe (2010), lo que lleva a pensar en el posible uso del aceite esencial de *D. andina* como repelente de otros insectos.

El aceite de *D. multifida* presenta cuatro compuestos que se destacan:  $\alpha$ -terpineno (19%), p-cimeno (18.2%), ascaridol (52,3%) y piperitona epóxido (8.4%) (Figura 4.23). En concordancia con otros trabajos, el ascaridol es el típico componente mayoritario de este aceite esencial (González *et al.*, 2009). A este compuesto se le atribuye una elevada toxicidad, y se ha sugerido que puede ser el responsable de intoxicaciones provocadas por el consumo de preparados acuosos de esta planta. La toxicidad de esta especie debida al ascaridol ha sido discutida en detalle por González *et al.* (2009), donde se destaca que el ascaridol es escasamente soluble en agua, por lo cual sería apenas extraído en preparaciones acuosas de la planta realizadas de forma correcta, es decir en infusiones preparadas a baja concentración. Sin embargo, el calentamiento prolongado puede transformarlo en sus compuestos oxidados, de mayor solubilidad en agua, que serían los responsables de los efectos tóxicos reportados (Rimada *et al.*, 2007). Sería muy importante realizar estudios de toxicidad con distintas formas de preparación de extractos de la planta, para aclarar estos aspectos.

El aceite esencial de *G. astragalina* también es analizado por primera vez en este trabajo. De los 10 componentes registrados (Figura 4.24), sobresale la presencia de cariofileno (32.3%). Este compuesto está presente en otras especies como *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), *Rosmarinus officinalis* (romero), y en las Cannabaceae *Cannabis sativa* (marihuana) y *Humulus lupulus* (lúpulo) (Omeño *et al.*, 2008). Se ha postulado que el cariofileno es un cannabinoide dietario que posee efectos antiinflamatorios en ratones (Gertsch *et al.*, 2008), por lo que existe un interés en comprobar su rol antiinflamatorio a través del sistema endocannabinoide en humanos.

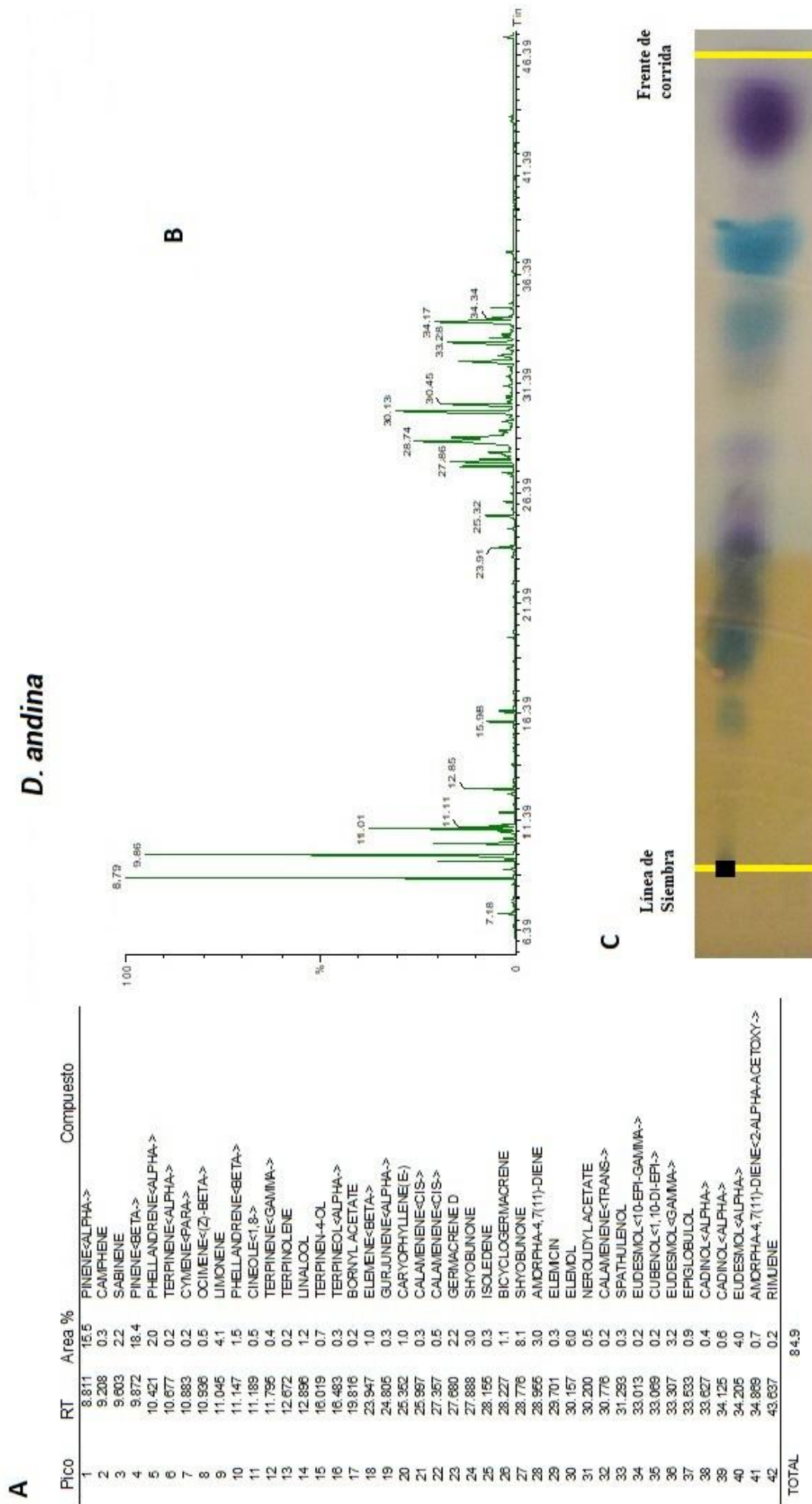


Fig 4.22. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de *D. andina*. A) Tabla de compuestos, B) Cromatograma, C) Cromatografía en capa delgada.

### *D. multifida*

**A**

Pico	RT	Area %	Compuesto
2	10.792	19.0	TERPINE NE <ALPHA->
3	11.008	18.2	CYMENE <PARA->
4	11.099	0.2	LIMONENE
5	11.851	0.2	TERPINE NE <GAMMA->
6	14.213	0.1	CYCLOHEXANEDIONE <3-METHYL-1,2->
7	18.669	52.3	ASCARIDOLE
8	18.819	0.5	PIPERITONE EPOXIDE <TRANS-> (EPOXIDE VS. IPP)
9	18.904	0.1	1-(7-HYDROXY-1,6,6-TRIMETHYL-10-OXATRICYCLO[5.2.1.0(2,4)]DEC-9-YL)ETHANONE
10	18.995	0.8	7-OXABICYCLO[4.1.0]HEPTAN-2-ONE, 3-METHYL-6-(1-METHYLETHYL)-
11	20.960	8.4	PIPERITONE EPOXIDE <CIS-> (EPOXIDE VS. IPP)
TOTAL		99.8	

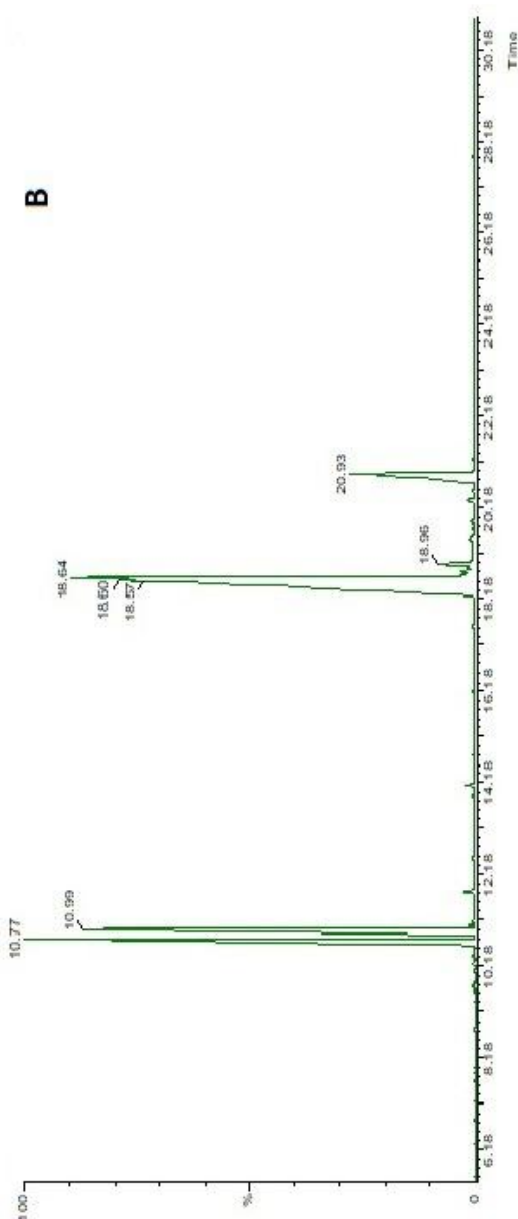


Fig 4.23. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de *D. multifida*. A) Tabla de compuestos, B) Cromatograma, C) Cromatografía en capa delgada.

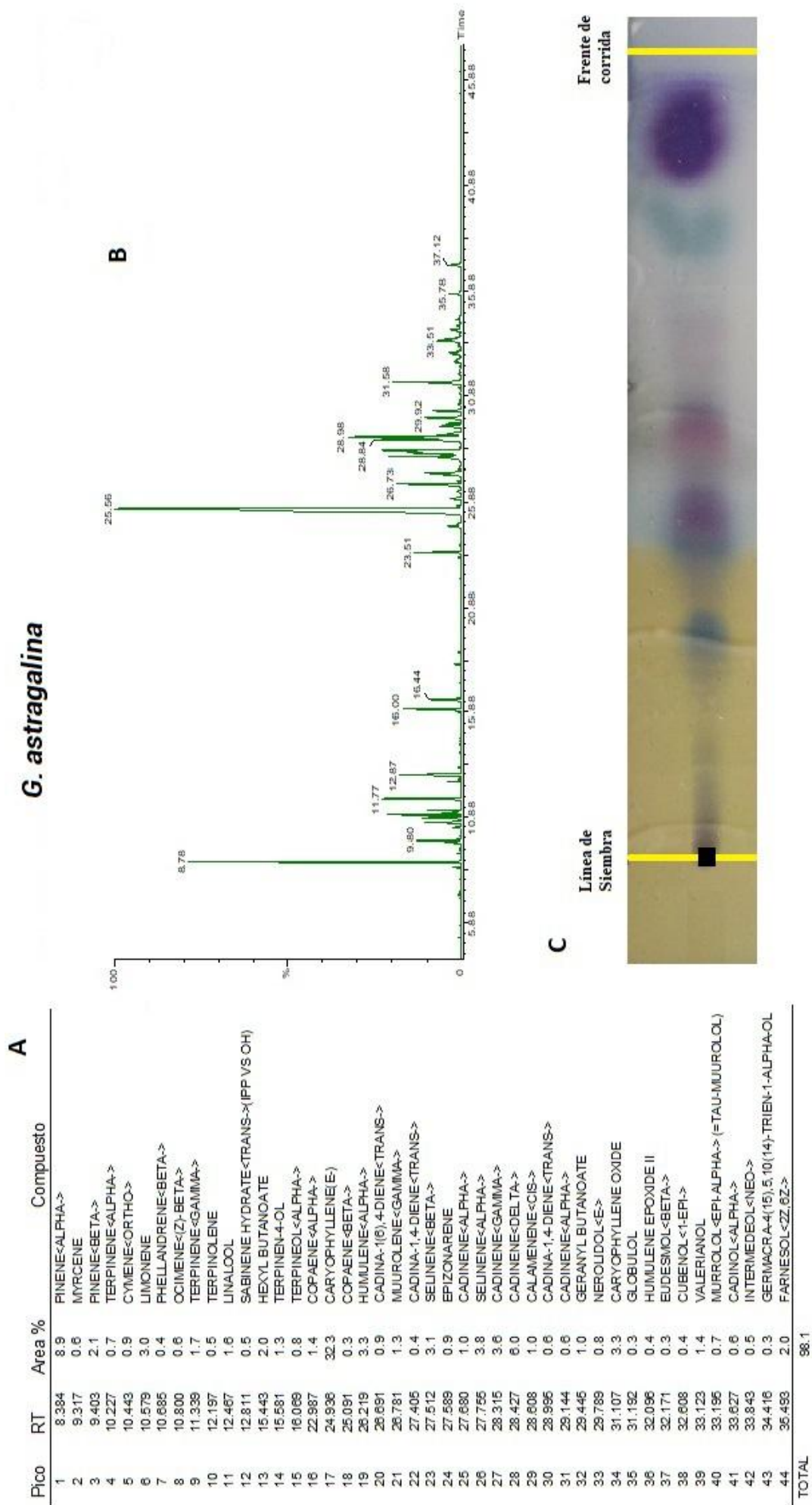


Fig 4.24. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de *G. astragalina*. A) Tabla de compuestos, B) Cromatograma, C) Cromatografía en capa delgada.

*Grindelia chilensis* es otra especie que posee un aceite esencial complejo (Figura 4.25), con numerosos componentes de bajo peso molecular, destacándose el alto contenido de limoneno (22%) y  $\delta$ -3-careno (11%). No existen antecedentes sobre el estudio del aceite esencial de esta especie, aunque otras especies del género como *G. squarrosa*, *G. humilis*, *G. robusta* y *G. hirsutula* también presentan aceites esenciales con elevado contenido de limoneno, y otros componentes variados (El-Shamy *et al.*, 2000; Veres *et al.*, 2014), al parecer la producción de limoneno podría ser característica de las especies aromáticas del género *Grindelia*.

Como puede observarse en el gráfico de GC y en la cromatografía en capa delgada de *M. sativa* (Figura 4.26) el aceite esencial de esta especie presenta cuatro compuestos dominantes:  $\alpha$ -pineno (32,3 %),  $\beta$ -pineno (8,3 %),  $\alpha$ -terpineol (31,6 %) y farnesol (6,9 %); estos dos últimos podría ser los principales responsables del aroma dulce frutado y cítrico que posee esta planta, ya que los mismos han sido identificados en cítricos y en frutas finas (Swift, 1961; Khan y Sultana, 2011). Este es el primer reporte acerca de la composición química del aceite esencial de *M. sativa*.

*S. chilensis* presenta un aceite esencial menos complejo que el de las especies presentadas anteriormente (Figura 4.27). Se destaca el elevado contenido de limoneno (46.6%) y D-germacreno (33.1%). Estos dos compuestos ya han sido informados para poblaciones de *S. chilensis* de Patagonia (González *et al.*, 2013). Un estudio realizado para una población de la especie en provincia de Santa Fe (Argentina) (Vila *et al.*, 2002), reporta también la presencia de limoneno como uno de los compuestos relevantes, aunque registrando menor abundancia (4.1%-13.4%), aunque el resto del aceite esencial presentó un perfil de compuestos diferente al analizado en esta tesis. Las diferencias encontradas podrían deberse a diferentes condiciones ambientales que influyen de forma diferencial en el metabolismo secundario de las dos poblaciones de *S. chilensis*; aunque por otro lado existe evidencia que indica que en general *Solidago spp.* de diferentes partes del mundo suele tener limoneno y D-germacreno entre sus componentes principales (Kalembe, 1998).

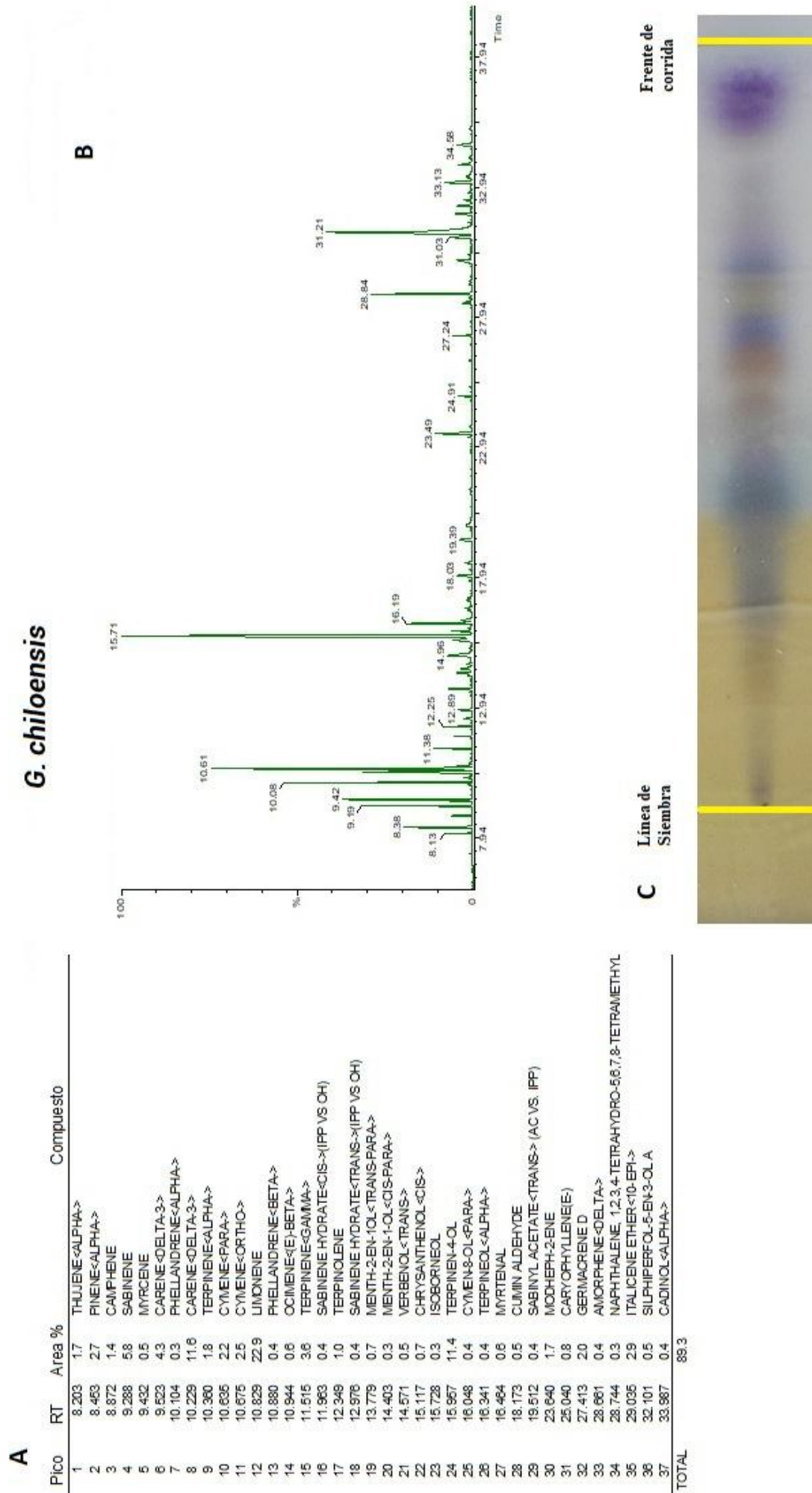


Fig 4.25. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de *G. chilensis*. A) Tabla de compuestos, B) Cromatograma, C) Cromatografía en capa delgada.

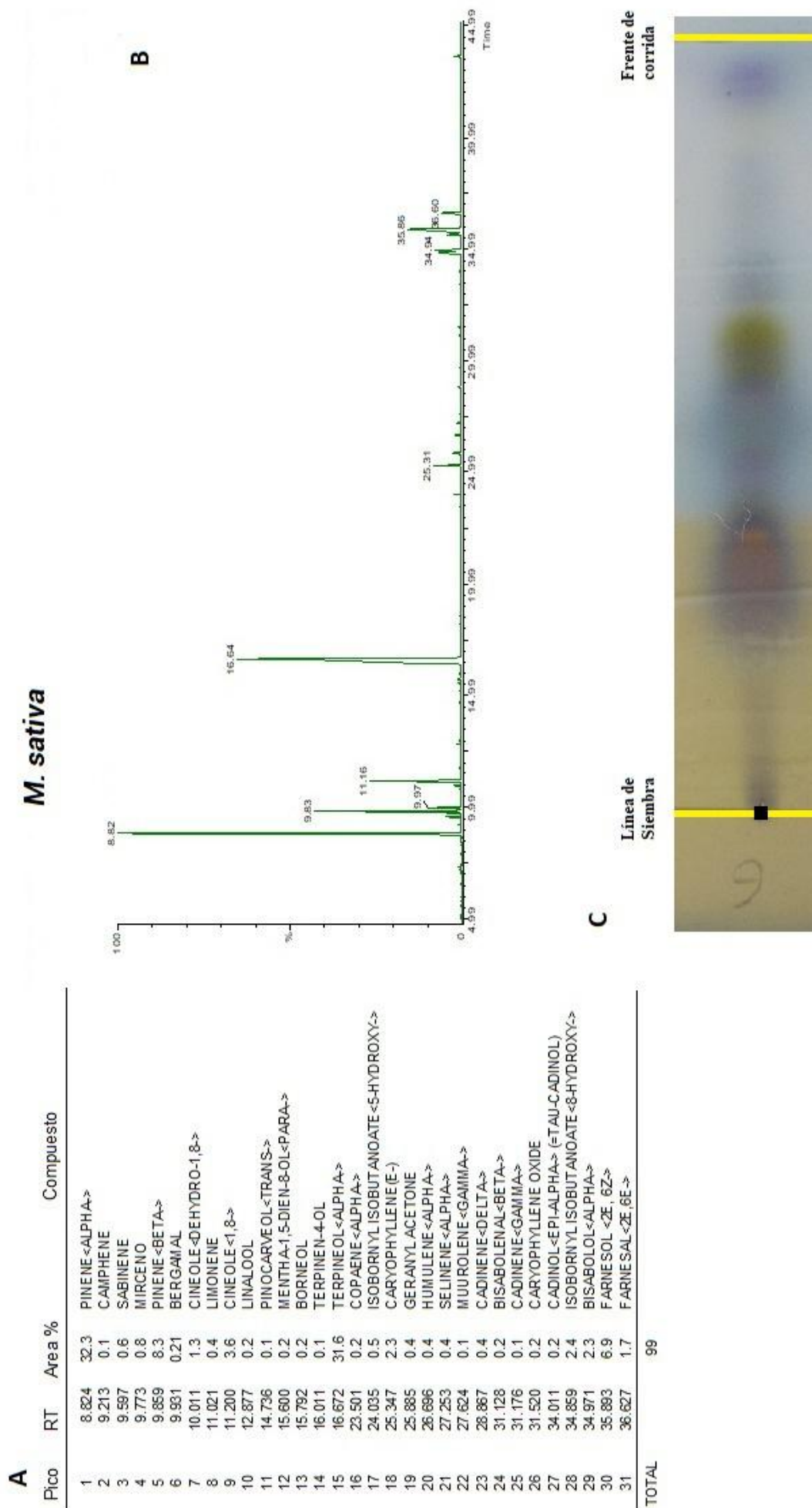


Fig 4.26. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de *M. sativa*. A) Tabla de compuestos, B) Cromatograma, C) Cromatografía en capa delgada.

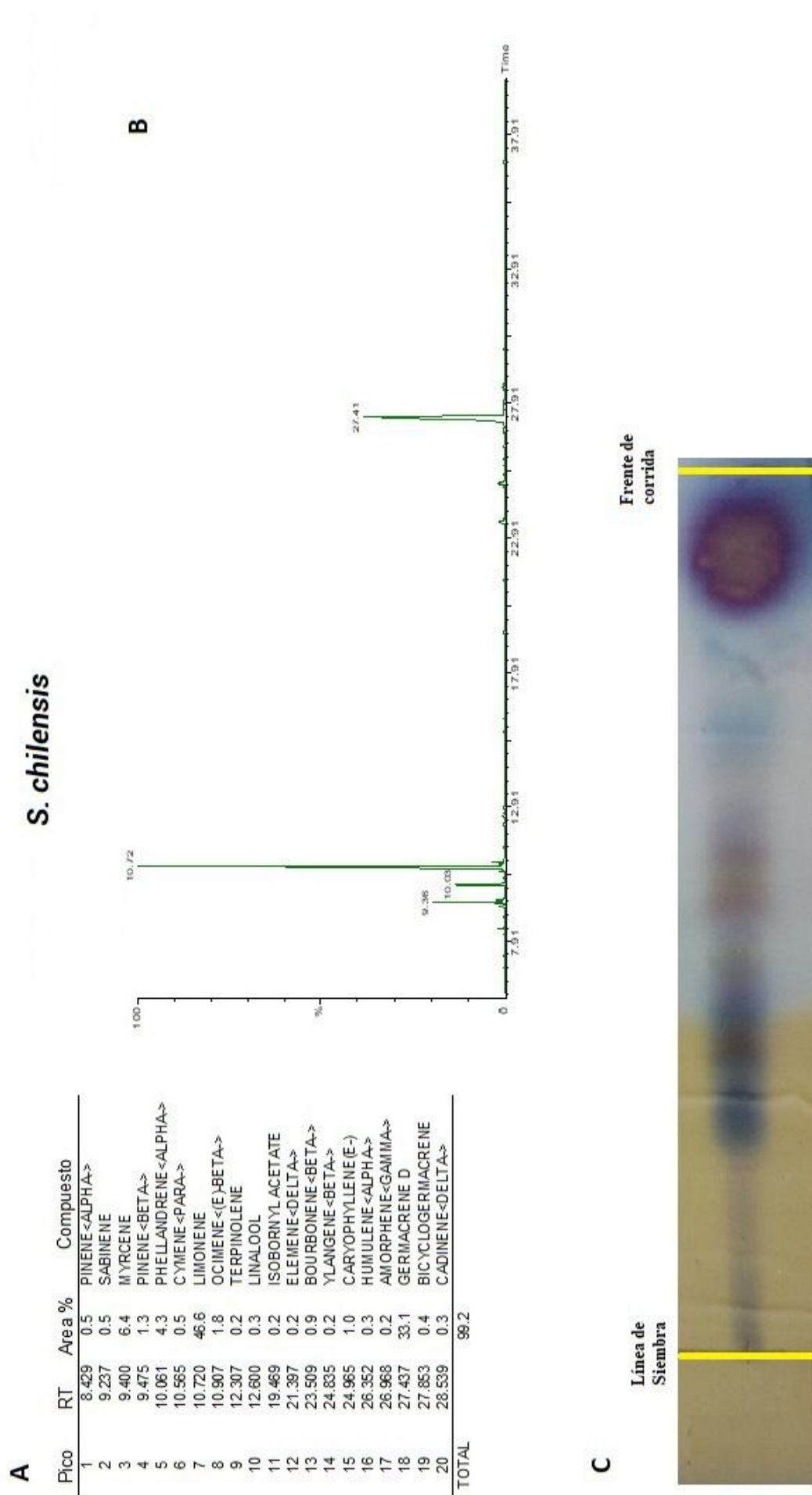


Fig 4.27. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de *S. chilensis*. A) Tabla de compuestos, B) Cromatograma, C) Cromatografía en capa delgada.

### 4.3.3. Otros metabolitos secundarios potencialmente bioactivos

#### Lactonas sesquiterpénicas

Los espectros infrarrojos (IR) realizados para extractos de diclorometano de las especies *A. australe* (Figura 4.28), *A. magellanica* (Figura 4.29), *D. andina* (Figura 4.30), *G. chilensis* (Figura 4.31), *M. sativa* (Figura 4.32) y *S. chilensis* (Figura 4.33) indicaron la ausencia de lactonas sesquiterpénicas. No se observó la absorción alrededor de 1800 cm<sup>-1</sup> correspondiente a las cetonas, ni la banda característica entre 1750-1800 cm<sup>-1</sup> que produce específicamente el grupo carbonilo de las gama-lactonas. De acuerdo a este criterio y en concordancia con [Ivanescu et al. \(2015\)](#), ninguno de estos extractos presentó lactonas sesquiterpénicas en cantidades significativas (mayor al 3%).

Por otro lado, en la especie *A. magellanica* (Figura 4.29), se visualizó la banda típica de entre 2100 y 2260 cm<sup>-1</sup> que corresponde a la presencia de triples enlaces, que se corresponden con la presencia del compuesto espiroeter-Z mencionado entre los compuestos volátiles para esta especie (resultados presentados en la sección anterior 4.3.2).

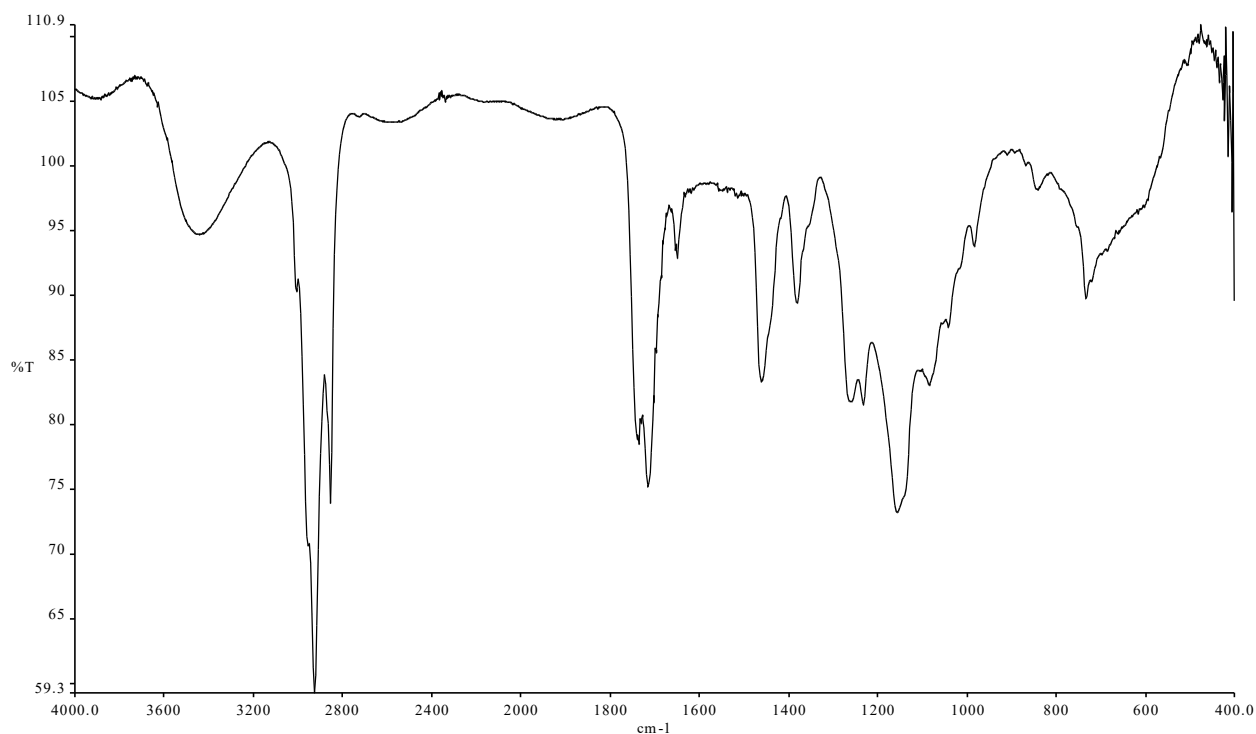


Figura 4.28. Espectro IR para *A. australe*.

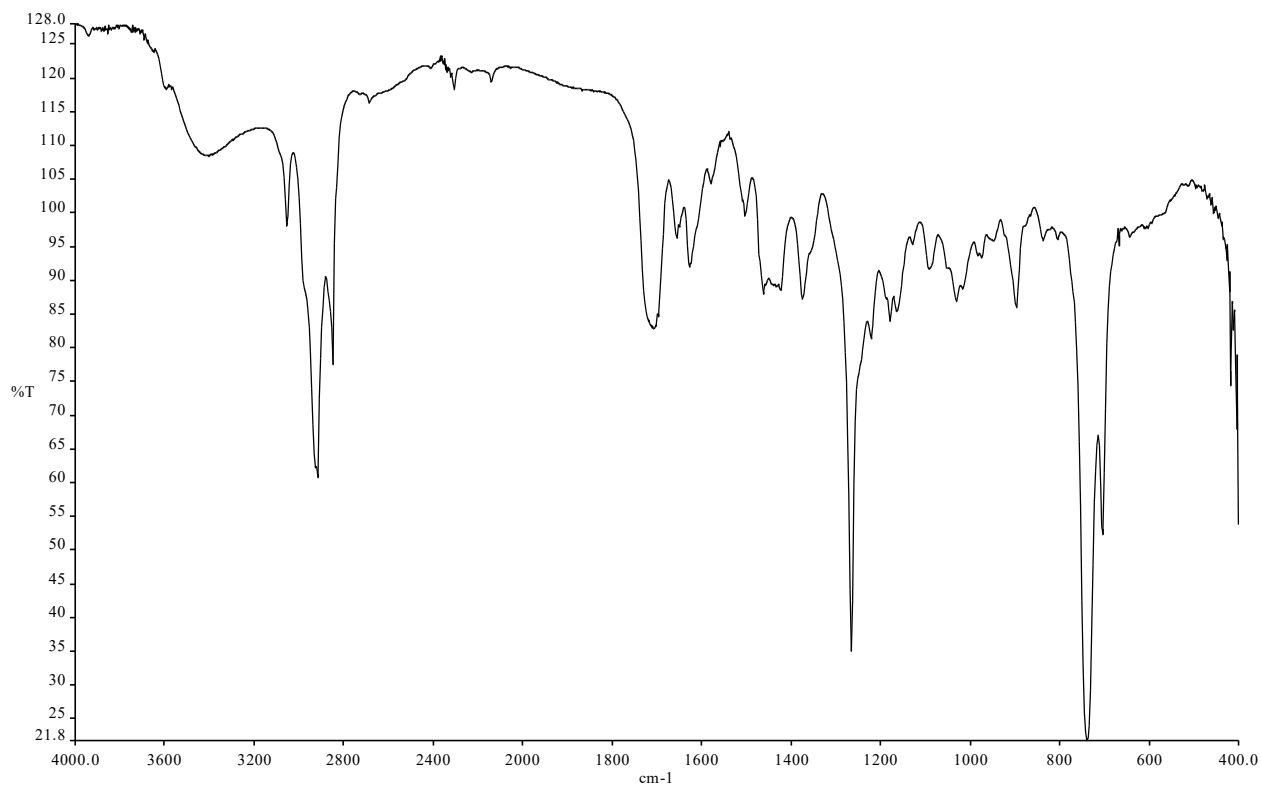


Figura 4.29. Espectro IR para *A. magellanica*.

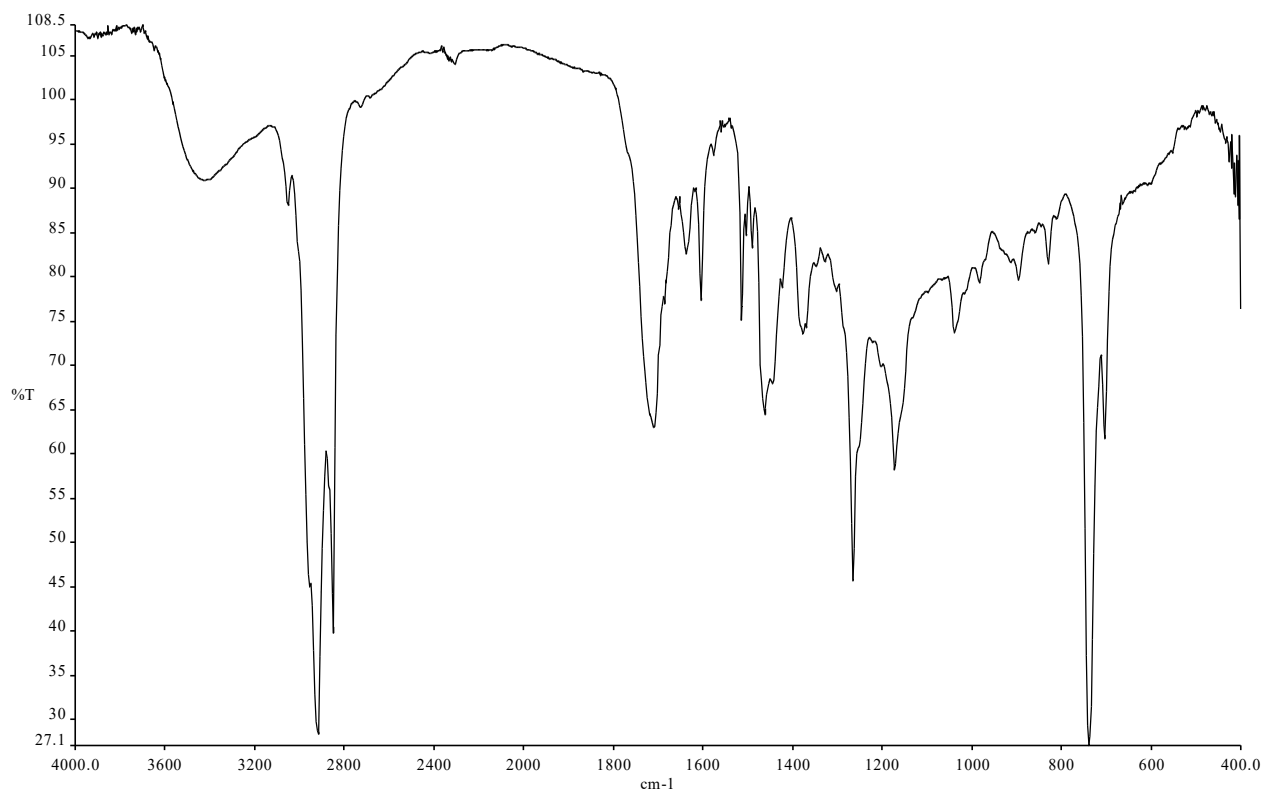


Figura 4.30. Espectro IR para *D. andina*.

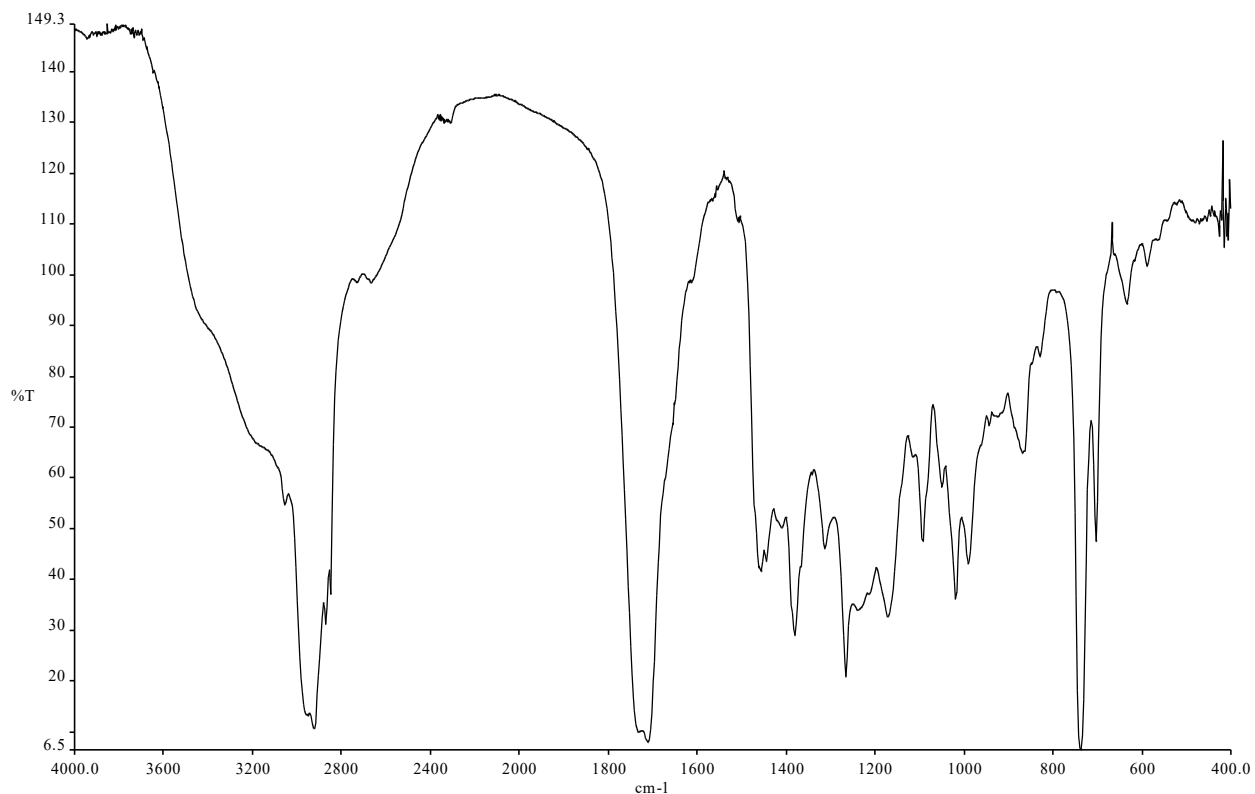


Figura 4.31. Espectro IR para *G. chilensis*.

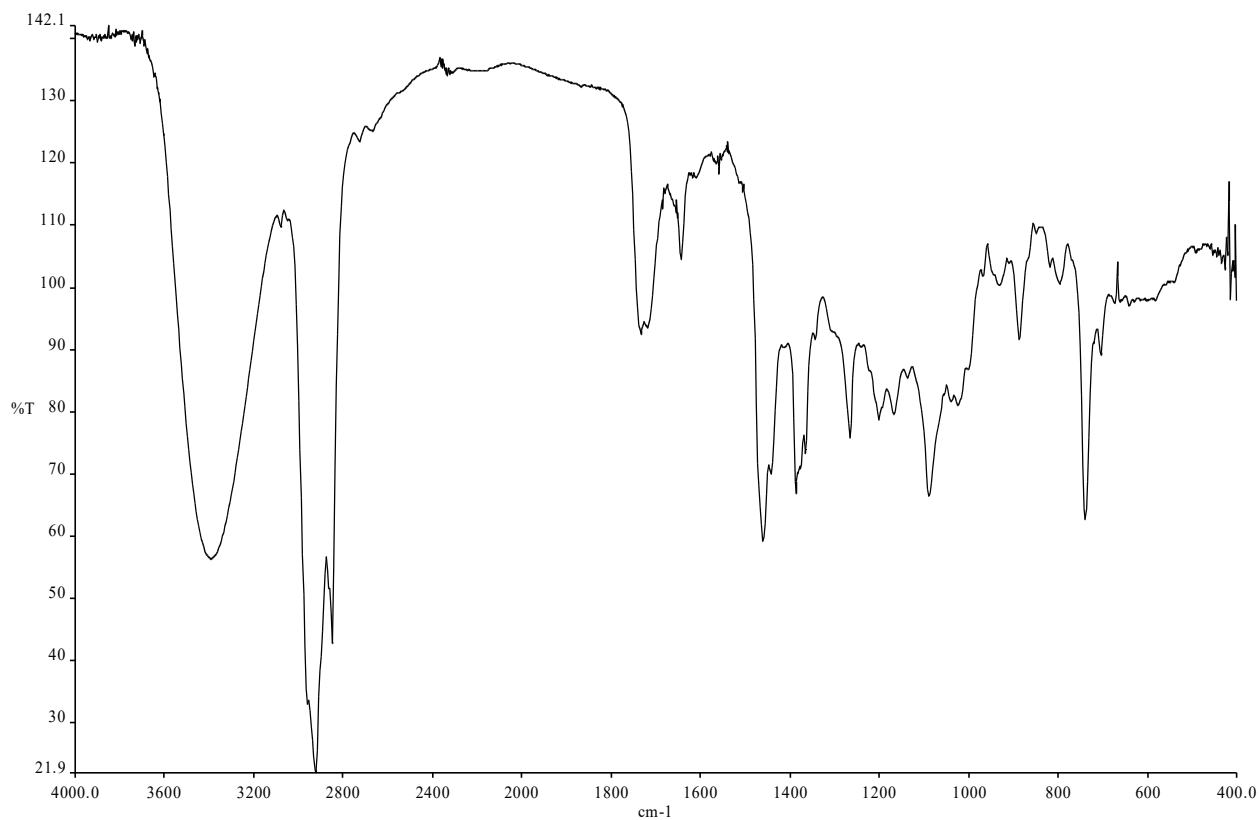
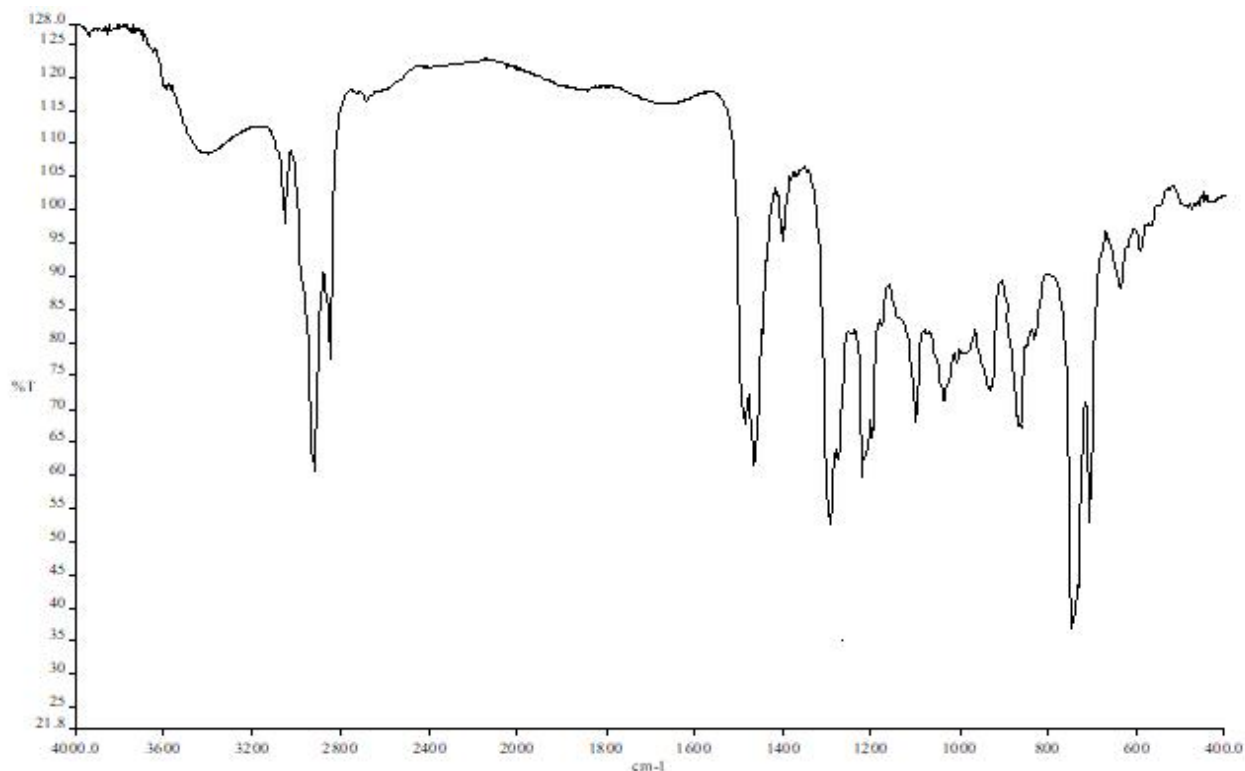


Figura 4.32. Espectro IR para *M. sativa*.



**Figura 4.33.** Espectro IR para *S. chilensis*.

#### *Diterpenos*

En concordancia con estudios previos, se detectaron diterpenos en *G. chilensis* (Mesurado *et al.*, 2017), *M. sativa* (Bohlmann *et al.*, 1982) y *S. chilensis* (Schmeda-Hirschmann, 1988). No se encontraron resultados novedosos para este grupo de compuestos.

#### *Cumarinas*

Las cumarinas no se detectaron en los distintos sistemas de TLC empleados, ya que no se observaron las manchas azules fluorescentes típicas que producen estos compuestos a 365 nm. Por otra parte se visualizaron correctamente en el extracto de referencia de la especie *Fabiana imbricata*. Esto indica que las especies estudiadas en esta tesis no contienen compuestos de este tipo en cantidades significativas.

## 4.4. CONCLUSIONES

En este trabajo se abordó por primera vez la caracterización de los compuestos fenólicos presentes en las infusiones de todas las especies estudiadas y los compuestos volátiles en el caso de los aceites esenciales de *A. australe*, *A. magellanica*, *D. andina*, *G. astragalina*, *G. chilensis* y *M. sativa*, lo que constituye un aporte significativo al conocimiento fitoquímico de relevancia ecológica para estas especies nativas de Patagonia. Las especies estudiadas no presentaron compuestos novedosos de interés dentro de los grupos fitoquímicos de las lactonas sesquiterpénicas, diterpenos ó cumarinas.

*Adesmia boronioides* tiene en su infusión tres compuestos flavonoides principales, siendo uno de ellos la rutina. El perfil de compuestos volátiles es complejo, se destaca el componente típico para esta especie, la esquelenona (17.8%).

*Apium australe* presenta seis compuestos fenólicos en su infusión. Se destacan el ácido cafeico y glicósidos de quercetina. Respecto a los compuestos volátiles, se observan en abundancia en su aceite esencial 20.4% de  $\alpha$ -pineno, 28 % de sabineno y 10% de terpinen-4-ol.

*Artemisia magellanica* también posee seis compuestos fenólicos principales, se destacan el ácido clorogénico, el ácido cafeico y derivados de quercetina. Entre los componentes volátiles se destacan  $\gamma$ -costol (21.0%, compuesto de importancia taxonómica), 2-metilbutil 2-metilbutirato (8.2 %), selina-4,11-dieno (5.9%), cis- $\beta$ -ocimeno (4.1 %), (E)- $\beta$ -farneseno (4.2%) y espiroeter-Z (3.5 %).

*Buddleja globosa* con cinco compuestos fenólicos principales se destaca particularmente por su compuesto mayoritario, verbascósido. Esta especie no tiene cantidades significativas de compuestos volátiles en sus partes aéreas, extraíbles por hidrodestilación.

*Drymis andina* tiene en su infusión una notoria presencia de ácido clorogénico y cuatro compuestos del tipo flavonoide. Es muy rica en compuestos volátiles, tanto de bajo como alto peso molecular, se destacan  $\alpha$ -pineno (15.5%),  $\beta$ -pineno (18.4 %) y shiobunona (8.1 %).

*Dysphania multifida* es, dentro de las estudiadas, la infusión con menos variedad de compuestos, el principal es escoparina (un glicósido de isoramnetina). Entre los compuestos volátiles se encontraron  $\alpha$ -terpineno (19%), p-cimeno (18.2%), ascaridol (52.3%) y piperitona epóxido (8.4%).

*Glycyrrhiza astragalina* contiene en su infusión solo compuestos del tipo flavonoide. Se detectaron cuatro compuestos principales, entre los que sobresale la rutina. Su perfil de componentes volátiles es complejo, se destaca un el elevado contenido de cariofileno (32.3 %).

*Grindelia chilensis* posee ácido clorogénico, ácido isoclorogénico y ácido cafeico sumados a un flavonoide oligósido. Los compuestos volátiles mayoritarios de su aceite esencial fueron  $\delta$ -3-careno (11.6 %), limoneno (22.9 %) y terpinen-4-ol (11.4%).

*Madia sativa* tiene principalmente ácido clorogénico, ácido cafeico y quercetina en su infusión. Entre los compuestos volátiles se destacan  $\alpha$ -pineno (32.3%), terpineol (31.6%) y farnesol (6.9%).

*Solidago chilensis* posee dos compuestos fenólicos de forma muy notoria, rutina y ácido clorogénico. También en su fracción volátil posee dos componentes principales: limoneno (46.6 %) y D-germacreno (33.1%).

## **CAPÍTULO 5.**

# **ACTIVIDAD CITOTÓXICA, TOXICIDAD GENERAL, GENOTOXICIDAD y POTENCIAL ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA**

## 5.1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El cáncer es el nombre común que recibe un conjunto de enfermedades relacionadas, en las que se observa un proceso descontrolado en la división de las células del cuerpo. Este proceso se inicia como una neoplasia, definida como una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede a los tejidos normales circundantes y no está coordinado con estos. El cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: la proliferación de un grupo de células, denominado tumor o neoplasia, y la capacidad invasiva que les permite colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis. Se conocen más de cien tipos diferentes de cáncer, siendo los más comunes: de piel, de pulmón, de mama y colorrectal ([National Cancer Institute, 2019](#)).

El cáncer colorrectal, también denominado cáncer de colon, es uno de los tipos de esta enfermedad más diagnosticados en el mundo ([Kolligs, 2016](#)). En 2012, se diagnosticaron 1,4 millones de casos en todo el mundo ([Tabung et al., 2017](#)). El cáncer de colon sigue siendo una de las principales causas de muerte por esta patología, con 700.000 muertes anuales tanto en hombres como en mujeres ([Raskov et al., 2017](#); [Torre et al., 2015](#)).

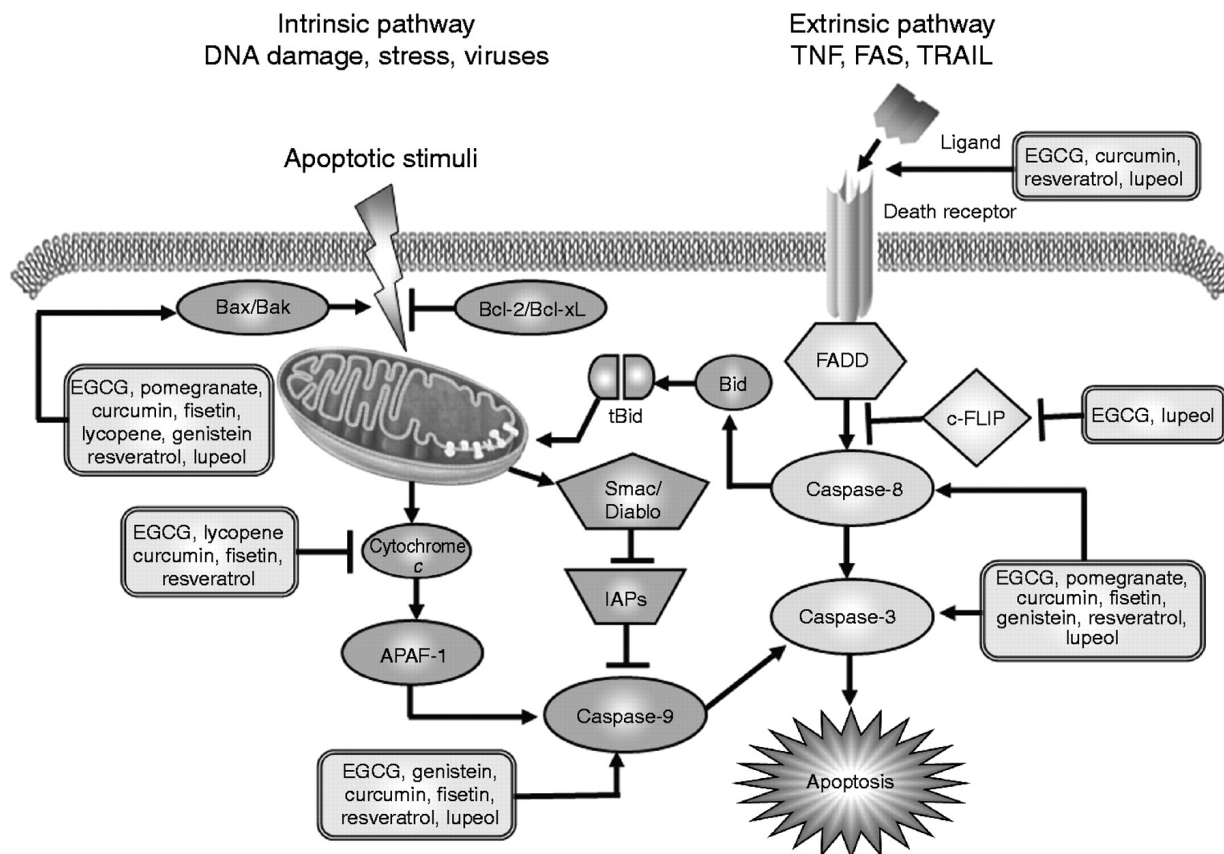
La actividad terapéutica de la mayoría de los fármacos contra el cáncer en uso clínico está limitada a su toxicidad general para las células en proliferación, incluyendo algunas células normales del cuerpo humano lo que muchas veces genera efectos secundarios indeseables y no logra tener la eficacia terapéutica deseada. Aunque las investigaciones farmacológicas continúan desarrollando nuevos agentes citotóxicos con mecanismos de acción únicos, muchos de estos compuestos aún carecen de selectividad tumoral y no han sido terapéuticamente útiles ([Chari, 2008](#)). En este contexto existe un creciente interés en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas y quimiopreventivas, como por ejemplo los anticuerpos monoclonales de síntesis o los productos naturales y extractos derivados de plantas ([Cragg y Newman, 2005](#); [Chari, 2008](#); [Li et al., 2013](#)).

Se han identificado ciertos factores genéticos y epigenéticos que podrían contribuir al inicio del cáncer de colon. Sin embargo, se considera que más del 70% del total de los casos son atribuibles a factores ambientales tales como una dieta nutricionalmente desbalanceada (pobre en fitonutrientes, baja en fibra y alta en grasas), enfermedades previas relacionadas a síndromes metabólicos (diabetes mellitus, obesidad, entre otros) e inactividad física, sumados a otras causas atribuibles a la industrialización y el estilo de vida sedentario ([Vipperla and O'Keefe, 2016](#)). De hecho, la cantidad de casos se ha incrementado notablemente en países que han adoptado las características sociales y económicas de la industrialización ([Torre et al., 2015](#)). Estudios realizados en la última década han revelado que los factores asociados a un estilo de vida sedentario pueden desbalancear el equilibrio microbiano de la microbiota normal del intestino y desencadenar de esta forma el cáncer colorrectal. La carcinogénesis puede ocurrir por medio de la alteración del perfil metabólico intestinal, desregulando la respuesta inmune, afectando procesos moleculares en los colonocitos e induciendo a la mutagénesis ([Drewes et al., 2016](#); [Hold, 2016](#); [Meng et al., 2018](#); [Raskov et al., 2017](#)). Puede afirmarse que el rol de una dieta saludable en la prevención, desarrollo y tratamiento del cáncer de colon es central. En este

aspecto son muy importantes los alimentos derivados de plantas que contienen fitonutrientes beneficiosos para la salud, en particular compuestos fenólicos y flavonoides (Li *et al.*, 2013).

Se propone que la actividad antioxidante, la actividad antiinflamatoria, la inducción de enzimas de fase II, la detención del ciclo celular y la activación de la apoptosis selectiva sobre células malignas son distintos caminos por los que los compuestos dietarios naturales son quimiopreventivos del cáncer (Pan y Ho, 2008). Estos procesos pueden desencadenarse a través de distintas cascadas de señalización intracelular que actúan como dianas moleculares (Pan y Ho, 2008; Fraga y Oteiza, 2011; Greenwell y Rahman 2015).

La apoptosis es un proceso de muerte celular programa, se puede conceptualizar como un tipo de muerte celular organizada, a diferencia de otros tipos de muerte celular (como por ejemplo la necrosis). Puede desencadenarse por dos mecanismos principales (Figura 5.1), por la vía de la mitocondria o por la vía de los receptores de muerte celular (de la membrana) (Pan y Ho, 2008). Es deseable que las sustancias anticancerígenas provoquen la muerte de las células malignas desencadenando su apoptosis, de esta forma la muerte celular ocurre de forma controlada y no genera una mayor inflamación. El proceso de apoptosis posee características morfológicas y bioquímicas bien caracterizadas. Una célula en estado de apoptosis presenta contracción celular, forma vesículas de membrana también llamadas cuerpos apoptóticos, la cromatina se condensa a la vez que el ADN se fragmenta de forma escalonada y ordenada en las regiones de los nucleosomas (Pan y Ho, 2008; Ashkenasi A y Salvesen G, 2014). Cabe señalar que un efecto antiproliferativo de un extracto vegetal sobre células de cáncer puede deberse a un efecto aditivo, multinivel o incluso sinérgico de sus componentes (Eid *et al.*, 2012; Koosha *et al.*, 2016). De acuerdo con Rosa *et al.* (2016) el rol de los compuestos fenólicos en las cascadas de señales de células de cáncer es un tema de investigación actual, sobre el que es necesario generar mayor información.



**Figura 5.1.** Esquema simplificado de las principales vías que activan la muerte celular por el mecanismo de apoptosis, la vía intrínseca activada por la mitocondria y la vía de los receptores de membrana. Se muestran las principales cascadas de señales involucradas y los distintos puntos en los que pueden interactuar los fitonutrientes, desencadenando la apoptosis en células derivadas de cáncer (Naghna *et al.*, 2010).

Otro aspecto a considerar en relación a los efectos de los compuestos fenólicos sobre las células intestinales del colon, son las transformaciones de estos fitonutrientes en el tracto digestivo que afectan su estructura y biodisponibilidad. De acuerdo con Fraga *et al.* (2010), los flavonoides se pueden hidrolizar parcialmente en el estómago debido al pH ácido, los flavonoides glucósidos perderían así sus azúcares. A continuación, en el intestino delgado puede existir cierta absorción directa de estos esqueletos flavonoides agliconas. Finalmente en el tramo final del intestino grueso (colon) ocurre un proceso muy importante, la abundante microflora intestinal transforma los flavonoides agliconas en ácidos fenólicos, por esta razón el epitelio intestinal en la región del colon tiene principalmente contacto con flavonoides y ácidos fenólicos. Los ácidos fenólicos son los principales metabolitos absorbidos por el epitelio intestinal, las investigaciones actuales sugieren que la absorción puede darse por difusión transcelular o por la intervención de proteínas transportadoras de carboxilatos (con isoformas aún no esclarecidas).

En el caso del cáncer de colon en particular, a diferencia del cáncer en otros tejidos, adquieren mucha relevancia los estudios con modelos celulares. Los extractos vegetales y los fitonutrientes que estos contienen, toman contacto directo con las células de la pared intestinal luego de atravesar el tubo digestivo. Por ello es que, en este caso los efectos observados *in vitro* pueden resultar muy útiles al corresponderse con los posibles efectos *in vivo*. Una infusión de una planta medicinal y aromática es una bebida que luego de ser ingerida toma rápidamente contacto con el epitelio intestinal.

La actividad citotóxica de un extracto vegetal puede definirse como la propiedad que posee dicho extracto para producir lesiones, daños o efectos nocivos sobre células y organismos (Hogson 2004; Arebola *et al.*, 2009). Los estudios de actividad citotóxica pueden abordarse desde distintas disciplinas y con diversos objetivos. Se han propuesto numerosos modelos y sistemas de estudio tanto *in vitro* como *in vivo*. Actualmente existe un creciente interés de parte de la comunidad científica en aplicar de forma integral los principios de las tres RRR (reemplazo, reducción, refinamiento), principalmente para minimizar el uso de modelos animales mamíferos. En este contexto adquieren relevancia los estudios de citotoxicidad basados en organismos alternativos (no mamíferos) y cultivos celulares, los cuales deberían formar parte de las “estrategias de prueba integradas” a utilizar antes de experimentar con modelos de animales mamíferos superiores (Lilienblum *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista de los estudios de caracterización de extractos de plantas, que es el enfoque central de este trabajo, en este capítulo se abordó el estudio de la actividad citotóxica desde dos orientaciones principales: por un lado se busca indagar acerca de la seguridad en el consumo y en la utilización de dichos extractos, por otro lado se evalúa la citotoxicidad sobre líneas celulares derivadas de cáncer como un primer análisis de la potencial actividad anticancerígena que podrían tener los extractos de las plantas estudiadas. Con ambos enfoques se analizaron las infusiones de las plantas seleccionadas para este trabajo.

En esta sección se mostrará el desarrollo secuencial de tres grupos de ensayos de actividad citotóxica:

- 1) bioensayo de toxicidad general con el organismo modelo *Artemia salina*. Se trata de un crustáceo ampliamente usado como indicador de toxicidad general y citotoxicidad (Rhaman *et al.*, 2005); su utilización resulta muy útil como ensayo previo a estudios de citotoxicidad más específicos con líneas celulares (Anderson *et al.*, 1991; Rajabi *et al.*, 2015).
- 2) bioensayo de toxicidad general, actividad mitodepresiva y genotoxicidad con el modelo de *Allium cepa*. Es también considerado un ensayo de toxicidad general que permite medir el efecto de extractos vegetales sobre el normal crecimiento y desarrollo de las raíces de este organismo. Se considera un ensayo de toxicidad general, que a la vez permite discutir y profundizar sobre algunos posibles efectos genotóxicos relacionados con el riesgo de toxicidad crónica a mediano o largo plazo (Andrioli, 2011; Leite *et al.*, 2015).
- 3) bioensayos de actividad citotóxica sobre líneas celulares (Kogiannou *et al.*, 2013; Kaliora *et al.*, 2014). De esta forma se estudia específicamente si las infusiones de las especies seleccionadas son bioactivas sobre la división y proliferación celular en líneas derivadas de cáncer de colon.

*Artemia salina* es un crustáceo que habita ecosistemas hipersalinos con un período de generación relativamente corto (alrededor de 20 días). Los embriones encapsulados pueden mantenerse viables, en estado desecado, durante décadas. En su desarrollo atraviesan diversos estadios naupliares o larvarios hasta llegar a adultos. Se los utiliza para bioensayos generalmente

48-72 horas luego de la incubación de los huevos cuando las larvas se encuentran en el período de metanauplio. Hasta la fecha es la única especie conocida en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua, ya que suele utilizarse como fuente de alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha constituido un elemento clave en el éxito de su utilización como bioensayo (Bussmann *et al.*, 2011). La disponibilidad permanente de huevos a partir de los cuales pueden ser obtenidas las larvas ofrece ventajas como: I) no hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente, II) las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario y III) se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica.

Este bioensayo se considera una herramienta útil para evaluar la toxicidad de extractos de plantas, hongos, metales pesados, pesticidas y hasta de materiales dentales (Rhaman *et al.*, 2005; Perez y Lazo, 2010; Bussmann *et al.*, 2011; Leite *et al.*, 2015). Se basa en testear el producto de interés a diferentes concentraciones, generando una curva concentración-respuesta. Se calcula el parámetro de concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), que es la concentración a la cual se produce la muerte del 50 % de las larvas. El valor de CL<sub>50</sub> es muy útil para comparar los resultados entre diversos autores y permite saber si la muestra se encuentra dentro de valores de toxicidad útiles para otros ensayos. Su puesta a punto inicial y utilización para evaluar productos derivados de plantas se atribuye a Meyer *et al.* (1982), y se ha continuado su utilización hasta la actualidad (Mongelli *et al.*, 1995; Bidau *et al.*, 2006; Bussmann *et al.*, 2011, Hamidi *et al.*, 2014). Por ello, el bioensayo de *Artemia salina* se encuentra estandarizado y es ampliamente utilizado como indicador de toxicidad general en diversas áreas, siendo eficaz, seguro y reproducible.

Algunos autores plantean que *A. salina* presenta una gran correlación con ensayos de toxicidad en líneas celulares, lo que lo vuelve muy útil como paso previo a estudios de citotoxicidad más específicos con cultivos de células humanas (Anderson *et al.*, 1991; Garle *et al.*, 1994; Rajabi *et al.*, 2015). Debido a esto último, algunos autores llegan a considerarlo directamente un bioensayo antitumoral (Hazra y Charttejee, 2008), aunque esto no sería correcto, ya que si se habla de antitumoral debería implicar la utilización de un modelo que desarrolle un tumor, en general un ratón (Rhaman *et al.*, 2005). Además, los datos obtenidos con este bioensayo se correlacionan con los valores de toxicidad aguda en modelos animales (Parra *et al.*, 2001; Hamidi *et al.*, 2014), lo que resalta su importancia para ensayos pre-clínicos.

El ensayo de genotoxicidad con el modelo de *Allium cepa* es actualmente muy utilizado para monitoreo de contaminación ambiental (Seviram *et al.*, 2018). También es ampliamente utilizado en el área de productos naturales derivados de las plantas. La propuesta del test de *Allium cepa* se atribuye a Fiskesjö (1985), quien lo continuó desarrollando y estandarizando en los sucesivos años (Fiskesjö 1988; Fiskesjö 1997). Se considera un bioensayo que permite determinar la toxicidad general y genotoxicidad de las muestras a estudiar, a partir de la observación del crecimiento y la formación de aberraciones cromosómicas en las células del ápice radical de la cebolla (*Allium cepa*). Kumar *et al.* (2000) señalan que las raíces de plantas superiores, por ser sistemas no fotosintéticos y libres de cloroplastos, presentan reacciones

similares a las de los tejidos y células de los vertebrados, por lo que serían tan válidas como los grupos celulares de los mamíferos para detectar citotoxicidad basal. El ensayo tiene amplia utilización como modelo de evaluación de daño cromosomal (Amedh et al., 2017; Seviram et al., 2018) y ha sido sugerido como un ensayo de toxicidad robusto en reemplazo al uso de animales. Hoy en día se lo reconoce como un modelo de toxicidad ampliamente estandarizado, seguro y útil. Bidau et al. (2006), consideran este test más sensible que *A. salina* para evaluar citotoxicidad. Se considera nivel *in vivo* ya que involucra el estudio de un organismo completo (Andrioli, 2012). En este trabajo de investigación se utilizó el test de *Allium cepa* para evaluar la posible toxicidad de las infusiones de las especies estudiadas y además para analizar posibles efectos de estos extractos sobre la mitosis y el ciclo celular.

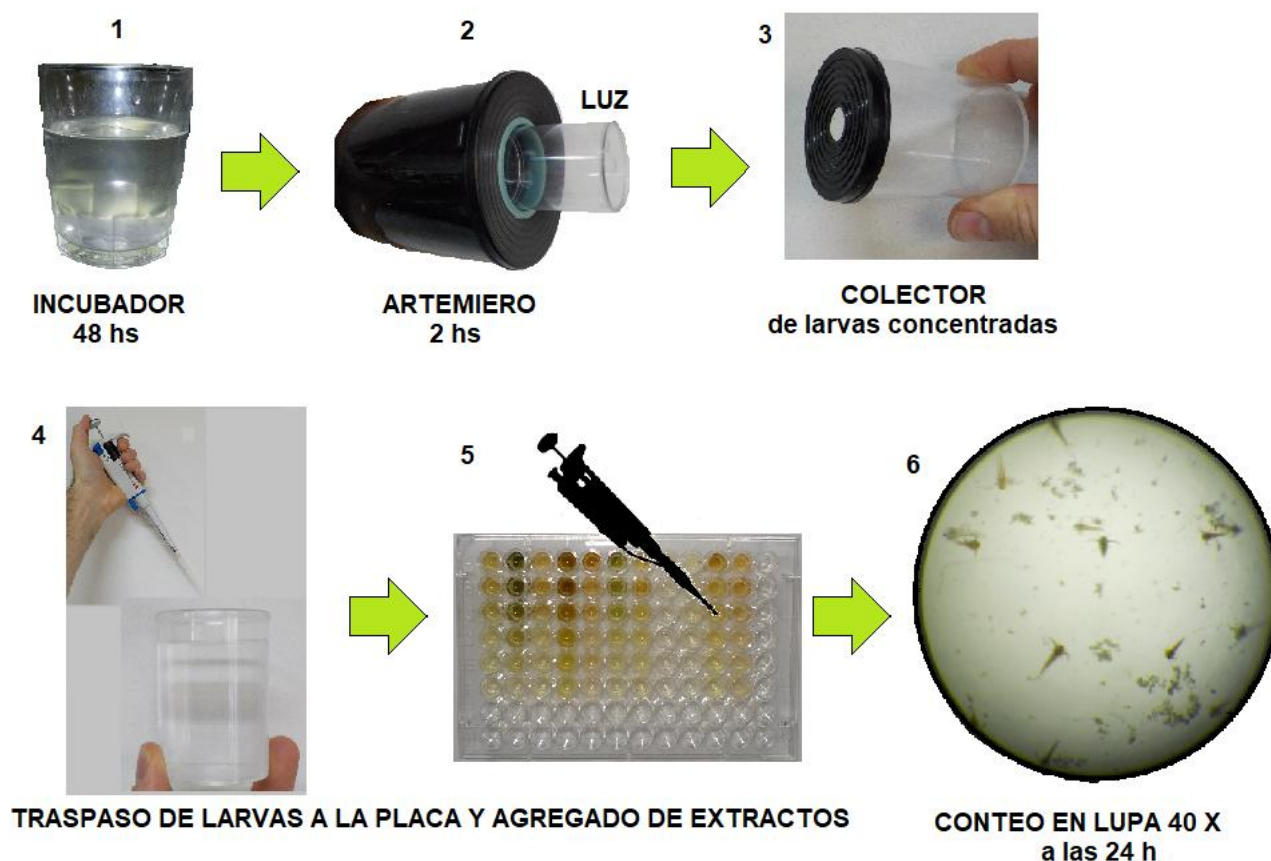
Los cultivos de líneas celulares son considerados desde hace más de 20 años los modelos no animales más promisorios para modelar distintas patologías. Su empleo en la evaluación de la citotoxicidad es un técnica pertinente que está ampliamente difundida (Nahibi et al., 2014). Los cultivos celulares son considerados un sistema biológico completo que representa, de forma simplificada, las características fisiológicas fundamentales de un tejido u órgano de interés. El trabajo con líneas celulares presenta numerosos beneficios, tales como tratarse de sistemas altamente reproducibles, permitir el análisis de mecanismos bioquímicos celulares y moleculares, requerir pequeñas cantidades de sustancias y reactivos, ser de relativamente fácil disponibilidad y permitir el análisis de un compuesto o extracto en una amplia gama de concentraciones. Además, representan una alternativa al uso de animales de experimentación (Telanq y Katdare, 2007). La actividad citotóxica suele evaluarse midiendo la proliferación de las células, relacionando el nivel de proliferación basal y la respuesta al agente citotóxico al que se exponen. Un método estandarizado y difundido para evaluar la supervivencia celular es el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Esta sal de tetrazolio posee una forma soluble de color amarillo que se transforma en un compuesto de color azul insoluble (formazán) por la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas. Se considera que la cantidad de formazán que se produce en un cultivo celular es un indicador de actividad metabólica, directamente proporcional a la cantidad de células vivas (Kaliora et al., 2014; Nahibi et al., 2014).

El eje principal de esta sección se basa en analizar si las infusiones de las plantas patagónicas seleccionadas poseen potencial para inhibir la proliferación de células derivadas de cáncer de colon. En este capítulo se desarrolló básicamente el objetivo específico (f): estudiar la toxicidad general y la actividad citotóxica de las infusiones de las especies seleccionadas mediante bioensayos secuenciales y complementarios: modelo de *Artemia salina*, test de *Allium cepa* y citotoxicidad sobre células derivadas de cáncer de colon T-84, HT-29 y Caco-2.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

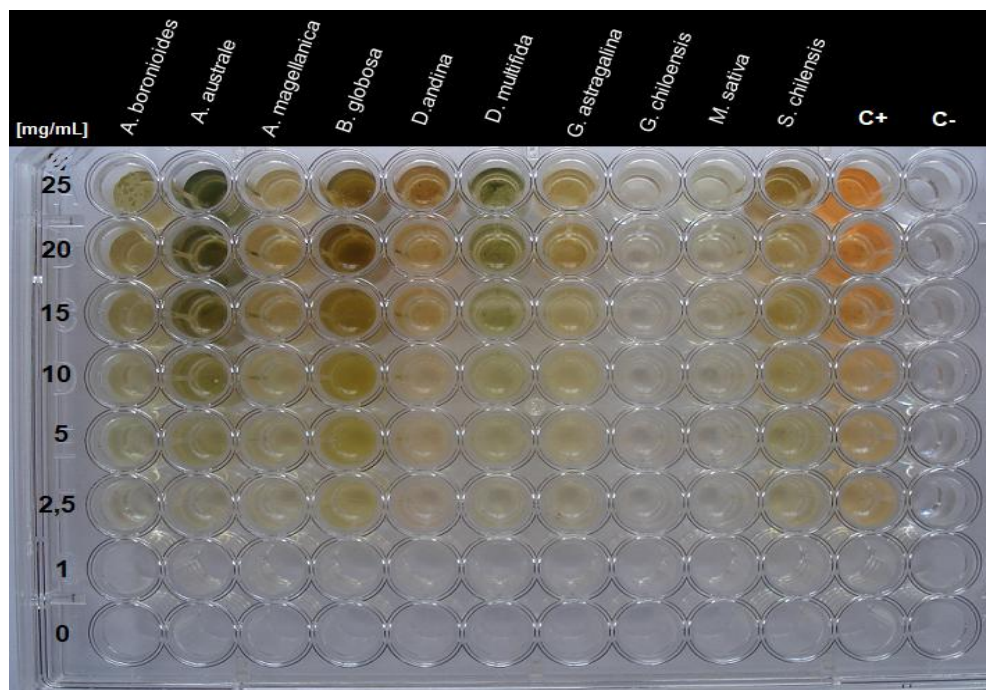
### 5.2.1. Toxicidad general mediante el bioensayo de *Artemia salina*

Para el desarrollo de este ensayo inicialmente se pesó 1 gramo de huevos de *Artemia salina*. Los huevos se colocaron en una pecera de incubación a 20 °C, en un volumen final de 2 litros de solución salina al 38 % (76 gramos de NaCl en 2 litros de agua destilada). Se colocó un aireador y se dejó incubando por 48-72 horas hasta que se observó la eclosión de las larvas. Las larvas fueron agrupadas con un dispositivo de uso normal en acuarios denominado “artemiero”, concentradas en sección transparente donde hay mayor iluminación (Figura 5.2). De allí se colectaron 10 +/- 2 larvas con un micropipeta de 1000 µl. De esta forma se colocaron aproximadamente 10 larvas de *A. salina* en cada uno de los 96 pocillos de una placa multipocillo, con un volumen final de 200 µl de solución salina al 38 %.



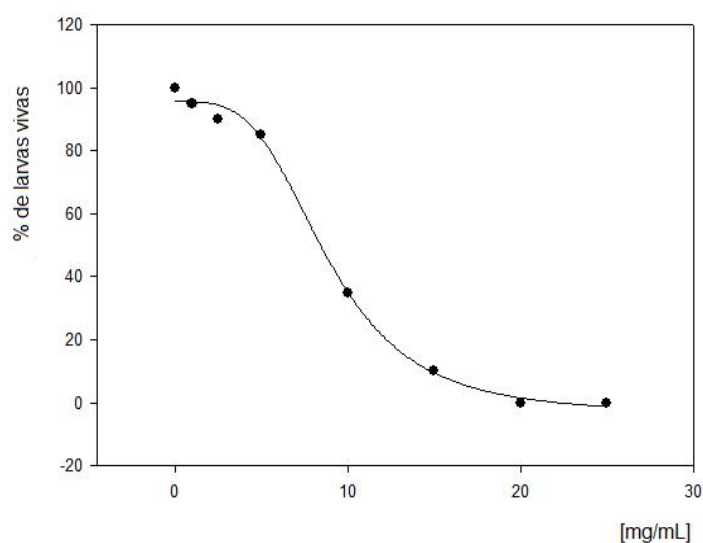
**Figura 5.2.** Esquema del proceso de obtención de larvas de *A. salina*, armado de placas y conteo final.

Se agregaron liofilizados de las infusiones con micropipetas automáticas, en un rango final de concentraciones de 0 a 25 mg/ml en cada uno de los pocillos de acuerdo a la Figura 5.3. El ensayo se repitió completo 5 veces, utilizando un control negativo que contenía solamente *A. salina*, y un control positivo con la sal dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) de acuerdo a (Molina-Salinas y Said-Fernández 2006).



**Fig 5.3.** Diseño del bioensayo de toxicidad general con *A. salina*. C+ es el control positivo utilizando un solución acuosa de  $K_2Cr_2O_7$  en un rango de 0-50  $\mu\text{g/ml}$ , C- es el control negativo que solo contiene larvas en agua salina.

Luego de 24 horas se observó cada pocillo con lupa binocular a 400X. Este tiempo se estableció de acuerdo con varios autores citados a lo largo de esta sección y a la estandarización internacional propuesta en la revisión del método por [Libralato et al. \(2016\)](#). Se contabilizaron las larvas muertas y vivas para cada tratamiento, se consideró larva muerta si al observarla durante 10 segundos esta no se mueve, para cada pocillo se expresó el % de larvas vivas. Con esto datos se constituyó una tabla que fue procesada con el programa SigmaPlot v12, obteniéndose de esta forma curvas que muestran el % de larvas vivas en función de la concentración de cada extracto (ejemplo en Figura 5.4).



**Figura 5.4.** Gráfico de ejemplo realizado en SigmaPlot v12 que muestra el % de larvas vivas en función de la concentración de extracto (n=5), por ajuste de regresión no lineal se obtiene el parámetro  $CL_{50}$ .

Luego las curvas se ajustaron por regresión no lineal para calcular la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), que es la concentración de extracto a la cual se mueren la mitad de las larvas. Los resultados de toxicidad general se expresaron para cada especie como CL<sub>50</sub> en mg de liofilizado por mililitro de agua salina. Si durante un experimento, el control negativo arrojaba una mortalidad basal del 15%, dicho ensayo se consideró inválido y no se tuvo en cuenta en los análisis. Para las especies en las que inicialmente se observó que la CL<sub>50</sub> ocurrió a concentraciones bajas, menores a 2,5 mg/ml, se rehízo el ensayo con un gradiente de concentraciones más bajas, de 0 a 2,5 mg/ml, con intervalos cada 0,25 mg/ml.

En cuanto al diseño experimental para este ensayo se realizó un modelo lineal simple trabajando con muestras compuestas de material vegetal por cada especie y 5 repeticiones. Cada muestra compuesta se obtuvo a partir de 7 individuos de la población. La unidad experimental fue cada pocillo de 200 µl de volumen final, sobre los que se realizaron 8 tratamientos por especie (0, 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 y 25 mg/ml de liofilizado) (Figura 5.3). En este caso la unidad de medición fue la larva y la variable de respuesta fue el % de larvas vivas por pocillo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía para comparar los valores del parámetro CL<sub>50</sub> entre las distintas especies, seguido del test de Tukey (comparaciones múltiples) con un nivel de significancia  $\alpha < 0,05$ , se verificó que se cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Software GraphPad v6, USA; Infostat, Argentina).

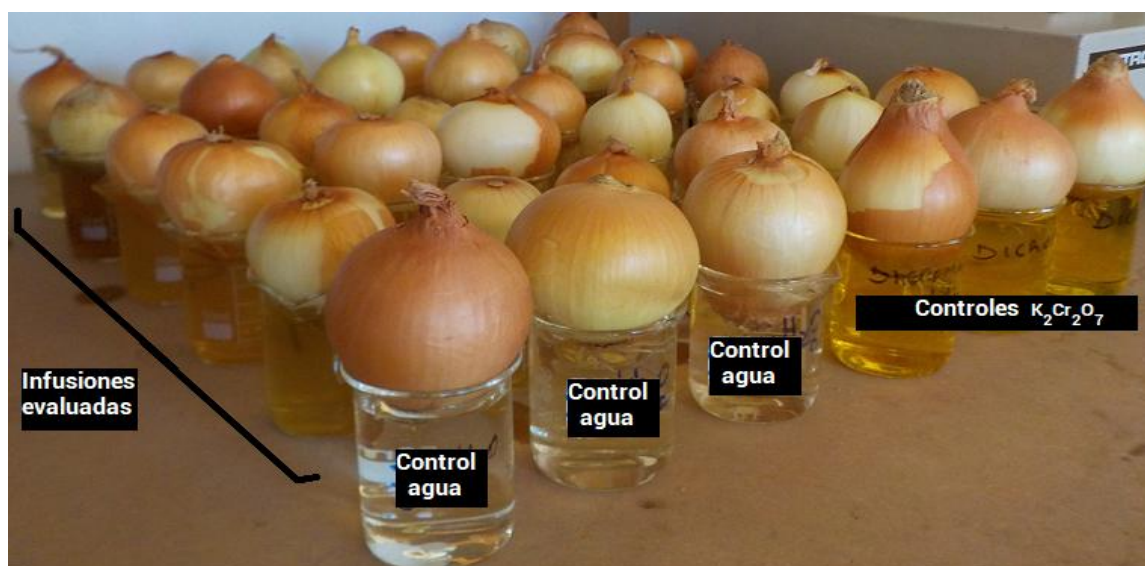
## 5.2.2. Toxicidad general y genotoxicidad mediante el test de *Allium cepa*

El protocolo de este ensayo se diseñó en base al utilizado por [Fiskesjö \(1985\)](#) y [Andrioli, \(2012\)](#). En un primer abordaje se observaron efectos sobre el largo radicular (crecimiento y elongación). Para el desarrollo de este experimento, se colocaron inicialmente bulbos limpios de *Allium cepa*, provenientes de la misma partida, en vasos de precipitado de 50 ml con agua destilada, durante 24 horas. Los bulbos fueron seleccionados de acuerdo a su uniformidad en el tamaño y buen aspecto externo. Luego de las 24 horas se seleccionaron los bulbos que comenzaron a extender al menos 7 raíces por bulbo con un largo de 2 mm, los bulbos que no extendieron raíces se descartaron. Los bulbos se colocaron en otros vasos de precipitado de 50 ml que contenían los tratamientos utilizados; en esta etapa se trabajó con un diseño experimental similar al utilizado para *A. salina* (5.2.1), aunque en este caso se trabajó con 3 repeticiones y los tratamientos utilizados fueron cinco: 0; 0,15; 1,5; 5 y 15 mg/ml. Se midió el largo de 5 raíces por bulbo. De esta forma (similar a como fue explicado para el ensayo anterior de *A. salina*) se calculó para cada infusión la concentración en la que la raíz crece en un 50% respecto del control, en este caso el parámetro se denomina concentración eficiente 50 (EC<sub>50</sub>). La comparación de los valores de EC<sub>50</sub> se realizó mediante test de ANOVA de una vía seguido del test de Tukey (comparaciones múltiples) con un nivel de significancia  $\alpha < 0,05$ , se verificó que se cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Software GraphPad v6, USA; Infostat, Argentina).

Una vez obtenido el valor de EC<sub>50</sub> para la infusión de cada especie, se procedió a la segunda etapa de este experimento, la que permite obtener los parámetros más importantes de

este ensayo: índice mitótico (IM) expresado en porcentaje, número de aberraciones cromosómicas y número de micronúcleos. El IM es un parámetro importante en este ensayo y ha sido utilizado como un criterio para evaluar la citotoxicidad de diversos agentes. Según [Smaka-Kinel et al. \(1996\)](#) las variaciones en el IM son un parámetro aceptable de citotoxicidad para todos los sistemas biológicos. Los niveles de citotoxicidad de un compuesto o extracto pueden ser determinados por el incremento o decremento en el IM ([Fernandes et al., 2007](#)). Por otro lado el número de anomalías cromosómicas indica si el agente evaluado produce citotoxicidad específica sobre los cromosomas, es decir indica si existe genotoxicidad. Este parámetro es central en este ensayo, un mayor número de anomalías implica mayor genotoxicidad ([Fiskesjö 1985](#); [Andrioli 2011](#); [Öskara et al., 2015](#)). El parámetro final de este ensayo es el número de micronúcleos, son considerados un tipo particular de anomalía cromosómica. Los micronúcleos se forman en el tejido en división de distintos organismos cuando éstos están sometidos ambientes tóxicos de diversa índole. Los micronúcleos son de particular importancia ya que son indicativos de la genotoxicidad crónica, un mayor número de micronúcleos se correlaciona con el inicio de procesos neoplásicos; es decir que la detección de esta aberración indica que la sustancia evaluada tiene potencial para originar procesos de división celular descontrolada y tumores ([Bolt et al., 2011](#)).

Para la segunda etapa del experimento se partió nuevamente de bulbos limpios, uniformes y que hayan extendido 7 raíces de 2 mm de largo (Figura 5.5). Cada bulbo constituye la unidad experimental, con tres repeticiones, sobre la que se realizó un único tratamiento (el valor de  $EC_{50}$  obtenido previamente, correspondiente a cada especie) durante 72 h de exposición. Luego de las 72 horas se realizaron preparados con las raíces (cortes y tinción) para observar las células al microscopio óptico y obtener el IM, el número de aberraciones cromosómicas y el número de micronúcleos.



**Figura 5.5.** Experimento para determinar el IM, el número de aberraciones cromosómicas y de micronúcleos a las concentraciones de  $EC_{50}$  para las infusiones determinada en un ensayo previo, se utilizaron 3 bulbos como repeticiones para evaluar cada infusión.

Para la realización de los preparados se procedió a cortar al menos 5 raíces por bulbo, teniendo la precaución de cortar los últimos 2 mm de la zona apical, en esta región de la raíz se

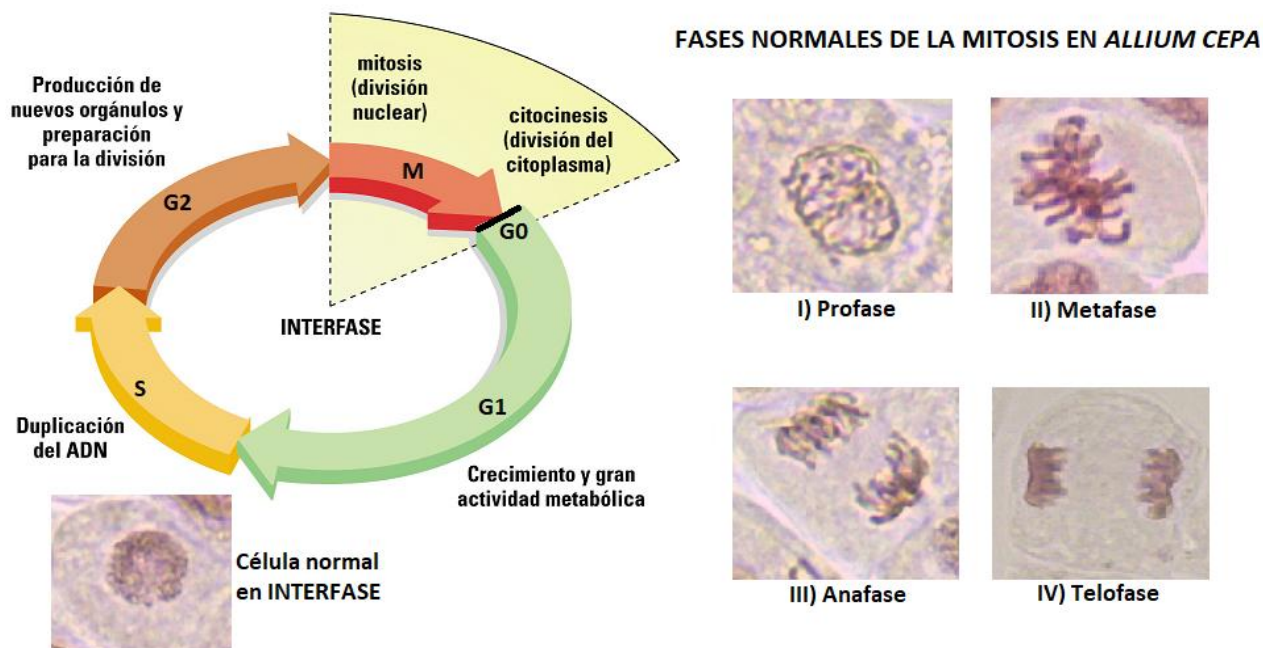
encuentra el tejido meristemático donde ocurre activamente la división mitótica de las células. Las puntas cortadas se las colocaron en una caja de Petri con ácido clorhídrico al 10% y se mantuvieron sumergidas por 6 min. Luego se realizaron tres lavados con agua destilada. De esta forma se logra la fijación de las células para proceder a la posterior tinción. Seguidamente los trozos de raíz se colocaron en otra caja de Petri donde fueron sumergidos en el colorante carmín acético (previamente preparado). Dicha caja fue llevada a llama moderada, hasta que se produjo la ebullición, momento en que precisamente se retiró de la llama, seguidamente se lavó con agua destilada tres veces. Si al observar el tejido estaba teñido de color rojo intenso, se consideró que la tinción fue correcta. Luego se procedió a realizar los preparados para observar el microscopio óptico mediante la técnica de "squash". Las muestras de tejido se colocaron en un porta objetos (3 a 5 unidades), seguidamente se desmembró el tejido con ayuda de una aguja histológica, se agregó una gota adicional de colorante (carmín acético) y se colocó el cubreobjetos. Finalmente los bordes de los preparados fueron sellados con esmalte transparente para asegurar su conservación.

Los preparados fueron observados a 400 X y fotografiados en un microscopio óptico Leica DM500 con cámara digital Leica ICC50HD. Se cuantificaron entre 500 células por bulbo, totalizando 1500 células observadas por tratamiento (Tedesco y Dail Laughinghouse 2012 ). Se cuantificaron los parámetros: I) índice mitótico, II) número de aberraciones cromosómicas y III) número de micronúcleos (Tedesco y Dail Laughinghouse 2012; Andrioli 2012). El índice mitótico expresa el porcentaje de células en división (profase, metafase, anafase y telofase) sobre el número total de células contabilizadas (Figura 5.6). El número de aberraciones y micronúcleos es el número de estas alteraciones cromosómicas contabilizadas por tratamiento (Andrioli, 2012; Tedesco y Dail Laughinghouse 2012).

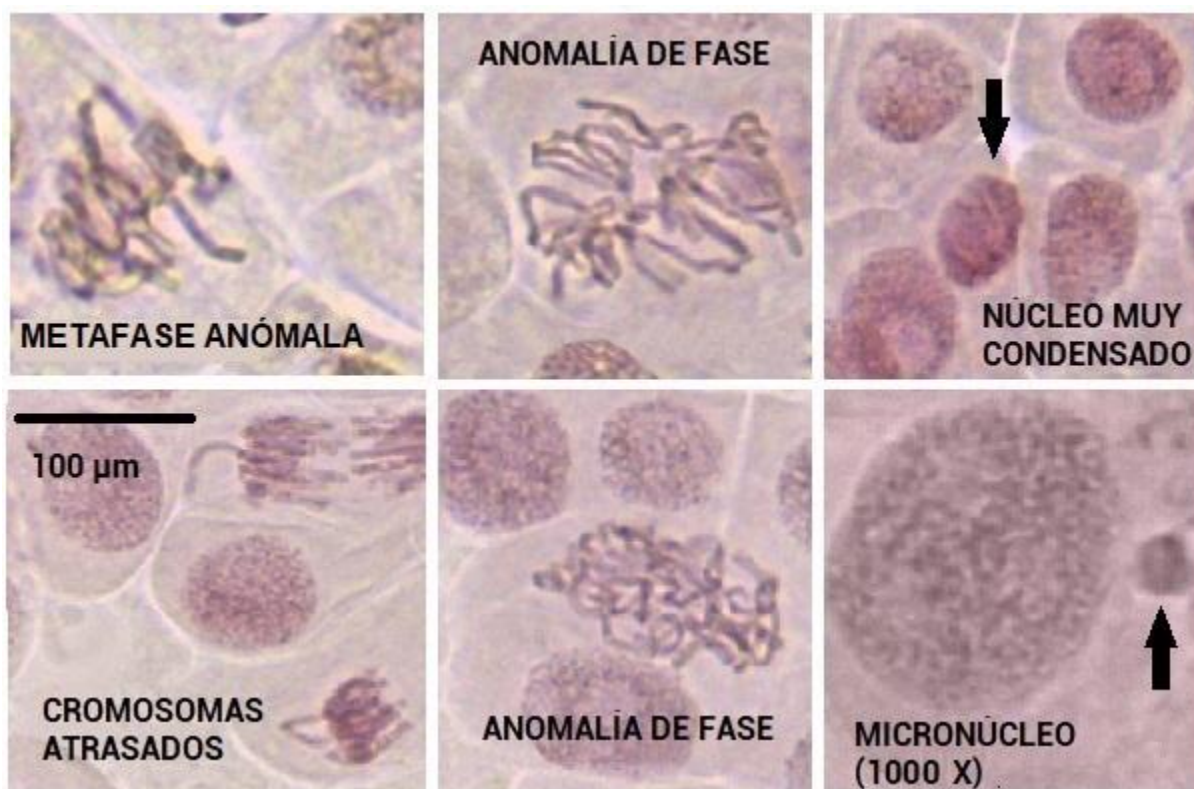
Las principales alteraciones cromosómicas que se visualizaron en este ensayo (Figura 5.7) fueron: aberraciones de anomalía de fase, es decir cuando se ven los cromosomas que no corresponden a una fase normal de la mitosis, ni tampoco a otra de las aberraciones típicas que se explican a continuación; metafase anómala, cuando los cromosomas están sobre el plano ecuatorial pero no están alineados de forma equidistante con los polos de la célula o no están organizados de manera equilibrada y armónica, los cromosomas pegajosos son también una variante de metafase anómala; cromosomas atrasados, en general ocurre durante la anafase y se observa uno o más cromosomas que no están migrando con el conjunto; núcleos muy condensados, se trata de un núcleo claramente más pequeño que el de las células normales en interfase, sin llegar a ser un micronúcleo; formación de micronúcleos, es un tipo particular de alteración cromosómica en la que se forma un núcleo muy pequeño luego de la división celular (Andrioli, 2012).

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía para comparar los valores de los parámetros medidos entre las distintas especies y contra los controles positivos y negativos, seguido del test de Tukey (comparaciones múltiples) con un nivel de significancia  $\alpha < 0,05$ , se verificó que se cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Software GraphPad v6, USA; Infostat, Argentina).

**ESQUEMA DEL PROCESO DE DIVISIÓN CELULAR**



**Figura 5.6.** Esquema del ciclo celular para las células en división de la raíz de *Allium cepa*. Se presentan las dos fases principales de Interfase y Mitosis. Además se muestran fotografías obtenidas durante la puesta a punto de este ensayo para las distintas fases de la Mitosis: I) Profase II) Metafase III) Anafase y IV) Telofase. El porcentaje de células en división sobre el total de células contabilizadas constituye el parámetro índice mitótico (IM %) en este experimento.



**Figura 5.7.** Fotografías con ejemplos de los principales tipos de aberraciones cromosómicas observadas a 400 X en la puesta a punto de este método, se muestra 1000 X en el caso de la vista del micronúcleo con el objetivo de visualizar su tamaño al lado de un núcleo normal.

### 5.2.3. Citotoxicidad sobre líneas celulares HTR8/SVneo, T84, HT-29 y Caco-2

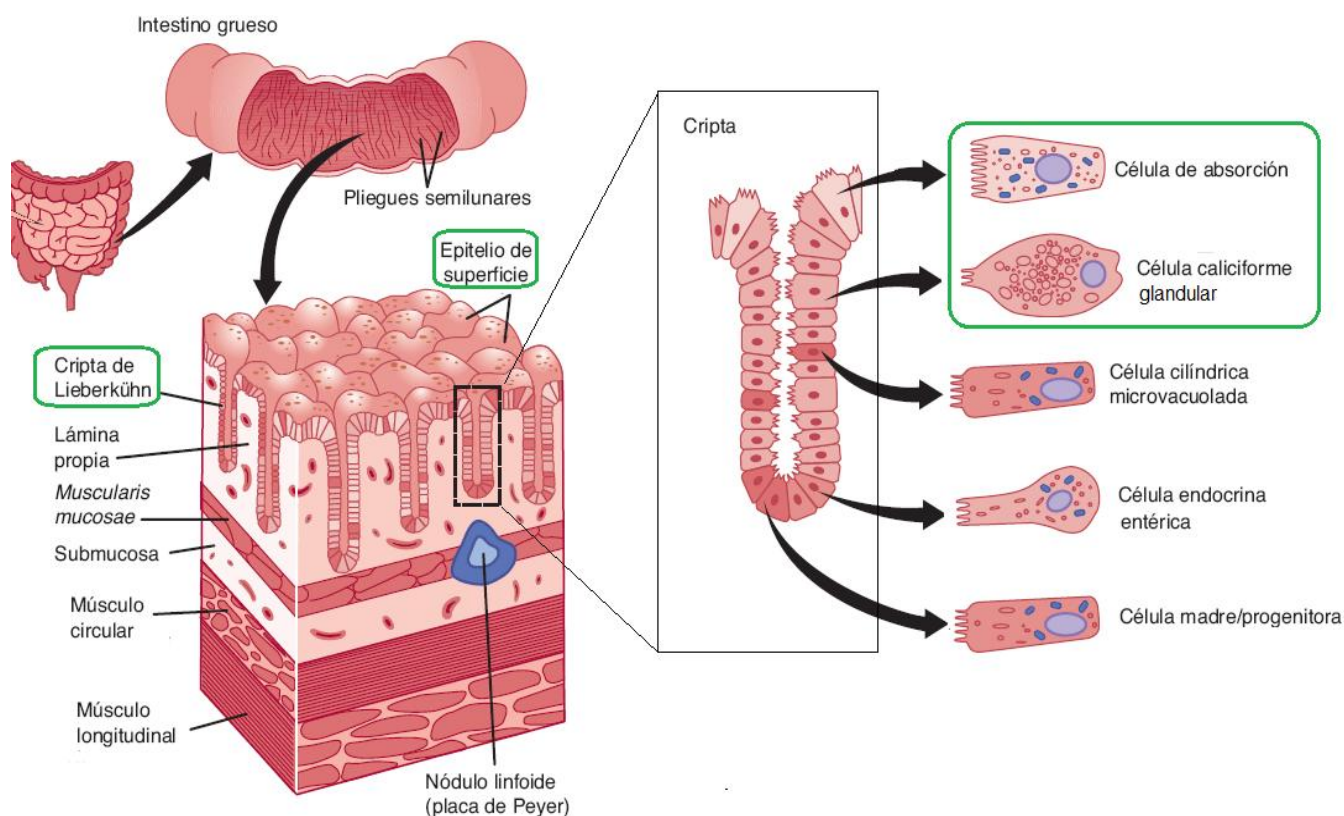
#### *Ensayo de proliferación celular por método del MMT*

La actividad citotóxica de los liofilizados se estudio sobre tres cultivos de líneas celulares derivadas de cáncer de colon (T84, HT-29 y Caco-2) y sobre una línea celular no derivada de cáncer (HTR8/SVneo). Estos ensayos se realizaron en colaboración de la Dra. Gabriela Marino, en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (Buenos Aires, Argentina), durante tres estadías de investigación: Julio-Agosto de 2016, Agosto de 2017, y Junio-Julio de 2018.

T84 y Caco-2 son líneas celulares originadas a partir de adenocarcinoma de colon humano, con la salvedad que la línea T84 surge de una metástasis pulmonar, mientras que Caco-2 derivan del sitio primario del tumor. En cultivo, son las únicas dos líneas celulares epiteliales intestinales conocidas por diferenciarse espontáneamente en una monocapa celular de absorción estructural y funcionalmente madura (Natoli *et al.*, 2011). El fenotipo diferenciado se caracteriza por una morfología celular columnar polarizada, la formación de uniones estrechas que separan el apical de los compartimentos de la membrana basolateral, y la apariencia de un borde de cepillo apical con microvellosidades (Sambuy *et al.*, 2005). Ambas líneas son frecuentemente utilizadas como modelo *in vitro* funcional de barreras epiteliales, asimismo se utilizan para estudiar absorción, metabolismo, biodisponibilidad de drogas, transporte de electrolitos y para evaluar el efecto de compuestos sobre la integridad de la barrera epitelial. Las células diferenciadas Caco-2 presentan una mayor similitud con las células de absorción del intestino delgado que con las células normales de absorción del colon, mientras que las células T84 maduras se asemejan a las células indiferenciadas (madres/progenitores) ubicadas en la base de las criptas de Lieberkühn (Fig. 5.8). Por último cabe señalar que la línea T84 se encuentra actualmente menos caracterizada que la línea Caco-2 (Devriese *et al.*, 2017).

HT-29 también proviene de un adenocarcinoma de colon humano. Resulta un modelo útil *in vitro* gracias a la expresión temprana de un antígeno apical y además porque el grado de diferenciación y polarización puede ser modulado en condiciones de cultivo específicas. Esta línea celular tiene algunos productos bioquímicos de características similares a las células embrionarias de colon, como se ejemplifica por el tipo y el peso molecular de algunas enzimas (Le Bivic *et al.*, 1988). En sus inicios, las células de la línea HT-29 se usaban principalmente para estudios relacionados con el metabolismo de la glucosa y ciertos receptores de hormonas. De igual forma que otras células epiteliales malignas, se ha demostrado que HT-29 tiene un metabolismo alterado de la glucosa, con altas tasas de consumo de glucosa y producción de ácido láctico y un grado moderado de acumulación de glucógeno (Rousset *et al.*, 1986). Si bien hay similitud con las líneas celulares descritas anteriormente respecto al origen de todas ellas, a diferencia de Caco-2 la cual se define como un tipo célula de absorción, la línea HT-29 se origina a partir en células secretoras de mucus, por lo que los marcadores de diferenciación en ambas son diferentes. Las líneas Caco-2 y HT-29 constituyen modelos actualmente estandarizados de los dos principales tipos de células

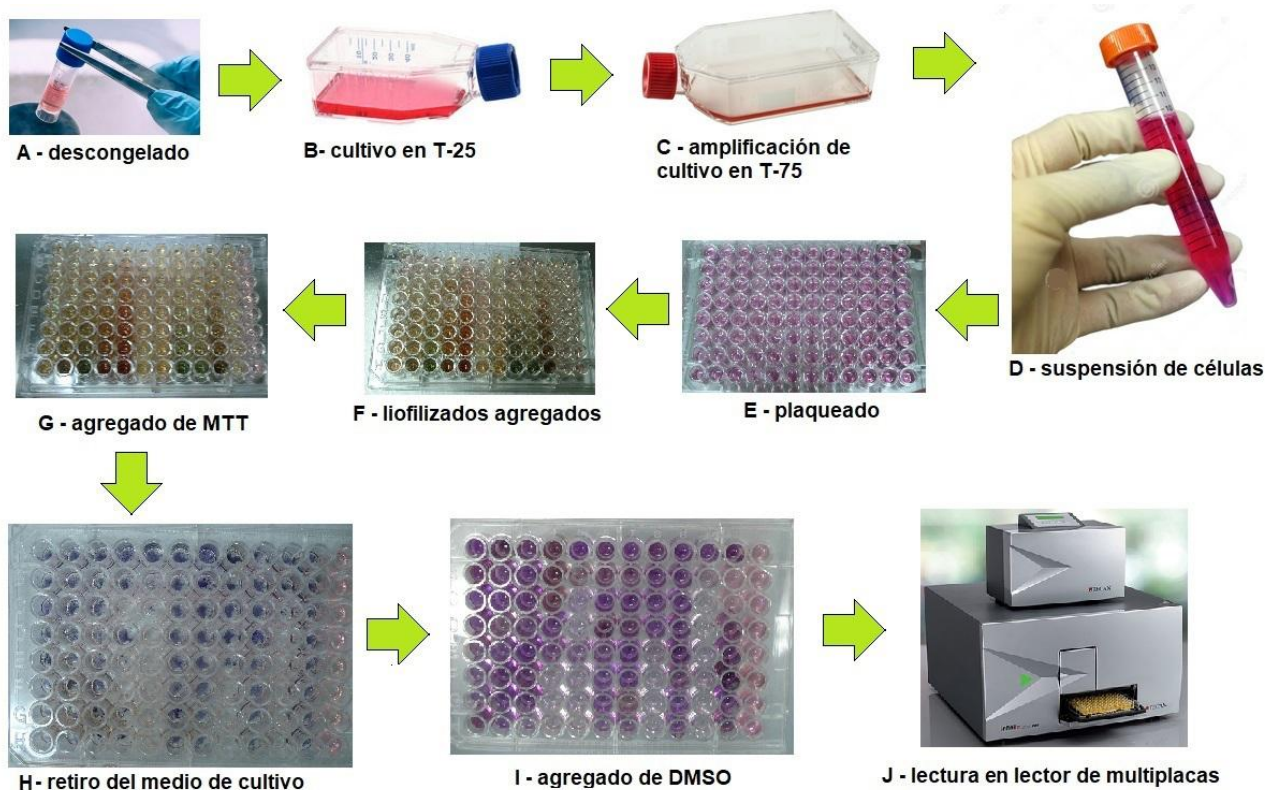
en el intestino (célula de absorción y célula glandular, respectivamente) que usualmente se alteran en la condición de cáncer de colon (Figura 5.8).



**Figura 5.8.** Representación de la anatomía del intestino grueso y región del colon. En verde se resaltan las células de absorción que constituyen el epitelio de la superficie interna del intestino y las células caliciformes glandulares ubicadas en la Cripta de Lieberkühn (adapta de [Hammer y Mcphee, 2010](#)). Las células derivadas de cáncer Caco-2 se asemejan a las células de absorción, mientras que las HT-29 se asemejan a las células glandulares.

HTR8/SVneo se originó a partir de la inmortalización de cultivo de células placentarias humanas del primer trimestre mediante la transfección de ADNc codificante para el antígeno de Papovirus SV-40 ([Graham et al., 1993](#)). Esta línea celular es ampliamente utilizada para estudiar múltiples procesos fisiológicos, incluyendo la diferenciación del trofoblasto, como así también mecanismos de adhesión, migración e invasión ([Hannan et al., 2010](#)). Teniendo en cuenta las limitaciones del caso, constituye un modelo comparativo de línea celular epitelial no derivada de cáncer.

En este experimento se evaluó la supervivencia celular mediante el ensayo de reducción del MTT para las cuatro líneas celulares indicadas previamente. El MTT ingresa solamente a células vivas y es metabolizado a sal de formazán, la cantidad de formazán que se produce en un cultivo es directamente proporcional a la cantidad de células vivas y se mide espectrofotométricamente a 570 nm luego de rediluirlo con dimetilsulfóxido (DMSO) ([Altay et al., 2016](#)). Las etapas de este ensayo se esquematizan a continuación en la Figura 5.9.



**Figura 5.9.** Resumen esquemático, con una placa, del ensayo de proliferación celular por método del MMT. (A) descongelado de células a partir de un criotubo conservado en nitrógeno líquido; (B) cultivo celular inicial en una botella de 25 cm<sup>2</sup> de superficie; (C) amplificación del cultivo celular a una botella de 75 cm<sup>2</sup> de superficie; (D) suspensión de células en medio de cultivo; (E) siembra en multiplaca ; (F) agregado de liofilizados de las infusiones; (G) agregado del MTT; (H) retiro del medio de cultivo, en esta etapa se observa la formación de cristales productor del metabolismo celular en el fondo de la placa; (I) agregado de DMSO para resuspender los cristales de formazán; (J) lectura en un lector de microplacas a 570 nm.

Inicialmente, las células que estaban criopreservadas dentro de un vial en nitrógeno líquido se descongelaron y se inició de esta forma el cultivo en una botella T-25 (Figura 5.9 A y B). En la botella T-25 las células disponen de DMEM con SFB al 10% que es el medio de cultivo predilecto para la mayoría de los tipos celulares, en estas condiciones el cultivo se mantuvo la estufa a 37 °C y en atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub> a los fines de emular las condiciones internas del cuerpo humano. Las células se replicaron hasta que establecieron una monocapa en el fondo de la botella T-25, luego de tratarlas con tripsina el cultivo está listo para traspasarse a una botella T-75 de mayor volumen ( Figura 5.9 C). De una botella T-75 se obtuvieron 10 ml de células en suspensión con medio de cultivo, las mismas se colectan en un tubo falcon de 15 ml ( Figura 5.9 D). Con una micropipeta p200 se colocaron 100 µl de células en suspensión en cada pocillo de la multiplaca (plaqueado, Figura 5.9 E). Se agregaron luego 100 µl más de DMEM con 10% de SFB en cada pocillo. Luego de que las células alcanzaron una monocapa en la placa multipocillo, se realizó un recambio de medio y seguidamente se agregaron los liofilizados de las especies a estudiar en un rango de concentraciones finales de 0 a 5 mg/ml (0,25; 0,50; 1; 1,25; 1,5; 2; 2,5 y 5 mg/ml) ( Figura 5.9 F). De esta forma se estableció una placa multipocillo en la que desarrolla un diseño experimental similar al mostrado para el bioensayo de *A. salina*. Se utilizó la droga inhibitoria de la división celular colchicina 100 µM como control positivo y 19 pocillos por placa

como control sin agregado de extractos. Luego de 72 horas se agregaron en cada pocillo 20  $\mu$ l de una solución saturada de MTT (amarillo) (Figura 5.9 G), la multiplaca se llevó a la estufa por 4 horas (Altay *et al.*, 2016). Seguidamente se removió el medio de cultivo y se agregaron 100  $\mu$ l de DMSO a los fines de redissolver las sales de formazán (Figura 5.9 H e I). Inmediamente la multiplaca se colocó en un lector de Elisa multiscan ES RD System que realizó una lectura a 570nm de la absorbancia en cada pocillo (Figura 5.9 J).

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de células viables como: (valor de absorbancia del pocillo tratado / absorbancia de cultivos no tratados) x 100. Luego, de forma similar a lo explicado para el ensayo de *A. salina* se obtuvieron curvas concentración-respuesta y se calculó la concentración efectiva 50 (EC<sub>50</sub>) para cada uno de los liofilizados sobre los distintos tipos celulares. En este caso, este parámetro indica la concentración de liofilizado a la que la viabilidad celular disminuye al 50% respecto del control, considerando el mayor y menor valor observado (Sebaug, 2011). Si bien la proliferación celular en cultivos depende de numerosos factores, este dato es útil para comparar los valores obtenidos con los de otros investigadores, y es particularmente útil para análisis dentro del mismo sistema experimental. Cabe recordar que mientras menor sea el valor de EC<sub>50</sub>, esto indica una mayor citotoxicidad. En los casos de los extractos para los que no fue posible calcular el valor de EC<sub>50</sub> (debido a una baja actividad antiproliferativa y a que los datos no ajustaron a una curva sigmoidea) se asignó un valor arbitrario de EC<sub>50</sub> > a 5 mg/ml, es decir un valor que en caso de existir estaría por encima de la concentración máxima ensayada.

En cuanto al diseño experimental para este ensayo se realizó un modelo lineal simple trabajando con muestras compuestas de material vegetal por cada especie y 3 repeticiones. Cada muestra compuesta se obtuvo a partir de 7 individuos de la población. La unidad experimental fue cada pocillo de 200  $\mu$ l de volumen final, sobre los que se realizaron 8 tratamientos por especie (0,25; 0,50; 1; 1,25; 1,5; 2; 2,5 y 5 mg/ml de liofilizado). En este caso la unidad de medición fue la absorbancia de cada pocillo y la variable de respuesta fue el % de células viables. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía para comparar los valores del parámetro EC<sub>50</sub> entre las distintas especies y líneas celulares, seguido del test de Tukey (comparaciones múltiples) con un nivel de significancia  $\alpha < 0,05$ , se verificó que se cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Software GraphPad v6, USA; Infostat, Argentina).

### *Ensayos de Apoptosis*

Luego de analizar los resultados obtenidos por el método del MTT explicado previamente, en una posterior etapa de trabajo se buscó indagar acerca del mecanismo de muerte celular en las células cancerígenas utilizadas. Para ello se llevó a cabo un ensayo de detección de la apoptosis a través de la visualización celular por un método de fluorescencia, conocido como tinción por Bromuro de Etidio/Naranja de Acridina (Afsar *et al.*, 2016; Behzad *et al.*, 2016).

Este ensayo se realizó solamente para las células Caco-2 y HT-29 (debido a razones operativas y de presupuesto) y para los liofilizados de las especies *A. boronioides* y *S. chilensis*,

debido a que las mismas fueron las que dieron resultados más alentadores en cuanto a su actividad citotóxica en el ensayo del MTT.

El método se basa en la utilización simultánea de los colorantes naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BrEt). El NA es un colorante no vital que difunde a través de la membrana plasmática tanto en las células vivas como en las muertas y se intercala en las bases del ADN formando con este un complejo verde fluorescente (cuando se observa con luz UV). El BrEt es un colorante vital que no puede atravesar la membrana plasmática, solo tiñe las células muertas que han perdido la integridad de su membrana plasmática. Al intercalarse esta molécula en el ADN forma un complejo fluorescente color anaranjado. Las células teñidas de esta forma pueden ser observadas por epifluorescencia, las células vivas se ven color verde y las células que murieron por apoptosis se ven color naranja.

Para este ensayo las células se ampliaron en cultivo de forma similar a lo explicado anteriormente para el método del MTT. Luego las células se colocaron en una multiplaca de seis cavidades de 500  $\mu$ l de volumen cada una. Se agregaron cubreobjetos redondos que actúan como una superficie de adhesión celular. Se agregaron los liofilizados de *A. boronioides* y *S. chilensis* en una única concentración, la concentración correspondiente al valor de la  $EC_{50}$  obtenido previamente para cada uno por el método del MTT. Los cultivos se incubaron a 37°C por 24 horas más. Seguidamente se agregó en cada pocillo 1  $\mu$ l de solución de BrET (10 mg/ml) y 0,5 de solución de NA (10mg/ml). Los cubreobjetos redondos se montaron sobre portaobjetos de vidrio y se visualizaron las células por epifluorescencia, a un magnificación de 400 X y con lámpara UV azul. Para las fotografías se utilizó un microscopio Zeiss AxioLab acoplado con una cámara digital (Olympus Qcolor3). Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el Software ImageJ. Se contabilizaron las células naranjas (apoptóticas) y las células totales, estableciendo el porcentaje de células apoptóticas para cada tratamiento. Se contabilizaron 5 grupos de 100 células para cada tratamiento. Se contabilizaron células apoptóticas para las células con liofilizados (apoptosis ejercida por los extractos), células sin agregados (apoptosis basal) y células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a baja concentración (apoptosis inducida, control positivo). Además, al observar las células se buscó la visualización de estructuras conocidas como “cuerpo apoptóticos”, típicas en muerte celular por apoptosis y que no aparecen en otros tipo de muerte celular; es una técnica adicional que permite agregar robustez y consistencia a la determinación por tinción (Nambiar y Edge, 2016).

En cuanto al diseño experimental para este ensayo se realizó un modelo lineal simple trabajando con muestras compuestas de material vegetal por cada especie y 3 repeticiones. Cada muestra compuesta se obtuvo a partir de 7 individuos de la población. La unidad experimental fue cada pocillo de 200  $\mu$ l de volumen final, sobre los que se realizó un único tratamiento por especie (la concentración de  $EC_{50}$  obtenida por MTT). En este caso la unidad de medición fue cada uno de los grupos de 100 células observadas y la variable de respuesta fue el % de células apoptóticas. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey (comparaciones múltiples) con un nivel de significancia  $\alpha < 0,05$ , se verificó que se cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Software GraphPad v6, USA; Infostat, Argentina).

### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 5.3.1. Toxicidad general mediante el bioensayo de *Artemia salina*

En la Tabla 5.1 se muestran los valores de toxicidad CL<sub>50</sub> obtenidos mediante el bioensayo de *A. salina* para las distintas especies en el rango de concentraciones ensayadas (0 a 50 mg/ml). Un valor bajo de CL<sub>50</sub> indica una alta toxicidad.

**Tabla 5.1.** Valores de toxicidad CL<sub>50</sub> para las especies estudiadas mediante *A. salina*.

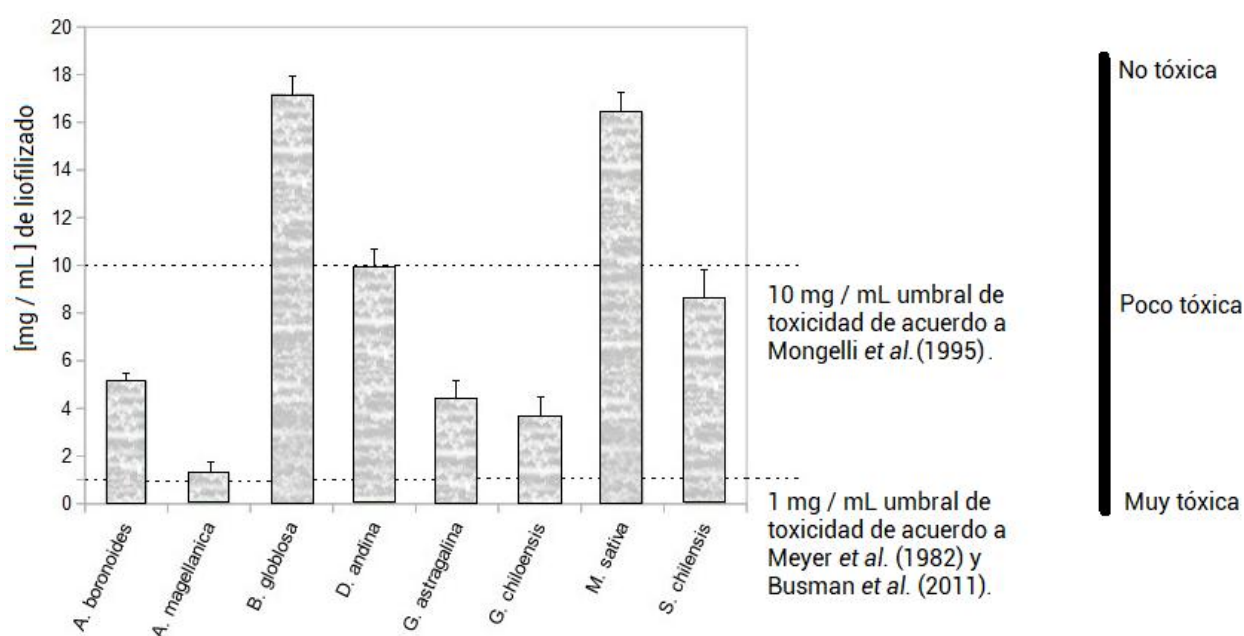
Infusión	Tóxica	Toxicidad CL <sub>50</sub> (mg/ml)
<i>A. boronioides</i>	SI	5,2 ± 0,1 (c)
<i>A. australe</i>	NO	...
<i>A. magellanica</i>	SI	1,3 ± 0,3 (e)
<i>B. globosa</i>	SI	17,8 ± 0,7 (a)
<i>D. andina</i>	SI	9,9 ± 0,4 (b)
<i>D. multifida</i>	NO	...
<i>G. astragalina</i>	SI	4,1 ± 0,3 (d)
<i>G. chilensis</i>	SI	3,7 ± 0,4 (d)
<i>M. sativa</i>	SI	16,4 ± 0,9 (a)
<i>S. chilensis</i>	SI	8,9 ± 1,2 (b)
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>		0,016 ± 0,002 (f)

K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> es el control positivo del ensayo (Padmaja *et al.*, 2002; Molina-Salinas *et al.*, 2006) Los tres puntos indican que no se encontró un valor de toxicidad dentro del rango ensayado. Los valores se presentan ± ES. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre especies para cada método por test de ANOVA con  $\alpha < 0,05$  (test de Tukey).

Al analizar los datos presentados en la Tabla 5.1 se observa que *A. australe* y *D. multifida* no reportaron toxicidad en el rango de concentraciones ensayadas (0-50 mg/ml). Los datos encontrados para *A. australe* y *D. multifida* representan un aspecto positivo desde la seguridad en el consumo de estas plantas, ya que *A. australe* es una planta ampliamente utilizada como planta comestible en la región (Rapoport *et al.*, 2005), principalmente en forma de ensaladas y también en forma de infusión herbal. El dato encontrado con este ensayo constituye un primer indicio de la seguridad en el consumo de esta planta. Por otro lado, *D. multifida* ("paico"), es ampliamente consumida como infusión por sus propiedades medicinales y además tiene un uso alimenticio al utilizarse como condimento o para darle sabor a otras infusiones (Golenowski *et al.*, 2006). La toxicidad producida por esta planta es un tema de controversia actual en la comunidad científica (Gadano *et al.*, 2007; González *et al.*, 2009). La especie presenta un compuesto volátil tóxico denominado ascaridol, poco soluble en agua por lo que no estaría presente en cantidades apreciables en las infusiones. Al parecer, la toxicidad podría ocurrir con preparaciones inadecuadas de esta planta, como por ejemplo infusiones muy concentradas, cocimientos, o

cocimientos recalentados que podrían oxidar al ascaridol y transformarlo en peróxidos. Los compuestos peroxídicos serían solubles y tóxicos (Rimada *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2009). Lo antedicho alerta sobre la importancia de hacer un cuidadoso y correcto uso de las plantas medicinales. Según los datos obtenidos en el presente ensayo, la infusión de *D. multifida* no presenta toxicidad si se prepara la infusión de acuerdo a normas farmacopeicas (es decir al 5 % P/V).

Los valores de CL<sub>50</sub> para el resto de las especies se representan de forma gráfica en la Figura 5.10. En la misma se muestra en el eje vertical la concentración del liofilizado de las infusiones expresada en mg/ml. En el eje horizontal se colocan las especies estudiadas en orden alfabético, en la parte derecha de la figura se indican umbrales de toxicidad para este ensayo según bibliografía consultada y se presenta una escala conceptual de toxicidad.



**Fig 5.10.** Valores de toxicidad CL<sub>50</sub> (mg/ml) obtenidos para los liofilizados de las infusiones sobre el organismo *A. salina*. No se grafican las barras correspondientes a *A. australe* y *D. multifida* ya que no se encontró un valor de toxicidad para las mismas.

El valor umbral de 1 mg/ml (o 1000 µg/ml) constituye una referencia ampliamente aceptada para determinar la toxicidad o no de un extracto determinado (Meyer *et al.*, 1982; Busman *et al.*, 2011; Hamidi *et al.*, 2014). De acuerdo a este valor de referencia, la única infusión que presentaría riesgos de toxicidad es *A. magellanica*, ya que presentó un valor estadísticamente similar al umbral de toxicidad; este extracto también reportó posible toxicidad sobre *S. cereviciae* (Capítulo 3). El umbral de 1 mg/ml fue inicialmente establecido por Meyer *et al.* (1982) para compuestos aislados de plantas y extractos etanólicos; otros autores que adhieren a este criterio como por ejemplo Valdez *et al.* (2009) ó Busman *et al.* (2011), siempre presentan datos sobre extractos etanólicos u otros extractos orgánicos. En general los preparados con solventes orgánicos presentan una mayor capacidad extractiva que el extracto acuoso que constituye una infusión. Por lo expuesto, Mongelli *et al.* (1995) al trabajar con plantas argentinas, propone que en el caso

particular de las infusiones el umbral de toxicidad debería ser de 10 mg/ml; actualmente no se encuentran otras investigaciones disponibles que hayan adoptado el criterio sugerido por este autor.

De acuerdo a lo desarrollado previamente se puede decir que en base a este bioensayo *B. globosa* y *M. sativa* no reportan toxicidad. El resultado sobre la muy baja toxicidad para *B. globosa* coincide con el informado previamente por [Schmeda-Hirschman et al. \(1993\)](#). Las infusiones de *D. andina* y *S. chilensis* presentaron un valor de toxicidad muy cercano al umbral de [Mongelli et al. \(1995\)](#), por ello podrían clasificarse como poco tóxicas. Finalmente quedan *A. boronioides*, *G. astragalina* y *G. chilensis* entre los dos umbrales presentados, por ello se podrían considerar infusiones que presentan algún riesgo de toxicidad y deberían estudiarse en mayor profundidad. Además cabe señalar que el valor determinado para el control positivo (0,016 mg/ml) se enmarca en el rango de entre 0,013 y 0,029 mg/ml calculado por diferentes investigadores ([Padmaja et al, 2002](#); [Molina-Salinas et al., 2006](#)), lo que sustenta la correcta aplicación del método y la validez de los resultados.

Respecto a la utilidad y perspectivas de este bioensayo, se considera de utilidad como screening previo al trabajo con células derivadas de tumores ([Anderson et al., 1991](#); [Hazra y Charttejee 2008](#), [Rajabi et al., 2015](#)). Algunos autores enfatizan su utilidad para evaluar toxicidad aguda y reemplazar el uso de animales de laboratorio ([Parra et al., 2001](#); [Naidú et al., 2014](#)). En particular [Hamidi et al. \(2014\)](#), concluye con esta propuesta luego de revisar en detalle la evidencia disponible sobre toxicidad en modelos animales y en humanos. Es un ensayo realmente útil para realizar una primera aproximación hacia el potencial tóxico y citotóxico de una planta.

### 5.3.2 Toxicidad general y genotoxicidad mediante test de *Allium cepa*

Los parámetros obtenidos para este experimento se sintetizan en la Tabla 5.2.

**Tabla 5.2.** Parámetros obtenidos mediante el ensayo de genotoxicidad con *A. cepa*.

Tratamiento	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	Largo de raíz (cm)	IM (%)	Nro de anomalías	Nro micronúcleos
<i>A. boronioides</i>	1,5 ± 0,2 (ab)	2.1 ± 0.1 (b)	9,7 ± 0,4 (b)	1,3 ± 0,4 (d)	0,3 ± 0,4 (d)
<i>A. australe</i>	1,1 ± 0,1 (c)	2.1 ± 0.1 (b)	8,0 ± 0,7 (c)	7,3 ± 1,1 (bc)	0,7 ± 0,4 (d)
<i>A. magellanica</i>	0,9 ± 0,1 (c)	2.3 ± 0.2 (b)	4,7 ± 0,4 (d)	6,7 ± 1,1 (bc)	1,0 ± 0,7 (d)
<i>B. globosa</i>	1,7 ± 0,3 (ab)	1.9 ± 0.2 (b)	7,3 ± 1,1 (c)	4,0 ± 0,7 (cd)	0,0 ± 0,0 (d)
<i>D. andina</i>	1,4 ± 0,2 (b)	1.8 ± 0.3 (b)	8,3 ± 0,4 (c)	2,7 ± 0,4 (cd)	7,0 ± 0,7 (b)
<i>D. multifida</i>	1,7 ± 0,3 (ab)	2.0 ± 0.0 (b)	14,1 ± 1,3 (a)	15,0 ± 2,0 (a)	0,7 ± 0,4 (d)
<i>G. astragalina</i>	1,9 ± 0,1 (a)	2.4 ± 0.2 (b)	6,7 ± 0,9 (c)	3,7 ± 0,4 (cd)	13,0 ± 1,3 (a)
<i>G. chiloensis</i>	0,7 ± 0,2 (c)	2.1 ± 0.3 (b)	4,0 ± 0,7 (d)	2,3 ± 0,4 (cd)	1,7 ± 0,4 (d)
<i>M. sativa</i>	1,6 ± 0,2 (ab)	2.0 ± 0.1 (b)	11,7 ± 1,6 (ab)	9,3 ± 0,9 (b)	8,0 ± 0,7 (b)
<i>S. chilensis</i>	0,8 ± 0,2 (c)	2.1 ± 0.1 (b)	10,7 ± 0,9 (b)	0,7 ± 0,4 (d)	0,3 ± 0,4 (d)
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (C+)	0,01 ± 0,1 (d)	0.5 ± 0.1 (c)	2,7 ± 0,4 (e)	18,7 ± 2,2 (a)	4,3 ± 0,4 (c)
Control H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	...	4.1 ± 0.2 (a)	10,7 ± 0,4 (b)	1,0 ± 0,0 (d)	0,0 ± 0,0 (d)

EC<sub>50</sub> es la concentración que produjo una disminución del crecimiento radicular a la mitad respecto del control con agua destilada en el ensayo inicial; Largo de raíz: cm de longitud alcanzados por las raíces de *A. cepa* en los distintos tratamientos durante el segundo ensayo en el que los bulbos fueron tratados la concentración EC<sub>50</sub>; IM (%) porcentaje de células en división celular sobre 500 células observadas; Nro de anomalías: número de aberraciones cromosómicas encontradas sobre 500 células observadas; Nro de micronúcleos: número de micronúcleos encontrados sobre 500 células observadas. Los valores se presentan ± ES. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para cada parámetro de forma independiente por test de ANOVA con  $\alpha < 0,05$  (test de Tukey).

De acuerdo a las numerosas críticas y revisiones propuestas para este método (Andrioli 2012, Khanna y Sharma 2013), se puede considerar que el parámetro largo de la raíz no constituye por sí mismo un indicativo de citotoxicidad en este ensayo, es más bien un indicador de bioactividad que puede estar detectando, en todo caso, mecanismos alelopáticos para los extractos estudiados. Aun así, proporciona valiosa información, en este sentido *A. australe*, *A. magellanica*, *G. chiloensis* y *S. chilensis* afectaron de igual forma el crecimiento radicular a valores inferiores de EC<sub>50</sub> que el resto de las especies ensayadas. Este dato indica que son extractos activos sobre el crecimiento radicular de otra especie (*A. cepa* en este caso), lo que podría ser de posible utilidad futura en el área de la agroecología, por ejemplo si se deseara buscar nuevas fuentes de alelopáticos locales (Cheng y Cheng, 2015).

En relación al índice mitótico (IM), *D. multifida* es la única que produce un aumento significativo de este parámetro respecto del control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que indica que el extracto de esta especie tiene capacidad para promover la división celular. El IM por arriba del control negativo puede mostrar el resultado de la una estimulación de la división celular, lo cual podría asociarse con el inicio de procesos neoplásicos, que pueden continuar con una división descontrolada pudiendo llegar a la formación de tumores (Öskara et al., 2015). Contrariamente a los datos aquí obtenidos, Gadano et al. (2007) reportaron la baja del IM% para extractos similares de esta planta, aunque trabajaron con un modelo *in vitro* de cultivo de linfocitos. Los resultados obtenidos con *D.*

*multifida* nos hace inferir que debería tenerse precaución en el consumo prolongado de la infusión de esta planta. Por otro lado los extractos de *A. boronioides*, *S. chilensis* y *M. sativa* no producen una diferencia significativa en el valor de IM respecto del valor del control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por lo que no serían tóxicas en base a este parámetro. El resto de las especies evaluadas presentaron cierto grado de toxicidad al disminuir el IM significativamente respecto del control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los valores en el IM por debajo del control negativo pueden indicar que el crecimiento y desarrollo de los organismos expuestos es afectado por el agente evaluado (Liman *et al.*, 2011), además puede considerarse un indicador de capacidad para frenar el ciclo celular, lo que sería útil para posteriores ensayos de actividad antiproliferativa.

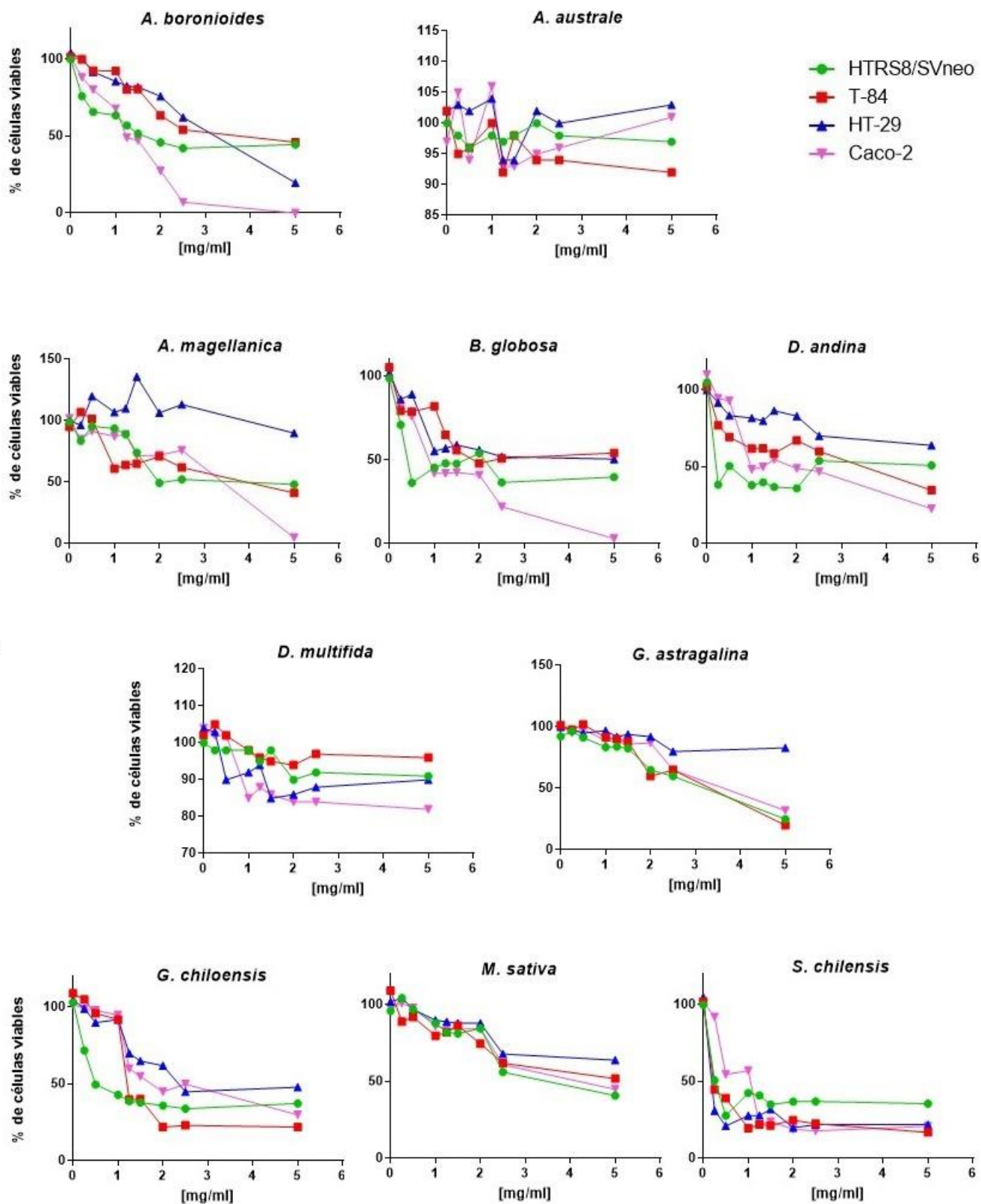
Respecto del Número de anomalías, *A. boronioides* y *S. chilensis* son claramente los extractos menos genotóxicos, en relación a la ausencia de generación de anomalías cromosómicas. Tampoco presentan valores significativos de genotoxicidad respecto del control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> las infusiones de *B. globosa*, *D. andina*, *G. astragalina* y *G. chiloensis*. Las especies que si resultaron tóxicas en cuanto a generar un número significativo de anomalías respecto del control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron *A. australe*, *A. magellanica*, *M. sativa* y *D. multifida*. En el caso de *D. multifida* el número de anomalías producidas es similar al K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, lo que indica una fuerte genotoxicidad.

Respecto al Número de micronúcleos, las infusiones de *D. andina*, *G. astragalina* y *M. sativa* son claramente plantas con potencial riesgo de genotoxicidad ya que producen un aumento significativo en la formación de micronúcleos respecto del control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; cabe recordar que afortunadamente estas especies no son de las que presenten mayor cantidad de usos populares y tampoco está reportado el consumo de su infusión en forma sostenida en el tiempo. El resto de los extractos no resultaron genotóxicos en cuanto a la capacidad de inducir la formación de micronúcleos.

Analizando el conjunto de parámetros obtenidos en este experimento puede afirmarse que desde el punto de vista de la seguridad, las infusiones de *A. boronioides* y *S. chilensis* no producen citotoxicidad en el modelo de *A. cepa*, ya que no afectaron el IM ni produjeron aberraciones cromosómicas (anomalías y micronúcleos). Por otro lado, *D. multifida* y *M. sativa* son claramente genotóxicas, ya que aumentan significativamente respecto del control el número de anomalías cromosómicas la primera y el número de anomalías y micronúcleos la segunda. El resto de las especies afectaron de forma particular a los distintos parámetros analizados, lo que ha sido discutido previamente.

### 5.3.3. Citotoxicidad en las líneas celulares HTR8/SVneo, T84, HT-29 y Caco2

#### Ensayo de proliferación celular por método del MMT



**Fig 5.11.** Efecto antiproliferativo por el método del MTT, presentado como % de células viables respecto al control de 100% de viabilidad, para los liofilizados de cada especie.

Los liofilizados de *A. australe* y *D. multifida* no mostraron una actividad citotóxica de importancia sobre las líneas celulares estudiadas (Fig. 5.11) por lo que no fue posible establecer la  $EC_{50}$ . Esto se correlaciona con la ausencia de toxicidad general comprobada anteriormente con el bioensayo de *A. salina* para ambos extractos (Resultados de la sección 5.3.1). Para el resto de las especies se observó una disminución en el % de células viables ante un aumento de la concentración de extracto; aunque el caso de *M. sativa* y *G. astragalina* este efecto fue apreciable principalmente a altas concentraciones.

La especie *S. chilensis* presentó una gran actividad antiproliferativa, al disminuir el % de células viables para todas las líneas celulares a partir de bajas concentraciones; otro dato de importancia que se observa para esta planta es que a partir de 2 mg/ml de concentración la citotoxicidad fue significativamente menor sobre la línea celular no derivada de cáncer (HTR8/SVneo) que sobre las otras (T-84, HT-29 y Caco-2). Este dato puede ser de sumo interés para una futura utilidad terapéutica de esta planta; aun así cabe recordar que el análisis sobre el modelo disponible de línea celular no derivada de cáncer HTR8/SVneo es limitado, sería deseable ampliar estudios con otras líneas celulares no derivadas de cáncer y eventualmente con ensayos *in vivo*. En este sentido es prometedora la línea celular HcoEpiC (ScienceCell Research Laboratories, California, EEUU), la misma deriva de tejido normal de colon humano y es de reciente disponibilidad en el mercado (Farhana *et al.*, 2016).

Las situaciones de máxima citotoxicidad ocurrieron para las especies *A. boronioides*, *B. globosa* y *A. magellanica* sobre la línea celular Caco-2 a una concentración de liofilizado de 5 mg/ml. De todas formas, considerando todos los datos en conjunto, se observó que el efecto antiproliferativo fue variable según las distintas concentraciones y las líneas celulares ensayadas, para poder analizarlo en mayor detalle se presentan en la Tabla 5.3 los valores de  $EC_{50}$  obtenidos de para todas las plantas y líneas celulares ensayadas.

**Tabla 5.3.** Valores de EC<sub>50</sub> para las especies analizadas sobre las líneas celulares HTR8/SVneo, T-84, Caco-2, HT-29.

Infusión	HTR8/SVneo	T-84	Caco-2	HT-29
<i>A. boronioides</i>	2.44 ± 0.4 (bc)	1.36 ± 0.5 (d)	1.27 ± 0.3 (d)	2.87 ± 0.3 (b)
<i>A. australe</i>	> 5 (a)	> 5 (a)	> 5 (a)	> 5 (a)
<i>A. magellanica</i>	1.68 ± 0.3 (d)	1.22 ± 0.2 (d)	2.47 ± 0.5 (bc)	> 5 (a)
<i>B. globosa</i>	0.29 ± 0.1 (f)	1.37 ± 0.2 (d)	1.27 ± 0.4 (d)	1.47 ± 0.2 (d)
<i>D. andina</i>	0.28 ± 0.1 (f)	1.23 ± 0.2 (d)	2.27 ± 0.4 (bc)	> 5 (a)
<i>D. multifida</i>	> 5 (a)	> 5 (a)	> 5 (a)	> 5 (a)
<i>G. astragalina</i>	2.40 ± 0.4 (bc)	2.30 ± 0.4 (bc)	2.80 ± 0.4 (b)	2.84 ± 0.4 (b)
<i>G. chiloensis</i>	1.68 ± 0.3 (d)	1.47 ± 0.3 (d)	2.23 ± 0.2 (c)	> 5 (a)
<i>M. sativa</i>	2.33 ± 0.2 (c)	2.22 ± 0.3 (c)	2.65 ± 0.4 (bc)	> 5 (a)
<i>S. chilensis</i>	0.24 ± 0.0 (f)	0.16 ± 0.1 (g)	0.57 ± 0.2 (e)	0.18 ± 0.0 (g)

Los valores se expresan en mg/ml ± ES. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha < 0,05$ ) mediante test de ANOVA (test post-hoc de Tukey).

Los valores de EC<sub>50</sub> obtenidos varían entre un mínimo de 0,16 mg/ml y un máximo de 2,87 mg/ml. Se trata de magnitudes de actividad relevantes en todos los casos y consistentes con otros reportes, [Altay et al. \(2016\)](#) señalaron los siguientes valores como de alta actividad antiproliferativa: 1,67 mg/ml para HT-29 y 3,03 mg/ml para Caco-2. En otro estudio, [Kaliora et al. \(2014\)](#) reportaron inhibición del crecimiento celular de HT-29 a las 72 h en concentraciones de entre 0,2 y 1 mg/ml para liofilizados de las infusiones consumidas en Grecia (de Romero, Tomillo, Orégano, Salvia y Hierba de San Juan). De acuerdo al criterio de [Gentile et al. \(2016\)](#), estas concentraciones se corresponden a las que podrían darse a nivel fisiológico en el intestino grueso humano luego de ingerir entre 1 y 3 tazas de infusión. Normalmente 100 ml de infusión contienen un cantidad equivalente de entre 1000 y 1500 mg de liofilizado. Se estima que la región final del intestino grueso, también denominado colon descendente o simplemente colon, tiene un volumen de entre 500 y 600 cm<sup>3</sup>.

En el caso de la línea celular HTR8/SVneo, los valores de citotoxicidad generados por los extractos varían en un amplio rango de entre 0,24 y 2,44 mg/ml. Caber recordar que al ser una línea celular no derivada de cáncer sería deseable encontrar extractos que no generen toxicidad para estas células, en este sentido las infusiones de *A. boronioides* y *G. astragalina* fueron las menos citotóxicas, seguidas de *M. sativa*.

Para la línea T-84 se observa que la mayor citotoxicidad es ejercida por *S. chilensis*, seguida por un grupo de cinco especies que presentan una EC<sub>50</sub> similar, cercana a 1,4 mg/ml: *A. boronioides*, *A. magellanica*, *B. globosa*, *D. andina* y *G. chiloensis*. Por último, *G. astragalina* y *M. sativa* presentan la menor citotoxicidad para estas células.

Caco-2 presenta valores de EC<sub>50</sub> por encima de 2 mg/ml para la mayoría de las infusiones analizadas, se destaca *S. chilensis* como el extracto más citotóxico para esta línea celular, seguido por *A. boronioides* y *B. globosa*.

Respecto a HT-29, se observa claramente que de forma general es la línea celular más resistente a los efectos citotóxicos ejercidos por los extractos. La mayoría de las infusiones analizadas no dan un efecto citotóxico de  $EC_{50}$  en el rango ensayado. Se destaca nuevamente *S. chilensis* como el extracto más activo, seguido de *B. globosa* y *A. boronioides*.

Si se realiza un análisis de las  $EC_{50}$  centrado en los extractos, puede verse que *A. boronioides* fue significativamente más citotóxica para las líneas derivadas de cáncer Caco-2 y T-84 que para HTR8/SVeneo. Las especies *A. magellanica*, *G. astragalina*, *G. chiloensis* y *M. sativa* no resaltaron en algún aspecto relevante en cuanto a las  $EC_{50}$  obtenidas. Por otro lado *B. globosa* y *D. andina* ejercen significativamente mayor citotoxicidad sobre la línea celular no derivada de cáncer que sobre las líneas derivadas de cáncer; por ello no serían especies de interés en cuanto a su potencial actividad anticancerígena, aunque como se señaló previamente sería deseable ampliar la comparación con otros modelos de células no derivadas de cáncer. Respecto de *S. chilensis*, fue el liofilizado significativamente más citotóxico para las líneas celulares derivadas de cáncer; también lo fue para HTR8/SVneo, pero es menos citotóxico para esta línea que para las células T-84 y HT-29. Finalmente cabe recordar que *A. australe* y *D. multifida* no mostraron efectos citotóxicos observables en los ensayos de viabilidad celular.

En resumen, se destacó la potencial actividad anticancerígena que mostraron *A. boronioides* y *S. chilensis*. La primera porque resultó el extracto menos citotóxico sobre la línea celular que no deriva de cáncer (HTR8/SVneo,  $EC_{50} = 2,44$  mg/ml), a la vez que mostró significativamente una mayor citotoxicidad sobre dos de las líneas celulares derivadas de cáncer de colon (T-84,  $EC_{50} = 1,36$  mg/ml y Caco-2,  $EC_{50} = 1,27$  mg/ml). La segunda porque se destacó claramente como la especie de mayor bioactividad en cuanto a su citotoxicidad, particularmente sobre HT-29 ( $EC_{50} = 0,18$  mg/ml), la línea más resistente ensayada; además se observó cómo a altas concentraciones (a partir de 2.5 mg/ml) resulta significativamente más citotóxica para las células derivadas de cáncer T-84 y HT-29 que para la línea celular no derivada de cáncer (HTR8/SVneo) (Figura 5.11). Por ello, estas dos especies fueron seleccionadas para comprobar si estaban ejerciendo muerte celular en las células derivadas de cáncer por el mecanismo de apoptosis.

### *Ensayos de apoptosis*

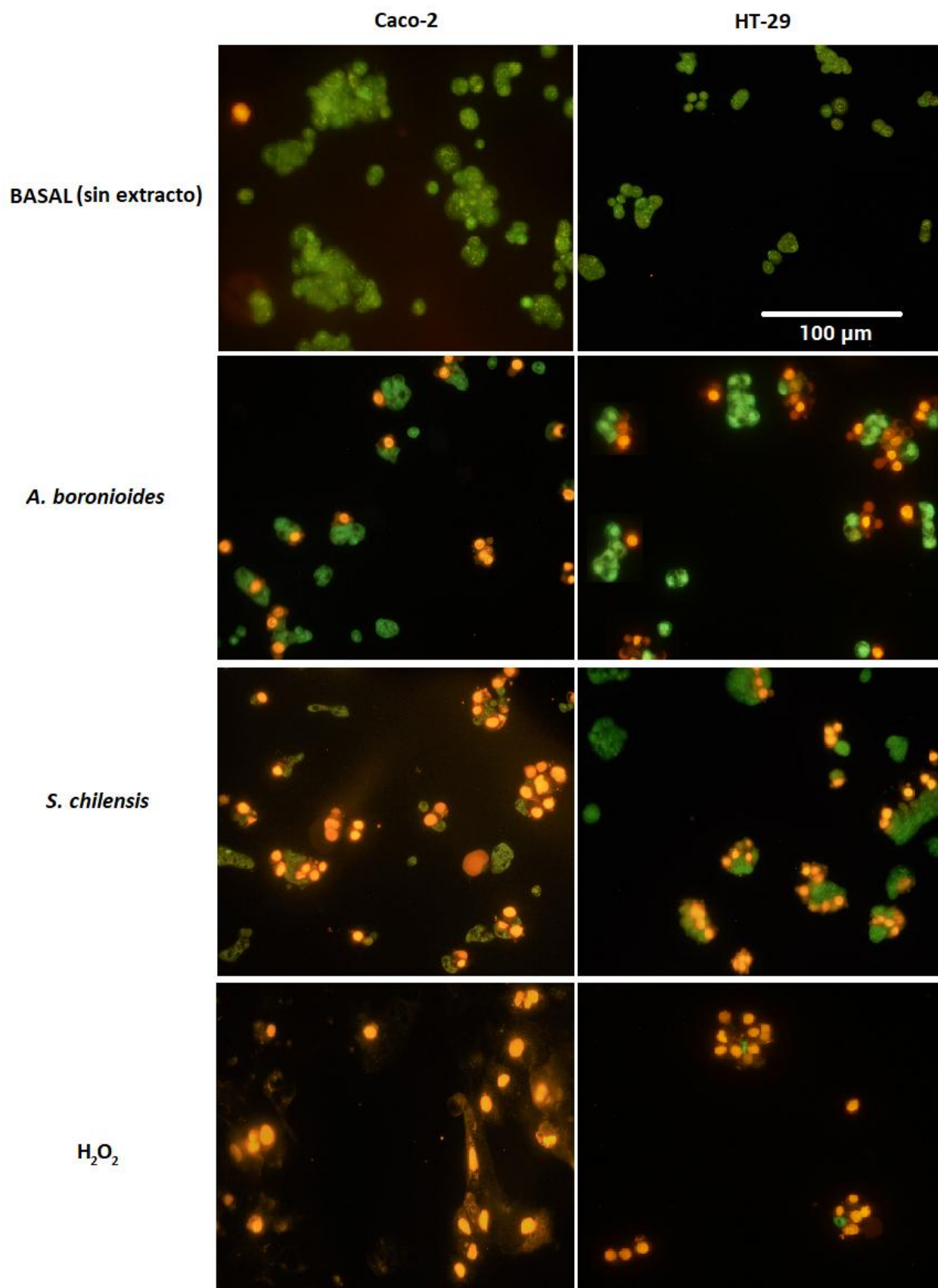
En la Figura 5.12 se muestran imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia del ensayo de apoptosis por el método de tinción con Bromuro de Etidio/Naranja de acridina en células Caco-2 y HT-29. En todos los campos analizados se visualizaron células con cuerpos apoptóticos, lo confirma adicionalmente este tipo de muerte celular (Nambiar y Edge, 2016).

El porcentaje de células muertas por apoptosis para Caco-2 fue: basal  $3.7\% \pm 2.8$ , control con peróxido de hidrógeno  $87.4\% \pm 16.1$ , *A. boronioides*  $35.0\% \pm 4.1$  y *S. chilensis*  $47.2\% \pm 6.7$ .

El porcentaje de células muertas por apoptosis para HT-29 fue: basal  $2.6\% \pm 2.5$ , control con peróxido de hidrógeno  $95.9\% \pm 3.4$ , *A. boronioides*  $46.2\% \pm 8.2$  y *S. chilensis*  $35.8\% \pm 4.0$ .

Si bien se obtuvieron resultados muy interesantes en este experimento, sería conveniente poder corroborar la apoptosis por otro método, así como también contrastar la actividad frente a un modelo celular de colon normal sometido a los extractos de *A. boronioides* y *S. chilensis*. Entre distintos métodos moleculares que indagan sobre procesos específicos que ocurren en las células apoptóticas, uno de los más populares para corroborar muerte celular por apoptosis consiste en medir la expresión de la enzima procaspasa 3 por inmunodetección (Western Blot), ([Nambiar y Edge, 2016](#); [Banfalvi, 2017](#)). Se espera poder profundizar estos aspectos en futuros estudios.

Este experimento confirmó que las células derivadas de cáncer Caco-2 y HT-29 se mueren por el proceso de apoptosis ante el contacto con las infusiones de *A. boronioides* y *S. chilensis*. Esto resalta la potencial actividad anticancerígena de estas dos plantas medicinales y aromáticas nativas de la Patagonia.



**Fig 5.12.** Imágenes obtenidas por microscopía de fluoerescencia del ensayo de apoptosis por el método de tinción con Bromuro de Etidio/Naranja de Acridina en células Caco-2 y HT-29. Las células que se ven de color naranja se encuentran muertas por Apoptosis.

## 5.4. CONCLUSIONES

La infusión de *Adesmia boronioides* presentó moderado riesgo de toxicidad aguda, no presentaría riesgo de toxicidad crónica ya que no fue genotóxica, a la vez que resultó promisoriosa su potencial actividad anticancerígena afectando diferencialmente a células derivadas de cáncer y no derivadas de cáncer.

*Apium australe* no reportó riesgo de toxicidad aguda en su consumo pero si resultó genotóxica, por otro lado no reportó actividad citotóxica en las líneas celulares.

*Artemisia magellanica* se destacó por ser la especie más tóxica de las estudiadas, además mostró genotoxicidad. La actividad citotóxica sobre células derivadas de cáncer no fue de particular interés de acuerdo a los alcances de este estudio.

En cuanto a *Buddleja globosa*, no reportó riesgo de toxicidad aguda y su genotoxicidad fue moderada. La potencial actividad anticancerígena resultó interesante pero deberían profundizarse los estudios con otros modelos de células no derivadas de cáncer.

La especie *Drimys andina* mostró bajos valores de toxicidad general pero demostró una elevada genotoxicidad. En cuanto a su potencial actividad anticancerígena esta planta ejerció citotoxicidad diferencial entre la línea no derivada de cáncer y las células derivadas de cáncer T-84 y Caco-2 a la máxima concentración evaluada, el dato es de interés, por lo que se podría considerar profundizar su estudio.

*Dysphania multifida* no presentaría riesgo de toxicidad aguda, pero por otro lado presentó marcada genotoxicidad. No reportó actividad citotóxica sobre líneas celulares.

*Glycyrrhiza astragalina* presentó moderado riesgo de toxicidad aguda, por otro lado resultó muy genotóxica, podría ser carcinogénica. La actividad citotóxica ejercida sobre células derivadas de cáncer no fue de interés.

En cuanto a la infusión de *Grindelia chilensis* reportó moderada toxicidad general y reportó genotoxicidad solamente mediante el parámetro IM. Mostró citotoxicidad sobre todas las líneas celulares ensayadas, sin afectar de manera significativamente diferencial a las células derivadas y no derivadas de cáncer a valores de  $EC_{50}$ , pero si afectó de forma diferencial a Caco 2 y T-84 respecto de HTR8/SVneo a altas concentraciones (5mg/ml). De acuerdo a estos datos, el interés por la potencial actividad anticancerígena de esta especie no fue concluyente, por lo que podría continuarse profundizando su estudio.

*Madia sativa* no reportó toxicidad general, pero resultó ser la especie más genotóxica de las estudiadas. Su citotoxicidad frente a líneas celulares fue baja y por ello de poco interés.

Finalmente, la infusión de *Solidago chilensis* demostró un toxicidad general baja, y no resultó genotóxica. En cuanto a la actividad citotóxica sobre líneas celulares, fue claramente la especie más bioactiva de todas y afectó diferencialmente a las células derivadas de cáncer en altas concentraciones.

Por último, cabe resaltar la potencial actividad anticancerígena que mostraron *A. boronioides* y *S. chilensis*, las cuales ejercieron citotoxicidad por apoptosis sobre los dos principales modelos celulares vigentes para estudiar el cáncer de colon (Caco-2 y HT-29).

## **CAPITULO 6.**

# **INTEGRACIÓN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN y CONCLUSIONES FINALES**

El objetivo del presente Capítulo fue resumir e integrar los resultados presentados en los Capítulos previos (3, 4 y 5), para luego en base a los mismos profundizar en una discusión integradora y presentar las conclusiones finales de este trabajo de tesis.

## 6.1. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Elaboración de tablas integradoras de datos y análisis estadísticos*

Inicialmente se elaboró la Tabla 6.1, que muestra en cada columna los principales parámetros obtenidos en los experimentos detallados previamente en este escrito. Con los datos presentados de forma integrada en una misma tabla se buscó enriquecer una discusión al observar la variedad de datos generados para cada especie. Adicionalmente se realizaron análisis de correlación de Pearson para evaluar relaciones lineales entre los distintos parámetros de interés (Software Infostat, Argentina). Adicionalmente se realizó un análisis multivariado de conglomerados (Software Infostat, Argentina), se trata de un análisis exploratorio de los datos que puede ayudar a enriquecer la discusión y conclusiones de este trabajo.

En la elaboración de la Tabla 6.1, al parámetro usos medicinales se le asignó un valor entre 0 y 4 (un mayor valor se corresponde con una mayor cantidad de usos de acuerdo a la Tabla 2.1, presentada en el final del Capítulo 2). Los valores de actividad antioxidante, fenoles y flavonoides totales son tomados tal cual se presentaron en el Capítulo 3. Para la cantidad de compuestos fenólicos y volátiles se coloca el número de compuestos principales detectados por TLC. El valor de toxicidad general corresponde al presentado en el Capítulo 5 mediante el test de *A. salina*, al ser valores de  $EC_{50}$  se les asignó arbitrariamente el número 20 a *A. australe* y *D. multifida*, estas especies no poseen toxicidad pero es necesario asignarles un valor numérico para poder incluirlas en el análisis multivariado de conglomerados. Los valores de genotoxicidad, obtenidos en el Capítulo 5, se expresan en dos columnas: el IM tal cual se obtuvo, y por otro lado el valor para aberraciones, se expresó en este caso sumando las variables nro de anomalías + nro de micronúcleos. Para la citotoxicidad sobre líneas celulares se utiliza el valor  $EC_{50}$  presentado previamente en el Capítulo 5, en el caso de la línea celular no derivada de cáncer se presenta tal cual se obtuvo y en el caso de las células derivadas de cáncer de colon se unifica en un valor promedio de  $EC_{50}$  sobre las de las tres líneas ensayadas, a los fines de disminuir el número total de variables a utilizar en el análisis multivariado y también para visualizar una comparación más directa entre los efectos citotóxicos sobre células normales y derivadas de cáncer.

Finalmente se elaboró la Tabla 6.2, en base a los resultados previos ya integrados previamente en la Tabla 6.1. El fin de la Tabla 6.2 fue presentar la información de otra forma y visualizar cualitativamente y de forma clara las principales características de cada planta. Para las distintas especies vegetales se asignó a cada parámetro la categoría de valor nulo (-), bajo (+), medio (++) y alto (+++). La Tabla 6.2 se utilizó para guiar la discusión sobre los principales aspectos de interés para cada una de las plantas analizadas.

## 6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6.1. Principales datos numéricos obtenidos para las especies estudiadas en los Capítulos 3, 4 y 5.

	Usos medicinales	Actividad antioxidante	Fenoles totales	Flavonoides totales	Cantidad de compuestos fenólicos	Cantidad de compuestos volátiles	Toxicidad general	Genotoxicidad (IM)	Genotoxicidad (aberraciones)	Citotoxicidad sobre línea no derivada de cáncer	Citotoxicidad sobre células de cáncer de colon
<i>A. boronioides</i>	4,0	28,6	40,7	24,3	3,0	7,0	5,2	9,7	2,6	2,4	1,8
<i>A. australe</i>	1,0	55,0	88,3	37,3	6,0	5,0	20,0	8,0	8,0	5,0	5,0
<i>A. magellanica</i>	0,0	85,0	78,8	29,0	6,0	8,0	1,3	4,7	7,7	1,7	3,2
<i>B. globosa</i>	4,0	85,0	121,7	31,7	5,0	0,0	17,8	7,3	4,0	0,3	1,4
<i>D. andina</i>	1,0	88,1	121,7	67,0	5,0	10,0	9,9	8,3	9,7	0,3	3,2
<i>D. multifida</i>	2,0	6,0	28,3	46,3	2,0	5,0	20,0	14,1	15,7	5,0	5,0
<i>G. astragalina</i>	1,0	44,8	46,2	37,5	4,0	8,0	4,1	6,7	20,7	2,4	3,7
<i>G. chilensis</i>	0,0	60,2	80,8	15,9	4,0	7,0	3,7	4,0	4,0	1,7	3,2
<i>M. sativa</i>	1,0	22,2	52,4	5,2	3,0	6,0	16,4	11,7	17,3	2,3	3,6
<i>S. chilensis</i>	3,0	72,5	77,3	58,3	2,0	7,0	8,9	10,7	1,0	0,2	0,3

A continuación se discuten las correlaciones de Pearson encontradas más relevantes, todas con un  $p$  valor  $< 0,05$ .

Actividad antioxidante y fenoles totales expresan una interdependencia con  $r = 0,88$  ( $p = 0,0007$ ), esto sugiere una elevada correlación e interdependencia de estas variables. Lo mismo ha sido señalado en otros trabajos para estos parámetros (Katsube *et al.*, 2004; Arnao *et al.*, 2011). Por otro lado la actividad antioxidante y el contenido de fenoles presentan, en ambos casos, una interdependencia de  $r = 0,63$  ( $p = 0,0485$ ) con la cantidad de compuestos fenólicos; esto sugiere que una mayor cantidad de bandas observadas en cromatografía de capa delgada guarda relación con una mayor actividad antioxidante y un mayor contenido de fenoles totales.

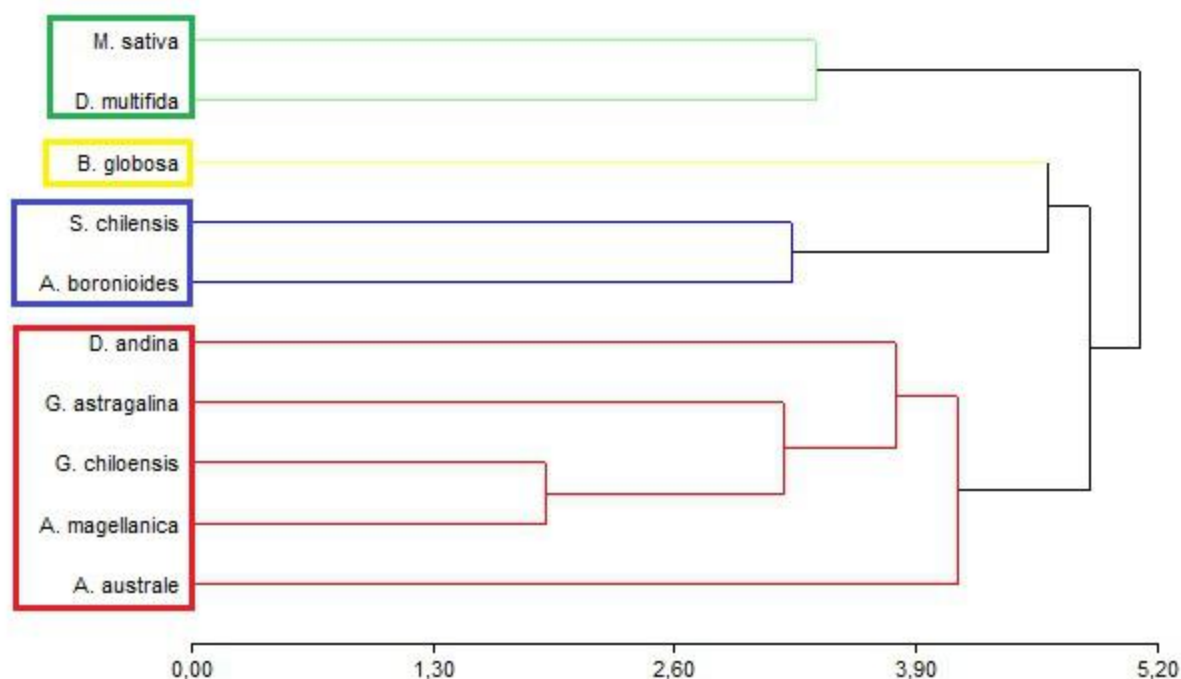
Existe una correlación negativa con  $r = -0,65$  ( $p = 0,0035$ ) entre usos medicinales y genotoxicidad, y una correlación negativa muy interesante con  $r = -0,88$  ( $p = 0,0036$ ) entre usos medicinales y citotoxicidad en células derivadas de cáncer de colon. Esto sugiere que las plantas con mayor cantidad de usos medicinales tienen una relación inversa con la genotoxicidad, es decir no serían genotóxicas; este aspecto resulta muy lógico desde una perspectiva de la evolución humana, en la que selección natural llevó a la humanidad a utilizar y consumir plantas seguras. Por otro lado la correlación inversa entre usos medicinales y citotoxicidad en células de cáncer de colon ( $r = -0,88$ ) indica que las especies con mayores usos medicinales poseen valores de  $EC_{50}$  bajos, por lo que son bioactivas y citotóxicas para las células derivadas de cáncer en bajas concentraciones; si se utilizasen estas infusiones con fines terapéuticos habría que calcular con suma precisión la cantidad a ingerir según cada caso, para que ejerza efecto citotóxicos en las células de cáncer y no en las normales, aunque para llegar a este punto deberían ampliarse los estudios con una mayor cantidad de modelos celulares no derivados de cáncer.

Por otra parte, cabe señalar que no se encontró una marcada correlación entre toxicidad general (*A. salina*) y los ensayos celulares como era de esperarse de acuerdo a los resultados de algunos autores (Anderson *et al.*, 1991; Rajabi *et al.*, 2015). De todas maneras el ensayo de toxicidad general si podría tener utilidad predictiva en futuras investigaciones como un indicador inicial de citotoxicidad, en un hipotético diseño con las líneas celulares aquí estudiadas y un elevado número de extractos. *A. salina* se podría usar como ensayo inicial para descartar extractos no bioactivos, y de esta forma eficientizar los tiempos y costos de los experimentos con células.

En cuanto al análisis multivariado (Figura 6.1), puede observarse como se agruparon *S. chilensis* y *A. boronioides*, las dos plantas que resultaron ser las más interesantes en cuanto a la idea central de esta tesis. Su agrupamiento diferencial puede explicarse en base a que ambas compartieron muchas características, como reportar numerosos usos medicinales, un bajo número de compuestos fenólicos principales y volátiles mayoritarios, además de valores similares de ausencia de genotoxicidad. Si bien no entran con variables en el análisis multivariado, ambas especies también presentan citotoxicidad sobre células derivadas de cáncer de colon, probablemente por apoptosis.

*B. globosa* reportó varias características particulares por lo que no se agrupa con ninguna de las otras especies. Aunque presenta cercanía con *A. boronioides* y *S. chilensis*. Es una planta

interesante para continuar estudiando, debido a su alta actividad antioxidante y contenido de fenoles, así como por su citotoxicidad frente a las tres líneas celulares derivadas de cáncer.



**Figura 6.1.** Análisis de clúster. Agrupamiento de las especies en cuatro conjuntos, según los valores obtenidos para los principales parámetros estudiados en este trabajo. Correlación cofenética=0,698 (Software Infostat, Argentina).

En verde se agrupan *M. sativa* y *D. multifida*, lo cual puede explicarse por valores bajos de actividad antioxidante, similar cantidad de compuestos fenólicos principales y volátiles mayoritarios, baja toxicidad general pero elevados valores para genotoxicidad.

Finalmente *A. australe*, *A. magellanica*, *D. andina*, *G. astragalina* y *G. chiloensis* se engloban en un último grupo. Se trata de especies que se pueden destacar en alguna variables particular y comparten un valor muy bajo para usos medicinales, combinado con valores medios y altos de actividad antioxidante, flavonoides y genotoxicidad.

En cuanto al aspecto de la potencial actividad anticancerígena de los extractos analizados, es factible que los efectos más llamativos de la actividad antiproliferativa puedan deberse al compuesto fenólico rutina. La rutina está presente de forma notoria en *A. boronioides* y *S. chilensis*, y también en *B. globosa* y *D. andina*. Este flavonoide en particular ha sido mencionado como mediador de señales en células de cáncer (Perk *et al.*, 2014) y en particular como responsable de actividad antiproliferativa y apoptosis (Bourogaa *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011). Cabe aclarar que la actividad antiproliferativa puede deberse además a efectos aditivos o sinérgicos entre los distintos compuestos de cada extracto (Carmona y Pereira, 2013); consecuentemente con este enfoque Koosha *et al.* (2016) han propuesto un mapa celular en el que especifican los distintos sitios de acción donde diferentes flavonoides pueden estar ejerciendo una actividad antiproliferativa en células de cáncer de colon. Con un enfoque similar, Rosa *et al.*

(2016) han revisado los posibles mecanismos de acción para explicar la actividad antiproliferativa en células de cáncer de colon ejercida por distintos ácidos fenólicos e hidroxicinámicos. Ambos trabajos coinciden en la necesidad de continuar realizando estudios para comprender el efecto antiproliferativo de los compuestos fenólicos sobre las células de cáncer de colon. Para profundizar la comprensión de la actividad ejercida por los liofilizados de las plantas nativas analizadas, particularmente *S. chilensis* y *A. boronioides*, sería interesante evaluar específicamente la citotoxicidad de sus compuestos fenólicos principales, de forma individual y combinada. De esta forma se podría dilucidar si la actividad antiproliferativa encontrada se debe a alguno de sus compuestos individuales, a los compuestos principales combinados, o a otras características más complejas de estos extractos.

Finalmente, en base al desarrollo previo de la presente tesis y acorde a la visualización de la Tabla 6.2 se presentan a continuación puntos de discusión destacados para cada una de las plantas estudiadas.

*Adesmia boronioides* es una especie con numerosos usos medicinales, su infusión no se destacó en cuanto a actividad antioxidante ni por su contenido de fenoles, pero presentó valores medios de flavonoides. El número de compuestos fenólicos y volátiles principales se ubicó en rangos medios. La toxicidad general presentó valores intermedios (si se tienen en cuenta los valores obtenidos para la totalidad de las distintas infusiones mediante el bioensayo de *A. salina*), pero como se indicó anteriormente no presentaría riesgos de toxicidad aguda en su consumo. No reporta genotoxicidad, y adicionalmente ejerció efectos citotóxicos de forma diferencial sobre dos de las tres líneas celulares derivadas de cáncer analizadas (respecto de la célula no derivada de cáncer) posiblemente por el proceso de apoptosis. Se considera que es una planta sumamente interesante con la cual se pueden continuar y profundizar estudios.

*Apium australe* posee escasos usos medicinales. Presentó valores medios en los parámetros fitoquímicos generales para su infusión y un alto contenido de fenoles. Se describió por primera vez la composición química de su aceite esencial. Si bien la genotoxicidad fue media, no resultó bioactiva en cuanto a toxicidad general o citotoxicidad sobre líneas celulares. Debido a que se trata de una especie comestible el aporte de compuestos fenólicos dietarios es de interés, aunque en vista de su posible genotoxicidad sería recomendable realizar más estudios acerca de la seguridad en su ingesta.

*Artemisia magellanica* no reporta usos medicinales conocidos. Presentó valores medios y altos para la mayoría de los parámetros fitoquímicos y de actividad biológica, siendo muy tóxica pero no ejerciendo una citotoxicidad interesante sobre líneas derivadas de cáncer de colon. Dada la notoria toxicidad que se encontró sobre distintos organismos (*S. cerevisiae*, *A. salina*, *A. cepa*) cabe señalar dos aspectos: uno es que esta planta no debería ser consumida por el ser humano (aunque no existen registros de que esto ocurra), el otro es que sería factible utilizarla como fuente de extractos biocidas con diversa aplicación, por ejemplo con actividad antifúngica o insecticida. Por otro lado, se describió por primera vez la composición química de su aceite

esencial, el cual podría ser útil en la industria de los perfumes, debido a su combinación única de ésteres.

*Buddleja globosa* es otra de las especies con amplios usos medicinales que presentó valores medios y altos en la mayoría de los parámetros fitoquímicos. No se encontraron cantidades detectables de aceites esenciales por hidrodestilación. No presentó toxicidad general, y mostró bajo riesgo de genotoxicidad, por otro lado si fue citotóxica sobre las líneas celulares analizadas. Es una planta para la que puntualmente sería interesante analizar su citotoxicidad sobre otras líneas celulares que no sean derivas de cáncer.

*Drimys andina* reporta usos medicinales escasos, presentó valores altos para todos los parámetros fitoquímicos estudiados. Se describió por primera vez la composición química de su aceite esencial La toxicidad general fue baja, pero reportó genotoxicidad principalmente por la inducción de micronúcleos. Fue citotóxica sobre las líneas celulares estudiadas. De forma similar a a *B. globosa* es un planta que puede ser de interés en cuando a su potencial actividad anticancerígena si se amplian los estudios con otras líneas celulares.

*Dhysphania multifida*, una planta con usos medicinales reconocidos, presentó un alto valor para el contenido de flavonoides pero no se destacó en ningún otro aspecto fitoquímico. El aceite esencial estuvo constituido en un 52,3% por ascaridol. Tampoco resultó ser citotóxica sobre las líneas celulares, aunque si reportó genotoxicidad alta. Puede concluirse que en base al modelo utilizado no posee riesgo de toxicidad aguda, pero no es una planta para consumir de forma continuada en el tiempo debido al riesgo de genotoxicidad.

*Glycyrrhiza astragalina*, con escasos usos medicinales presentó valores bajos y medios de atributos fitoquímicos. Se describió por primera vez la composición química de su aceite esencial. Sobre las líneas celulares la citotoxicidad resultó baja, por otro lado el valor de toxicidad general fue medio y el de genotoxicidad alto. Esta planta no resultó interesante para los aspectos centrales abordados en este trabajo.

*Grindelia chilensis*, sin usos medicinales conocidos, mostró valores medios en casi la totalidad de los aspectos evaluados en esta tesis. Se describió por primera vez la composición química de su aceite esencial. La citotoxicidad sobre células derivadas de cáncer de colon puede ser de interés a concentraciones altas.

*Madia sativa*, presentó valores bajos y medios en la mayoría de los parámetros estudiados. La composición química de su aceite esencial se estudió por primera vez, el aroma es cítrico y dulce. Por otro lado se destacó su alta genotoxicidad. Esta planta no resultó de interés en cuanto a las características nutracéuticas de sus infusiones ni en cuanto a la potencial actividad anticancerígena.

*Solidago chilensis* con reconocidos usos medicinales, presentó valores medios y altos de parámetros fitoquímicos (salvo para la variedad de compuestos fenólicos, la cual es baja). Se destaca su nula genotoxicidad y su alta citotoxicidad sobre líneas celulares derivadas de cáncer de colon. Se considera que es una planta sumamente interesante con la cual se deberían continuar y profundizar estudios.

Tabla 6.2. Especies estudiadas y principales parámetros obtenidos presentados de forma cualitativa.

	<i>A. boronioides</i>	<i>A. australe</i>	<i>A. magellanica</i>	<i>B. globosa</i>	<i>D. andina</i>	<i>D. multifida</i>	<i>G. astragalina</i>	<i>G. chilensis</i>	<i>M. sativa</i>	<i>S. chilensis</i>
Usos medicinales	+++	+	-	+++	+	++	+	-	+	+++
Actividad antioxidante	+	++	+++	+++	+++	-	++	++	+	+++
Fenoles totales	+	++	++	+++	+++	+	+	++	+	++
Flavonoides totales	++	++	++	++	+++	+++	++	++	+	+++
Variedad de compuestos fenólicos	++	+++	+++	+++	+++	+	++	++	++	+
Variedad de compuestos volátiles	++	+	+++	-	+++	+	++	++	++	++
Toxicidad general	++	-	+++	+	+	-	++	++	+	+
Genotoxicidad	-	++	++	++	++	+++	+++	++	+++	-
Citotoxicidad sobre línea celular no derivada de cáncer	+	-	++	+++	+++	-	+	++	+	+++
Citotoxicidad sobre células de cáncer de colon	++	-	+	++	++	-	+	+	+	+++

(-) valores nulos, (+) valores bajos, (++) valores medios, (+++) valores altos.

### 6.3. CONCLUSIONES FINALES

En este trabajo se estudiaron por primera vez importantes propiedades nutracéuticas para las infusiones de diez plantas nativas de la Patagonia Argentina: actividad antioxidante, compuestos fenólicos presentes y además la potencial actividad anticancerígena (actividad citotóxica sobre líneas celulares derivadas de cáncer de colon).

Los resultados obtenidos muestran la importancia y el potencial de algunas de las especies nativas patagónicas analizadas como fuente novedosa de antioxidantes y compuestos fenólicos dietarios. Varias de las plantas aquí estudiadas poseen altos niveles de antioxidantes y compuestos fenólicos, superiores a los de numerosas plantas consumidas históricamente como infusión en otras partes del mundo; en algunos casos los valores son incluso superiores a los del té verde. Las infusiones de *B. globosa*, *D. andina* y *S. chilensis* se destacan en cuanto a su actividad antioxidante, además *B. globosa* y *D. andina* poseen una elevada cantidad de compuestos fenólicos. En total se identificaron 28 compuestos fenólicos.

El perfil de compuestos volátiles se analizó por primera vez para las especies *A. australe*, *A. magellanica*, *D. andina*, *G. astragalina*, *G. chilensis* y *M. sativa*. La información generada puede ser de utilidad ecológica y de posible interés cosmético. En este último aspecto se destacó como dato de particular interés, la composición del aceite esencial de *A. magellanica*, con ésteres poco usuales y un aroma frutado-cítrico muy especial.

No se encontraron compuestos novedosos del grupo de las lactonas sesquiterpénicas ni de las cumarinas. Se corroboró la presencia de diterpenos para especies en las que se encontraban previamente reportados (*G. chilensis*, *M. sativa* y *S. chilensis*).

Sobre la seguridad en el consumo cabe alertar puntualmente sobre el riesgo de toxicidad que indicaron las infusiones de *A. magellanica*, *D. andina*, *D. multifida*, *G. astragalina*, *G. chilensis* y *M. sativa*.

Respecto a la actividad citotóxica (potencial actividad anticancerígena), *A. australe* y *D. multifida* no mostraron bioactividad. *B. globosa*, *D. andina* y *G. chilensis* mostraron citotoxicidad pero sin poder llegar a resultados concluyentes, por lo que podrían considerarse plantas de interés para futuros estudios en este aspecto. Por otra parte, las especies *A. magellanica*, *G. astragalina*, *G. chilensis* y *M. sativa* no reportaron actividad citotóxica de interés. Por último, se encontró que *A. boronioides* y *S. chilensis* ejercen una potencial actividad anticancerígena muy interesante al ejercer citotoxicidad sobre las células derivadas de cáncer de colon, probablemente mediante apoptosis.

Finalmente, es sumamente llamativo, y cabe destacar, que las plantas que cuentan con mayores antecedentes de usos medicinales fueron las que resultaron más interesantes para el abordaje central de este trabajo. Esto resalta la importancia de los conocimientos de los pueblos originarios y el valor de los datos bibliográficos etnobotánicos.

## BIBLIOGRAFIA

- Acevedo F, Rubilar M, Shene C, Navarrete P, Romero F, Rabert C, Jovilet P, Valot V, Chardot T. 2012. Seed oil bodies from *Gevuina avellana* and *Madia sativa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:6994-7004.
- Adams RP. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Illinois, United States of America. 804 pp.
- Afsar T, Trembley J, Salomon CE, Razak S, Khan MR, Ahmed K. 2016. Growth inhibition and apoptosis in cancer cells induced by polyphenolic compounds of *Acacia hydaspica*: involvement of multiple signal transduction pathways. *Scientific reports* 6:23077:1-11.
- Ahmed B, Dwidei S, Adin MZ, Azam A, Al-Shaerei M, Khan MS, Musarrat J. 2017. Mitochondrial and chromosomal damage Induced by oxidative stress in Zn<sup>2+</sup> ions, ZnO-Bulk and ZnO-NPs treated *Allium cepa* roots. *Scientific reports* 7:1-14.
- Alipieva K, Korkina L, Orhan IO, Georgiev MI. 2014. Verbascoside-A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology advances* 32(6):1065-1076.
- Alonso J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Corpus Libros, 1ra Ed. Rosario, Argentina. 1144 pp.
- Alonso J, Desmachelier C. 2015. Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Corpus, Buenos Aires, Argentina. 749 pp.
- Altay A, Celep GS, Yaprak AE, Baskoe I, Bozoglu F. 2016. Glassworts as possible anticancer agents against human colorectal adenocarcinoma cells with their nutritive, antioxidant and phytochemical profiles. *Chemistry and biodiversity* 14(3):11-24.
- Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunampula S. 2016. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition journal* 2016:15-19.
- Andersen OM, Markham KR. 2006. Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications. CRC Press, Taylor y Francis Group, New York, United States of America. 1212 pp.
- Anderson JE, Goetz CM, McLaughlin JL. 1991. A blind comparison of simple bench-stop bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor presscreens. *Phytochemical analysis* 2:107-111.
- Andrioli NB. 2011. Evaluación de agentes químicos con potencial genotóxico en células meristemáticas de *Allium cepa*. Tesis doctoral FCEN-UBA. 214 pp.
- Angelini L, Moschini E, Colonna G, Belloni P, Bonari E. 1997. Variation in agronomic characteristics and seed oil composition of new oilseed crops in central Italy. *Industrial crops and products* 6:313-323.
- Arnao I, Seminario J, Cisneros R, Trabucco J. 2011. Potencial antioxidante de 10 accesiones de yacón, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson, procedentes de Cajamarca – Perú. *Anales de la Facultad de Medicina* 72(4):239-243.
- Arrebola DF, Fernández LA, Curveco Sánchez DL. 2009. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de toxicología en línea* 2009:40-52.
- Arteaga JF, Montoya R, Palma A, Garrido G, Pintado S, Mellado J. 2012. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH essay for the determination of antioxidant capacity of active principles. *Molecules* 17:5125-5138.
- Ashkenasi Avi y Salvesen Guy. 2014. Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology* 30:337-356.
- Atlas de Malezas, versión 1.0. INTA. Web (accedida por última vez el 06/10/2018): <http://rian.inta.gov.ar/atlasmalezas/atlasmalezasportal/DetalleMaleza.aspx?pagante=CXF&idmaleza=23561>
- Ayaz M, Saquid A, Junaid M, Ullah S, Subhan F, Ahmed J. 2017. Neuroprotective potentials of essential oils. *Frontiers in aging neuroscience* 168(9):1-16.
- Backhouse N, Delporte C, Apablaza C, Farías M, Goity L, Arrau S, Negrete R, Castro C, Miranda H. 2008a. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. *Journal of ethnopharmacology* 119:160-165.
- Backhouse N, Rosales L, Apablaza C, Goity L, Erazo S, Negrete R, Theolduz C, Rodríguez J, Delporte C. 2008b. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *Journal of ethnopharmacology* 116:263-269.

- Bandoni A. 2003. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Cyted, Buenos Aires, Argentina. 417 pp.
- Bandoni A, Retta D, Di Leo Lira P, Van Varen C. 2009. ¿Son realmente útiles los aceites esenciales? Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 8(5):1-8.
- Banfalvi G. 2017. Methods to detect apoptotic cell death. Apoptosis 22(2):306-323.
- Banerje A, Laya M, Mora HR, Cabrera EV. 2008. The chemistry of bioactive diterpenes. Current organic chemistry 12 (13):1050-1070.
- Baradit V. 2018. Ilustraciones botánicas.
- Barboza G, Cantero J, Núñez C, Pacciaroni A y Espinar A. 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. Kurtziana 34(1-2):7-365.
- Bate-Smith EC. 1972. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. Journal of lineean society – botany 58:371:395.
- Behzad S, Ebrahim K, Mosaddegh M, Haeri A. 2016. *Primula auriculata* extracts exert cytotoxic and apoptotic effects against HT-29 human colon adenocarcinoma cells. Iranian journal of pharmaceutical research 15(1):311-322.
- Bennet, L., Rojas, S. y Seefeldt T. 2012. Role of antioxidants in the prevention of cáncer. Journal of Experimental and Clinical Medicine 4(4):215-222.
- Bernal J, Mendiola J, Ibañez E, Cifuentes A. 2011. Advanced analysis of nutraceuticals. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 55:758–774.
- Bidau CJ, Amat AG, Yajia ME, Marti DA, Gimenez MD, Riglos A, Silvestroni A, Torres GM, Fumagalli E. 2006. Evaluation of cytotoxic and mitodepressive activity of aqueous extracts from thirteen argentine medicinal plants. Acta farmacológica bonaerense 25(4):555-559.
- Bohlmann F, Jakupovic J, King RM, Robinson H. 1982. New labdane derivatives from *Madia sativa*. Phytochemistry 21:1103-1107.
- Böhm L, Arisemendi N, Ciampi L. 2009. Nematicidal activity of leaves of common shrub and tree species from Southern Chile against *Meloidogyne hapla*. Ciencia e investigación agraria 36(2):249-258.
- Bolt HT, Stewart JD, Hengster JG. 2011. A comprehensive review about micronuclei: mechanisms of formation and practical aspects in genotoxicity testing. Archives of toxicology 85:861-862.
- Bonaciu AA, Aboul-Enein A, Fleschin E. 2012. FTIR spectrophotometric methods used for antioxidant activity assay in medicinal plants. Applied spectroscopy reviews, 47(4):245-255.
- Boots AW, Haenen GRM, Bast A. 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. European journal of pharmacology 585:325-337.
- Bora K y Sharma A. 2011. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. Pharmaceutical Biology 49(1):101-109.
- Borneo, R., León, A., Aguirre A., Ribotta, P. y Cantero, J. 2009. Antioxidant capacity of medicinal plants from de province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. Food Chemistry 112:664-670.
- Bouayed J, Piri K, Rammal H, Dicko A, Desor F, Younos C, Soulimani R. 2007. Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. Food Chemistry 104:364-368.
- Bourogaa E, Bertrand J, Despeaux M, Jarraya B, Fabre N, Damak K, El Feki A, Racaud-Sultan C. 2011. Hammada scoparia flavonoids and rutin kill adherent and chemoresistant leukemic cells. Leukemia research 35:1093-1101.
- Brand-Williams W, Cuvelier V, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Food science technology 28(1):25-30.
- Brewer M. 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. Comprehensive reviews in foods science and food safety 10:221-247.
- Briskin D. 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant Physiology 124:507-514.
- Bussmann RW, Malca G, Glen A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, Dubose D, Ruiz D, Saleda J, Martinez M, Carillo L, Walker K, Kuhlman A, Townesmith A. 2011. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. Journal of ethnopharmacology 137:121-140.

- Bustamante S, Álvarez A, Mendiburen R, Vergara F, Zárate I, Collado C, Morales M. 2015. Fundamentación preclínica del uso etnomédico de matico (*Buddleja globosa* Hope). *Revista de fitoterapia* 15(1):37-51.
- Calixto J. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. *Journal of Ethnopharmacology* 100:131-134.
- Carballo MA, Cortada CM, Gadano AB. 2005. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoria* 14(2):95-108.
- Carmona F y Pereira A. 2013. Herbal medicines: old and new concepts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23(2):379-385.
- Carlsen M, Halvorsen B, Holte K, Bohn S, Dragland S, Sampson L, Willey C, Senoo H, Umezono Y, Sanada C, Barikmo I, Berhe N, Willett W, Phillips K, Jacobs D, Blomhoff R. 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal* 9(3):1-11.
- Celaya LS, Saluzzo L, Cabana RC, Viturro CI. 2014. Propiedades antioxidantes de mezclas de extractos acuosos de especies aromáticas de zonas áridas de Jujuy. *Lilloa* 52 (Supl):16-18.
- Cerda-García-Rojas C, Bucio MA, González SB, García-Gutierrez H, Joseph-Nathan P. 2015. Absolute configuration of esquelane derivatives from *Adesmia boronioides* by vibrational circular dichroism. *Tetrahedron: Asymmetry* 26 (2-3):136-140.
- Chanda S, Dave R. 2009. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research* 3(13):981-996.
- Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Rakariyatham N. 2005. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food chemistry* 92:491-497.
- Chari RJ. 2008. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Accounts of chemical research* 41(1):98-107.
- Chauhan B, Kumar G, Kalam N, Ansari S. 2013. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 4(1):4-9.
- Chemspider. 2018. Web (accedida por última vez el 10/10/2018):<http://www.chemspider.com/>
- Cheng F y Cheng Z. 2015. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in plant science* 6:1-16.
- Christaki E, Bonos E, Giannenas I, Florou-Paneri P. 2012. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture* 2:228-243.
- Conacher, H., Iverson, F., Lau, P. y Page, B. 1986. Levels of BHA and BHT in human and animal adipose tissue: interspecies extrapolation. *Food and Chemical Toxicology* 24:1159-1162.
- Cordell G. 2000. Biodiversity and drug discovery-a symbiotic relationship. *Phytochemistry* 55: 463-480.
- Correa M. y Costaguta M. 1999. *Flora Patagónica*. Colección científica del INTA. Buenos Aires, Argentina. 559 pp.
- Cragg G y Newman DJ. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100:72-79.
- Cruz A, Silva M, Sammes P. 1973. Further terpenoids and phenolics of *Drymis winteri*. *Phytochemical reports* 12:2549-2550.
- Cseke L y Kaufman P. 2006. *Natural Products from Plants*. CRC Press, Taylor y Francis Group, New York, United States of America. 569 pp.
- Da Costa F, Terfloth L, Gasteiger J. 2005. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. *Phytochemistry* 66(3):345-353.
- Da Cunha F, Forde T, Mendes G, Malherios A, Philo V, Yunes R, Calixto J. 2001. Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life sciences* 70:159-169.
- Da Silva-Port's P, Chisté RC, Godo HT, Prado MA. 2013. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. *Food Research International* 53(2):875-881.
- Dai J y Mumper R. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15:7313-7352.

- Dalar A, Konczak I. 2013. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. *Industrial Crop and Products* 44:383-390.
- Detaee P, Parichanon P, Trakunleewatthana P, Chanseetis C, Lertsiri S. 2012. Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. *Food chemistry* 133:953-959.
- Devriese S, Van den Bosschee L, Van Welden S, Holvoet T, Pinheiro I, De Vos M, Laukens D. 2017. T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes. *Histochemistry and cell biology* 48(1):85-93.
- Dewick P. 2009. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. Wiley, Chicester, United Kingdom. 546 pp.
- Drewes JL, Housseau F, Sears CL. 2016. Sporadic colorectal cancer: microbial contributors to disease prevention, development and therapy. *British journal of cancer* 115:273-280.
- Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of agricultural and food chemistry* 57:1768-1774.
- Eid S, El-Readi M y Wink M. 2012. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. *Phytomedicine* 19:1307-1314.
- Ekenäs C, Zoubroska A, Schuler B, Vrede T, Andreassen K, Backlund A, Merfot I, Bohlin L. 2008. Screening for anti-inflammatory activity of 12 Arnica (Asteraceae) species assessed by inhibition of NF- $\kappa$ B and release of human neutrophil elastase. *Planta medica* 74:1789-1794.
- El-shamy AM, El-Hawary SS, El-Shabrawy AO, Glasl H. 2000. Essential oil composition of three *Grindelia* species. *Journal of essential oil research* 12(5):631-634.
- Erlum I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research* 24:851-874.
- Farhana L, Antaki F, Annes MR, Majundar APN. 2016. Role of cancer stem cells in racial disparity in colorectal cancer. *Cancer medicine* 5(6):1268-1278.
- Farmacopea Argentina 7ma edición. 2003. ANMAT, Buenos Aires, Argentina, 2745 pp.
- Farzaneh V, Carvalho IS. 2015. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Industrial Crops and Products* 65:247-258.
- Fernandes TC, Mazzeo DE, Marin-Morales MA. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to triXuralin herbicide. *Pesticide biochemistry and physiology* 88:252-259.
- Fisher S, Berti M, Wilckens R, Baeza M, Pastene E, Inostroza L, Tramón C, Gonzalez W. 2011. Characterization and propagation of some medicinal plants in the central-south region of Chile. *Industrial Crops and Products* 34(2):1313-1321.
- Fiskesjö G. 1985. The *Allium* as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102: 99-102.
- Fiskesjö G. 1988. Fiskesjo, G. (1988) The *Allium* test-an alternative in environmental studies, the relative toxicity of metal ions *Mutat. Res* 197(2), 243-260.
- Fiskesjö G. 1997. *Allium* test for screening chemicals: evaluation of cytologic parameters. *Plants for environmental studies*. CRC Lewis Publishers, New York, United states of America, 308-333 pp.
- Finkel T y Hoolbrook N. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.
- Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis* 24:1043-1048.
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of biological chemistry* 12:239-243.
- Folin O, Ciocalteu V.1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of biological chemistry* 73:627-650.
- Fraga CG. *Plant phenolics and human health. Biochemistry, nutrition, and pharmacology*. John Wiley and Sons, Newjersey, United States of America. 610 pp.
- Fraga CG y Oteiza PI. 2011. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 51:813-823.
- Fraga CG, Oteiza PI, Galleano M. 2014. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840:931-934.

- Fraumberger E, Scola G, Laliberté V, Duong A, Andrezza A. 2016. redox modulations, antioxidants, and neuropsychiatric disorders. *Oxidative medicine and cellular longevity* doi: 10.1155/2016/4729192
- García L, Lemos I, Rivera P, Erazo S. 1997. Biological and chemical study of paico (*Chenopodium chilense*, Chenopodiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 57:85-88.
- Gadano A, Gurni A, López MN, López P, Gratti A, van Baren C, Ferraro G, Carballo M. 2000. Cytogenetic effects of aqueous extracts of the medicinal plant paico (*Chenopodium multifidum* L.). *Pharmaceutical Biology* 38(1):7-12.
- Gadano A, Gurni A, López P, Ferraro G, Carballo M. 2002. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Ethnopharmacology* 81:11-16.
- Gadano A, Gurni A, Carballo M. 2006. Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family. *Journal of Ethnopharmacology* 103:246-251.
- Gadano A, Gurni A, Carballo M. 2007. Herbal medicines: cytotoxic effects of Chenopodiaceae species used in argentinian folk medicine. *Pharmaceutical Biology* 45(3):217-222.
- Garle MJ, Fentem JH, Fry JR. 1994. *In vitro* citotoxicity tests for the prediction of acute toxicity *in vivo*. *Toxicology in vitro* 8(6):1303-1312.
- Garrido G, Ortiz M, Pozo P. 2013. Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 1(1): 30-38.
- Gentile C, Reig C, Corona O, Todaro A, Mazzaglia A, Perrone A, Gianguzzi G, Agusti M, Farina V. 2016. Pomological traits, sensory profile and nutraceutical properties of nine cultivars of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits grown in mediterranean area. *Plant foods for human nutrition* 71(3):330-33.
- Gershman R, Gilbert D, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119:623-626.
- Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen JZ, Xie XQ, Altman KH, Karsak M, Zimmer A. 2008. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the national academy of sciences* 105(6):9009-9104.
- González SB, 2002. Estudio de *Adesmia boronioides* Hook.f., una especie aromática y medicinal nativa de la Patagonia. Tesis Doctoral FFyB, UBA. Doctorado en el área Productos Naturales, 219 pp.
- González SB, Bandoni AL, van Varen C, Di Leo Lira P, Cerda-García R, Joseph Nathan P. 2002. Structure, conformation and absolute configuration of novel bisnorsesquiterpenes from the *Adesmia boronioides* essential oil. *Tetrahedron* 58(15):3065-3071.
- González S, Houghton P, Hout J. 2003. The activity against leukocyte eicosanoid generation of essential oil and polar fractions of *Adesmia boronioides* Hook. f. *Phytotherapy Research* 17: 290-293.
- González SB, Molares S. 2004. Plantas medicinales utilizadas en comunidades rurales del Chubut, Patagonia Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 3(3): 58-62.
- González SB, Bandoni A, van Baren C, Di Leo Lira P, García C, Joseph-Nathan P. 2004. The essential oil of the aerial parts of *Adesmia boronioides* Hook f. *Journal of essential oil research* 16:513-516.
- González SB, Huaiquino L, González A, van Baren C, Di Leo Lira P, Bandoni AL. 2009. Uso popular del paico y composición química de su aceite esencial en la zona de Esquel (Chubut, Argentina). ICEB, Bariloche, Argentina, 303-307.
- González SB, Gastaldi B, Assef Y, Pereira L, van Baren C, Di Leo Lira P, Retta D, Bandoni LA. 2013. Composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Solidago chilensis* Meyen, especie medicinal de la Patagonia Argentina. *Dominguezia* 29:66-67.
- González SB, Ladio AH, Gastaldi B, Sofrás FM, Mazzoni A, Sánchez G. 2018 a. Ethnobotany: Application of Medicinal Plants - Chapter 6: *Paramela (Adesmia boronioides* Hook.f.): From popular uses to commercialization. (En prensa) Ed CRC Press Taylor & Francis G.
- González IN, Periago MJ, Alonso FJ. 2017. Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española. *Revista española de nutrición y dietética* 21(4):320-326.
- Golenowski ME, Bongiovanni GA, Palacio L, Núñez CO, Cantero JJ. 2006. Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 107:324-341.
- Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. 1993. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Experimental cell research* 206(2):204-221.

- Gratti, A. 1998. El aporte de la etnobotánica al estudio de la farmacobotánica: la región patagónica, 167-184. En *Farmacobotánica y farmacognosia en Argentina 1980-1998*. Ediciones Científicas Americanas, Buenos Aires, Argentina. 298 pp.
- Greenwell M y Rahman PK. 2015. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *International journal of science research* 6(10):4103-4112.
- Guardia T, Rotelli AE, Juárez AO, Perzer LE. 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *56(9):683:687*.
- Gullon B, Lú-Chau TA, Moreira MT, Lema JM, Eibes G. 2017. Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in food science y technology* 67:1-49.
- Günter C, Barra C, Cesio MV, Dellacasa E, Ferrando L, Ferreira L, García C, González G, Heinzen H, Lloret A, Lorenzo D, Menéndez P, Paz D, Soule S, Vázquez A, Moyna P. 1999. Antioxidants properties of *Solidago chilensis* L. flavonoids. *Acta Horticulturae* 501: 159 -163.
- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27:1-93.
- Halliweel B. 2001. Free radicals and other reactive species in disease. *Enciclopedia of life sciences* 1:1-7.
- Halliwell, B. 2015. Free radicals and other reactive species in disease. *Enciclopedia of life sciences* doi: 10.1002/9780470015902.a0002269.pub3
- Hamidi M, Javanova B, Panovska T. 2014. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian pharmaceutical bulletin* 60(1):9-8.
- Hammer GD, McPhee SJ. 2010. *Pathophysiology of disease : an introduction to clinical medicine*. McGraw-Hill Medical, New York, United States of America 784 pp.
- Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA. 2010. Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines. *Biology of reproduction* 82:235-245.
- Harmand D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11(3):298-300.
- Hazra AG, Chatterjee P. 2008. A nontoxic antitumour compound from the leaves of *Bauhinia scandens* characterized as 1- O-alkyl glycerol by gas-liquid chromatography and evaluation of its antitumour property by brine shrimp bioassay. *Industrial crops and products* 27:39-43.
- Hirose M., Takesada Y., Tanaka H., Tamano S., Kato T. y Shirai T. 1997. Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 19:207-212.
- Hodgson E. 2004. *A textbook of modern toxicology*. John Wiley & Sons, New Jersey, United States of America, 582 pp.
- Hold, GL. 2016. Gastrointestinal microbiota and colon cáncer. *Digestive diseases* 34:244-250.
- Holopainen JK, Kivimäenpää M, Julkunen-Tiito R. New light for phytochemicals. *Trends in biotechnology* 20:1-4.
- Hosseinzadeh H, Nasiri-Asl M. 2015. Pharmacological effects of *Glycyrrhiza* spp. and its bioactive constituents: update and review. *Phytotherapy Research* 29:1868–1886.
- Houghton J. 2003. *Buddleja globosa*: a medicinal plant of Chile, their chemistry, biological activity and traditional uses. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas aromáticas y medicinales* 2(3):36-41.
- Huang D, Ou B, Prior R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1841-1856.
- Hugo WB. 1978. Phenols: a review of their history and development as antimicrobial agents. *Microbios* 23:83-85.
- Instituto de Botánica Darwinion, Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (2018) <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm> (accedida por última vez el 24/09/2018).
- Ivanescu B, Miron A, Corciova A. 2015. Sesquiterpene lactones from *Artemisia* genus: biological activities and methods of analysis. *Journal of analytical methods in chemistry* 2015:1-21.
- Jara-Arancio P, Carmona MR, Correa C, Saqueo FA, Arancio G. 2012. Leaf morphological and genetic divergence in populations of *Drimys* (Winteraceae) in Chile.
- Jin K. 2010. Modern biological theories of aging. *Aging and disease* 1(2):72:74.
- JNPAM-V Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus aceites esenciales. 2016.

- Conclusiones finales del encuentro. Web (visitada por última vez el 19/05/2018): <http://jornadasaromaticasymedicinales.blogspot.com.ar/p/comite-organizador.html>
- Kahl R y Kappus H. 1993. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 196(4):329-338.
- Kahur R, Kaur H, Dhindsa AS. 2013. *Glycyrrhiza glabra*: a phytopharmacological review. *International journal of pharmaceuticals sciences and research* 4(7): 2470-2477.
- Kalemba D. 1998. Constituents of the essential oil of *Solidago virgaurea* L. *Flavour and fragrance journal* 13:373-376.
- Kaliora A, Kogiannou D, Kefalas P, Papassideri I, Kalogerolopoulos P. 2014. Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention?. *Food Chemistry* 142:233-241.
- Kalra E. 2003. Nutraceutical-definition and introduction. *AAPS PharmSciTech* 5(3):1 -2.
- Katsube T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaki Y, Anuurad E, Shiwaku K, Yamane Y. 2004. screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, dpph radical scavenging assay, and folin-ciocalteu assay. *Journal of agricultural and food chemistry* 52:2391-2396.
- Khan R, Sultana S. 2011. Farnesol attenuates 1,2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of wistar rats. *Chemico-biological interactions* 192(3):193-200.
- Khanna N, Sharma S. 2013. *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: a review. *Indian journal of pharmaceutical and biological research* 1(3):105-119.
- Kodicek E, Young F. 1969. Captain Cook and Scurvy. *Notes & Records, Royal Society of London* 24:43-63.
- Kogiannou DA, Kaleropoulos N, Kafalas P, Polissiou M, Kaliora AC. 2013. Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food and chemical toxicology* 61:152-169.
- Kolligs, FT. 2016. Diagnostics and epidemiology of colorectal cancer. *Visceral medicine* 32:158-164.
- Koosha S, Alsawsh MA, Looi CY, Zaurin M. 2016. An association map on the effect of flavonoids on the signaling pathways in colorectal cancer. *International journal of medical sciences* 13(5):374-385.
- Koul B, Taak P, Kumar A, Khatri T, Sanyal I. 2017. The *Artemisia* genus: a review on traditional uses, phytochemical constituents, pharmacological properties and germplasm conservation. *Journal of Glycomics & Lipidomics* 7(1):1-7.
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing* 89:217-233.
- Kumar S, Verma Y, Gautam AK. 2000. Possible use of *Allium test* in environmental monitoring. *Pollution research* 19(4):555-560.
- Lange BM, Ahkamy A. 2013. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities. *Plant biotechnology journal* 11:169-196.
- Laphitz RML, Semple JC. 2015. A multivariate morphometric analysis of the *Solidago chilensis* group in South America and related taxa in North America (Asteraceae, Astereae). *Annals of missouri botanical garden* 100:423-441.
- Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: advances in research*. Research Signpost, Kerala, India. 33pp.
- Le Bivic A, Hirn M, Reggio H. 1988. HT-29 cells are an in vitro model for the generation of cell polarity in epithelia during embryonic differentiation. *Proceedings of the national academy of sciences* 85:136-140.
- Leite A, Dantas AF, Oliveira GL, Junior AL, Lima SG, Freitas R, Mela-cavalcante AA, Lopes D. 2015. Evaluation of toxic, cytotoxic, mutagenic, and antimutagenic activities of natural and technical cashew nut shell liquids using the *Allium cepa* and *Artemia salina* bioassays. *Biomed research international* 2015:1-16.
- Li S, Li SK, Gan RY, Song FL, Kuang L, Li HB. 2013. Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. *Industrial Crops and Products* 51:289-298.

- Li ZH, Wang Q, Ruan X, Pan CD, Jiang DA. 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules* 15:8933-8952.
- Libralato G, Prato E, Migliore L, Cicero AM, Manfra L. 2016. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological indicators* 69:35-49.
- Lilienblum W, Dekant W, Foth H, Gebel T, Hengster JG, Khal R, Kramer PJ, Wollin KM. 2008. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Archives of toxicology* 82:211-236.
- Liman P, Cigerci IH, Akyil D, Eren Y, Konuk M. 2011. Determination of genotoxicity of fenaminosulf by Allium and Comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99:61-64.
- Lindholm P, Gullbo J, Claeson P, Gorasson U, Johansson S, Blacklun A, Larsson R, Bohlin L. 2002. Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of fractionated plant extracts. *Journal of Biomolecular Screening* 7(4):333-340.
- Lisiuk R, Hudz N. 2017. Differential spectrophotometry: application for quantification of flavonoids in herbal drugs and nutraceuticals. *International journal of trends in food and nutrition* 1(2):1-5.
- Löbler L. 2013. Propagacão, metabolismo secundário e genotoxicidade de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). Tesis de Maestría, Universidad Nacional de San Martíá, Brasil, 98 pp.
- Lombardini V, Carrera I, Cacabelos R. 2017. In Vitro Screening for Cytotoxic Activity of Herbal Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017:1-8.
- López-Alarcón C, Denicola A. 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta* 763:1-10.
- Luengo M. 2004. Los aceites esenciales. Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *Ámbito farmacéutico* 23(7):88-91.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. 1970. The systematic identification of flavonoides. Springer-Verlag, New Yor, United States of America. 361pp.
- Maffei M. 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African journal of botany* 76:612-631.
- Malgalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. 2006. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Analytical chemical acta* 558:310-318.
- Maltthaüs B, Angelini L. 2005. Anti-nutritive constituents in oilseed crops from Italy. *Industrial crops and products* 21:89-99.
- Mandal SM, Chackborty D, Dey S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior* 5(4):359-368.
- Matejic J, Sarac Z y Randelovic V. 2010. Pharmacological activity of sesquiterpene lactones. *Biotechnology y biotechnological equipment* 24:95-100.
- Meng C, Bai C, Brown TD, Hood LE, Tian Q. 2018. Human gut microbiota and gastrointestinal cancer. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 16(1):33-49.
- Mercandeli A, Bessa GP, Ronchi SN, Segato TPS, da Silva AG. 2012. Evidence for the safe use of the extract from the Brazilian *Arnica*, *Solidago chilensis* Meyen, in primary health care. *Chinese Medicine* 3:4-8.
- Mesurado M, Cassará ML, Misico R, Bardón A, Ybarra MI, Cartagena E. A new depigmenting-antifungal methylated grindelane from *grindelia chiloensis*. *Chemistry and Biodiversity* 14(5):1-19.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putman JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica* 45:31-34.
- Moch, R. 1986. Pathology of BHA and BHT induced lesions. *Food and Chemical Toxicology* 24:1169-1186.
- Molares S, Ladio AH. 2009. Ethnobotanical review of the Mapuche medicinal flora: Use patterns on a regional scale. *Journal of ethnopharmacology* 122:251-260.
- Molares S y Ladio AH. 2012. Mapuche perceptions and conservation of Andean Nothofagus forests and their medicinal plants: A case study from a rural community in Patagonia, Argentina. *Biodiversity and Conservation* 21(4):1079-1093.
- Molares S y Ladio AH. 2014. Medicinal plants in the cultural landscape of a Mapuche-Tehuelche community in arid Argentine Patagonia: an eco-sensorial approach. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 10(61):1-14.
- Molina-Salinas G, Said-Fernández S. 2006. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline* 3:633-638.

- Mongelli ER, Coussio JD, Ciccía GN. 1995. Estudio de toxicidad aguda de plantas medicinales argentinas mediante el bioensayo de *Artemia salina*. *Dominguezia* 12(1):35-42.
- Moraes-de-Souza RA, Oldoni TLC, Regitano-d' Arce MAB, Alencar SM. 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 6(1):41-47.
- Movileanu I, González M, Hafley B, Miller R, Keeton J. 2013. Comparison of Dried Plum Puree, Rosemary Extract, and BHA/BHT as Antioxidants in Irradiated Ground Beef Patties. *International Journal of Food Science* 2013:1-7.
- Muñoz M, Barrera E, Meza I. 1981. El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. *Boletín del museo nacional de historia natural* 33:1-91.
- Muñoz-Concha D, Vogel H, Razmilic I. 2004. Variación de compuestos químicos en hojas de poblaciones de *Drimys* spp. (Magnoliophyta: Winteraceae) en Chile. *Revista chilena de historia natural* 77:43-50.
- Muñoz O y Delporte C. 2015. Chemicals constituents of *Adesmia boronioides* and evaluation of their antioxidant activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 8(3):2919-2923.
- Naghbi F, Khalaj A, Mosaddegh M, Malekmohadi M, Hamzeloo-Moghadam M. 2014. Cytotoxic activity evaluation of some medicinal plants, selected from Iranian traditional medicine Pharmacopoeia to treat cáncer and related disorders. *Journal of ethnopharmacology* 155:230-239.
- Naghma K, Adhami MV, Mukhtar H. 2010. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 17:39-52 .
- Naidu JR, Ismail R, Sasidharan S. 2014. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of methanol extract of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae). *Tropical journal of pharmaceutical research* 13:101-107.
- Nambiar KS y Hedge V. 2016. *International dental and medical journal of advanced research* 2:1-5.
- Natoli M, Leoni BD, D'Agnano I, D'Onofrio M, Brandi R, Arisi I, Zucco F, Felsani A. 2011. Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer. *Journal of cell physiology* 226(6):1531-1543.
- National Cancer Institute (2019). Web: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer?redirect=true> (accedida por última vez el 16/02/2019).
- Naveed M, Hejazi V, Abbas M, WenHua L, XiaoHui Z. 2018. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & pharmacotherapy* 97:67-74.
- Nedialkova ZK, Nedialkov PT, Nikolov SD. 2009. The genus *Chenopodium*: phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. *Pharmacognosy reviews* 3(6):280-306.
- Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. 2010. Phenolexplorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database. <https://doi.org/10.1093/database/bap024> (accedida por última vez el 06 de Agosto de 2018).
- Nobel Media. 2018a. Albert Szent-Györgyi – Biographical. Nobel Media AB 2014. Web (vitada por última vez el 11/10/2018): [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1937/szent-gyorgyi-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1937/szent-gyorgyi-bio.html)
- Nobel Media. 2018b. YouYou Tu – Artemisin. Web (vitada por última vez el 11/10/2018) <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/tu/lecture/>
- Ochoa O, Quiros F. 1989. *Apium* Wild Species: Novel Sources for Resistance to Late Blight in Celery. *Plant Breeding* 102:317-321.
- Oi N, Chen H, Kim O, Lubet RA, Bode AM, Dong Z. 2012. Taxifolin suppresses UV-induced skin carcinogenesis by targeting EGFR and PI3K. *cáncer prevention research* 5(9):1103-1114.
- Omeño E, Baldy V, Ballini C. 2008. Production and diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: effect of soil nutrients. *Journal of chemical ecology* 34:3419-1229.
- Omeño E, Fernández C. 2012. Los terpenos de las plantas. *Investigación y ciencia* 2012:62-69.
- Öskara A, Akyil D, Eren Y, Erdogmus SF. 2015. Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay. *Cytotechnology* 67(5):783-791.
- Organización Mundial de la Salud. 2003. Manual sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra, Suiza, 87 pp.

- Padilla-González GF, dos Santos FA, da Costa FB. 2016. Sesquiterpene lactones: more than protective plant compounds with high toxicity. *Critical reviews in plant sciences*.
- Padmaja R, Arum PC, Prashant D, Deepack M, Amit A, Anjana M. 2002. Brine shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 73:508-510.
- Pan MH, Ho CT. 2008. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chemical society reviews* 37:2558-2574.
- Pandey K y Rivsky S. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2(5):270-278.
- Pandey A, Singh P. 2017. The genus artemisia: a 2012–2017 literature review on chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of essential oils. *Medicines* 68:1-15.
- Parra AL, Yhebra RS, Sardiñas IG, Buela LI. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8(5):395-400.
- Pellicer J, García S, Canela MA, Garnatje T, Korobkov AA, Twibell AD, Vallès J. Genome size dynamics in *Artemisia* L. (Asteraceae, Anthemideae): following the track of polyploidy. *Plant Biology* 12:820-830.
- Pereira TM, Franco DP, Vitorino F, Kummerle AE. 2018. Coumarin compounds in medicinal chemistry: some important examples from the last years. *Current topics in medicinal chemistry* 8(2):124-148.
- Pérez OP, Lazo FJ. 2010. Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de protección vegetal* 22(1):34-43.
- Pérez-Jimenez J, Arranz S, Taberner M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food research international* 41:274-285.
- Perk AA, Shatynska M, Gercek YC, Boztas K, Yazgan M, Fayyaz M, Foroquii AA. Rutin mediated targeting of signaling machinery in cancer cells. *cancer cell international* 14(124):1-5.
- Pisoschi AM, Negulescu GP. 2011. Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry* 1(1):1-10.
- Pisoschi A, Pop A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97:55-74.
- Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G. 2016. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: a review. *Oxidative Medicine and Cell Longevity* 16:1-37.
- PubChem. 2018. Web (accedida por última vez el 10/10/2018): <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Quiñones MM, Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* 27(1):76-89.
- Rahman A, Choudhary M, Thomsen W. 2005. *Bioassay techniques for drug development*. Taylor & Francis, Amsterdam, The Netherlands, 240 pp.
- Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. 2015. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Daru journal of pharmaceutical sciences* 2015:1-6.
- Rapoport E, Ladio AH, Sanz E. 2005. *Plantas nativas comestibles de la Patagonia andina*. Imaginaria, Bariloche, Argentina. 81 pp.
- Raskov H, Burcharth J, Pommergaard HC. 2017. Linking gut microbiota to colorectal cancer. *Journal of cancer* 8:3378-3395.
- Reddy, L., Odhav, B. y Bhoola, K. 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology and Therapeutics* 99:1-13.
- Retta D, González S, Guerra P, van Baren C, Di Leo Lira P, Bandoni P. 2017. Essential oils of native and naturalized Lamiaceae species growing in the Patagonia region (Argentina). *Journal of Essential Oil Research* 29:64-75.
- Ricco R, Agudelo I, Wagner M. 2015. Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa* 52(2):161-174.
- Rimada R, Jeandupeux R, Cafferata L. 2007. La estabilidad termica de ascaridol en solución acuosa. Su importancia en la acción farmacológica. *Latin america journal of pharmacy* 26(1):115-118.
- Rosa LS, Silva NJ, Soares NC, Monteiro MC, Teodoro AJ. 2016. Anticancer properties of phenolic acids in colon cancer-a review. *Juornal of nutrition and foods science* 6(2):1-7.
- Rousset M. 1986. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochemie* 68(9):1035-1040.

- Ruiz E, Fuentes G, Becerra J, González F, Silvia M. 2002. Comparison of flavonoid contents among Chilean species of *Drimys* J. R. Forst et G. Forst. (Winteraceae). *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 47(3):273-278.
- Russo A, Garbarino J. 2008. *Solidago chilensis* Meyen et *Kageneckia oblonga* Ruiz & Pav.: petite revue de leur profil antioxydant. *Phytothérapie* 6: 333 – 341.
- Sabir SM, Ahmad SD, Hamid A, Khan MQ, Athalyde ML, Santos DB, Boligon AA, Rocha JBT. 2012. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. *Food Chemistry* 3:741-747.
- Sairam KV, Gurupadayya BM, Chandan RS, Nagesha DK, Vishwanathan B. 2016. A review on chemical profile of coumarins and their therapeutic role in the treatment of cáncer. *Mini-reviews in medicinal chemistry* 18(2)113-141.
- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell biology and toxicology* 21(1):1–26.
- Sanchez G. 2018. comunicación personal. Docente UNR, Tecnicatura en viveros.
- Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Heredia B, Zevallos LC, Jacobo-Velázquez A. 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical methods* 21:5990-5999.
- Santos BL, Silva AR, Pitanga BP, Sousa CS, Grangeiro MS, Fragomeni DO, Sampaio GP, Freire SM, Trady M, Costa SL. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. *Food chemistry* 127:404-411.
- Saleh M, Zwaving J, Malingré T, Bos R. 1985. The essential oil of *Apium graveolens* var. *secalinum* and its cercaricidal activity. *Pharmaceutisch Weekblad* 7:277-279.
- Saqueiros C, López LM, Caffini NO, Natalucci CL. 2003. Proteolytic activity in some Patagonian plants from Argentina. *Fitoterapia* 74:570-577.
- Schmeda-Hirschmann G. 1988. A labdan diterpene from *Solidago chilensis* roots. *Planta medica* 54:179-180.
- Schmeda-Hirschman G, Sierra L, Retamal R, Rodríguez J. 1992. Hypotensive effect and enzyme inhibition activity of mapuche medicinal plant extracts. *Phytotherapy Research* 6:184-188.
- Schmeda-Hirschman G, Loyola JI, Razmilic I, Reyes S, Rodríguez J, Pacheco P, Theoduloz C. 1993. La farmacopea mapuche, una fuente de productos biológicamente activos. *Universum* 8:1993.
- Schmeda-Hirschmann G. 1995. *Madia sativa*, a potential oil crop of central Chile. *Economy botany* 49:257-259
- Schmeda-Hirschman G, Razmilic I, Gutierrez M, Loyola J. 1999. Proximate composition and biological activity of food plants gathered by chilean amerindians. *Economy Botany* 53(2):177-187.
- Schmeda-Hirschman G, Rodríguez J, Astudillo L. 2002. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 81:111-115.
- Schmeda-Hirschmann G, Quispe C, Gonzalez B. 2015. Phenolic profiling of the south american “Baylahuen” tea (*Haplopappus* spp., Asteraceae) by HPLC-DAD-ESI-MS. *Molecules* 20:913-928.
- Sebaug JL. 2011. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical statistics* 10:128-134.
- Sen T, Samanta SK. 2015. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 147:59-110.
- Serivan AK, Logeshwaran P, Subashchandrabose SR, Lockinton R, Naidu R, Megharaj M. 2018. Comparison of plants with C3 and C4 carbon fixation pathways for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils. *Scientific reports* 8:1-10.
- Sharma S, Ali A, Ali J, Shani KJ, Baboota S. 2013. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert opinion in investigation drugs* 22(8):1-17.
- Short P. 1979. *Apium* L. Sect. *Apium* (Umbelliferae) in Australasia. *Journal of the Adelaide Botanic Garden* 1(4):205-235.
- Silva AG, Sousa C, Koheler J, Fontana J, Christo A, Guedes-Bruni R. 2010. Evaluation of an extract of brazilian arnica (*Solidago chilensis* Meyen, Asteraceae) in treating lumbago. *Phytotherapy research* 24:283-287.
- Silva AG, Machado ER, Almeida L, Nunes R, Griesbecht P, Costa RM, Costa H, Romao W, Kuster R. 2015. A clinical trial with brazilian arnica (*Solidago chilensis* Meyen) glycolic extract in

- the treatment of tendonitis of flexor and extensor tendons of wrist and hand. *Phytotherapy research* 29(6):864-869.
- Silva CG, Herdeiro RR, Mathias CJ, Panek AD, Quaresma CH, Silva JFM, Menezes FS, Eleuterio ECA. 2005. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants *Pharmacological research* 52:229-233.
- Simirgotis M, Silva M, Becerra J, Schmeda-Hirschman G. 2012. Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Food chemistry* 131:318-327.
- Singlenton V, Orthofer R, Lamuela-Raventos R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology* 299:152-178.
- Smaka-Kinel V, Stegnar P, Lovka M, Toman J. 1996. The evolution of waste, surface and ground water quality using the *Allium test* procedure. *Mutation Research* 368:171-179.
- Subhayan S y Panda CK. 2017. Molecular aspects of cáncer chemopreventive and therapeutic efficacies of tea and tea polyphenols. *Nutrition* 43-44:8-15.
- Swift LJ. 1961. Fruit juice constituents, determination of linalool and  $\alpha$ -terpineol in florida orange products. *Journal of agricultural and food chemistry* 9(4):298-301.
- Tabung FK, Brown LS, and Fung TT. 2017. Dietary patterns and colorectal cáncer risk: a review of 17 years of evidence (2000-2016). *Current colorectal cáncer reports* 13:440-454.
- Taiz L y Zeiger E. 2006. *Secondary Metabolites and Plant Defense*. Plant Physiology, Fourth Edition. Sinauer Associates, Massachusetts, United States of America, 782 pp.
- Tamura EK, Jimenez RS, Waisman K, Gobbo-Neto L, Lopes NP, Malpezzi-Marinho EAL, Marinho EAV, Farksy SHP. 2009. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. *Journal of Ethnopharmacology* 122: 478-485.
- Tedesco SB, Dail Laughinghouse H. 2012. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. Environmental contamination, Intech, Rijeta, Croatia, 220 pp.
- Telanq N, Katdare M. 2007. Cell culture model for colon cáncer prevention and therapy: an alternative approach to animal experimentation. *Alternatives to animal experimentation* 24(1):16-21.
- The Plant List (2018). Version 1.1. Web: <http://www.theplantlist.org/> (accedida por última vez el 24/09/2018).
- Toit R, Volsteedt Y, Apostolides Z. 2001. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* 166:63-69.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. 2015. Global cáncer statistics, 2012. *CA: a cáncer journal for clinicians* 65:87-108.
- Trumble JT, Dercks W, Quiros CF, Beier RC. 1990. Host plant resistance and linear furanocoumarin content of *Apium* accessions. *Journal of economic entomology* 83(2):519-525.
- Ulibarri, E. 2007. Nueva especie y cambios nomenclaturales en *Adesmia* (Leguminosae) de Chile. *Novon* 17:263-266.
- Upton R, McAdam J, Clubbe C. 2016. Climate change risk assessment for plants and soils of the Falkland Islands and the services they provide. Monografía de Royal Botanic Gardens y la Unión Europea, 96 pp.
- Van Andel TR, Croft S, van Loon EE, Quiroz D, Towns AM, Raes N. 2015. Prioritizing West African medicinal plants for conservation and sustainable extraction studies based on market surveys and species distribution models. *Biological conservation* 181:173-181.
- Valverde SS, Oliveira TB, Souza SP. 2012. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). *Fitos* 7:131-136.
- Veres K, Roza O, Zöld E, Hohmann J. 2014. Chemical composition of essential oils of *Grindelia squarrosa* and *G. hirsutula*. *Natural products communications* 9(4):573-574.
- Vermerris W y Nicholson R. 2006. *Phenolic compound biochemistry*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 284 pp.
- Vila R, Mundina M, Tomi F, Furlán R, Zacchino S, Casanova J, Cañigueral S. 2002. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. *Planta medica* 68:164-167.
- Vipperla K., O'Keefe SJ. 2016. Diet, microbiota, and dysbiosis: a 'recipe' for colorectal cáncer. *Food and function* 7:1731-1740.

- Vogel H, Jeldres P, Razminic I, Doll U. 2011. Morphological characters, yields and active principles in wild and cultivated accessions of the Chilean medicinal plant *Buddleja globosa* Hope Industrial Crops and Products 34(2):1322-1326.
- Wagner H, Baldt S. 2001. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Springer, München, Germany, 384 pp.
- Wasser D, Ravetta D. 2000. Vegetative propagation of *Grindelia chiloensis* (Asteraceae). Industrial Crops and Products 11:7-10.
- Weinert BT, Timiras PS. 2003. Physiology of Aging. Invited Review: Theories of aging. Journal of applied physiology 95:1706-1716.
- Wickens P, Fernández MP, Gómez M, Peña I, Montenegro J. 2013. Sustainable management and use of a medicinal emblematic plant in Chile: *Buddleja globosa* Hope. Phytom 82:81-90.
- Wiley NIST (2008). The Wiley/NBS registry of mass spectral data. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, 2.0. 8th John Wiley & Sons, New York, United States of America.
- Winterbourn CC. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Nature chemical biology 4(5):278-286.
- Wojdilo A, Oszmianki O, Czemeys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food chemistry 105:940-949.
- Xu, Z. 2012. Important antioxidant phytochemicals in agricultural food products. Capítulo 1, 1-24. En Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals. Wiley-Blackwell, New Jersey, EEUU. 399 pp.
- Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. Annual reviews of plant biology 59:225-251.
- Yanez J, Vicente V, Alcatraz M, Castillo J, Benavente-García O, Canteras M, Teruel L. 2004. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. Nutrition and cancer 49(2):191-199.
- Yao M, Hou X, Wang F, Tan G, Xu Z, Xion A. 2018. Advances in the research of celery, an important Apiaceae vegetable crop. Critical Reviews in Biotechnology 2017:1-12.
- Yoo KM, Lee CH, Lee H, Moon B, Lee CY. 2008. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. Food chemistry 106:929-936.
- Zang H, Liu Q, Cao Y, Feng X, Zheng Y, Zou H, Liu H, Yang J, Xian M. 2014. Microbial production of sabinene-a new terpene-based precursor of advanced biofuel. 13(1):1-10.
- Zapata N, Smagghe. 2010. Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. Industrial crops and products 32:405-410.
- Zardini E. 1992. *Madia sativa* Mol. (Asteraceae-Heliantheae-Madiinae): an ethnobotanical and geographical disjunct. Economic botany 46:34-44.
- Zavala JA, Ravetta D. 2001. Allocation of photoassimilates to biomass, resin and carbohydrates in *Grindelia chiloensis* as affected by light intensity. Field Crops Research 69:143-149.
- Zavala JA, Ravetta D. 2002. The effect of solar UV-B radiation on terpenes and biomass production in *Grindelia chiloensis* (Asteraceae), a woody perennial of Patagonia, Argentina. Plant Ecology 161:185-191.
- Zuloaga F. 2013. Artículo de opinión en <http://www.conicet.gov.ar/ciencia-para-conocer-y-proteger-la-flora-argentina> (visitada por última vez el 14/06/2013).
- Zuloaga F, Belgrano M, Anton A. 2014. Flora Argentina: flora vascular de la República Argentina. Dicotyledoneae, Asteraceae. IBODA, San Isidro, Argentina, 546pp.