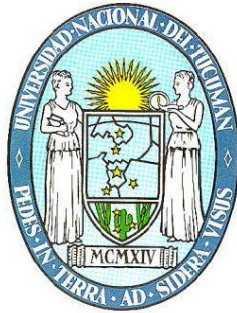


Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia



“FITOMEDICAMENTOS OBTENIDOS DE PLANTAS MEDICINALES ARGENTINAS COMO ESTRATEGIA PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE PATÓGENOS RESPONSABLES DE INFECCIONES VAGINALES”

Tesista:

Lic. María Alejandra Moreno

Director:

Dr. Jorge Esteban Sayago

Co- Directora:

Dra. María Inés Isla

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 47 - T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Mag. Adriana Correa Zeballos
Dr. Manuel Javier Aybar
Dra. Viviana Andrea Rapisarda
Bioq. Esp. Ana Verónica Oldano
Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra
Dra. María Antonieta Gordillo
Bioq. Esp. Vanesa Estela Quiroga
Sr. Mario Rodríguez
Sr. Joaquín Hernán Vargas
Srta. Elizabeth Abigail Gutiérrez
Srta. Karen Nahir Ríos

DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

VICE-DECANA

Dra. Inés del Carmen Ramos

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Inés Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 47 - T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES:

DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR:

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. Maria Cristina Rubio

Suplentes

Dra. Maria Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

Dra. Claudia Alejandra Crespo

Dra. María Angélica Véliz

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 47 - T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTOR/A EN BIOQUIMICA

CARRERA DE DOCTORADO EN BIOQUIMICA

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: 732/00

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: 489-CONEAU-12

Director:

Dr. Manuel Javier Aybar

Comité Académico:

Dra. Aida Ben Altabef

Dra. Gladis Susana Álvarez

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. Roxana Beatriz Medina

Dr. Raúl Armando Salomón



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 47 - T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



**TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:
“FITOMEDICAMENTOS OBTENIDOS DE PLANTAS MEDICINALES
ARGENTINAS COMO ESTRATEGIA PARA LA PREVENCIÓN Y
TRATAMIENTO DE PATÓGENOS RESPONSABLES DE
INFECCIONES VAGINALES”**

TESISTA:

Lic. María Alejandra Moreno

DIRECTOR:

Dr. Jorge Esteban Sayago

CODIRECTOR

Dra. María Inés Isla

COMISION DE SUPERVISIÓN:

Dra. Clara del Valle Silva

Dra. Natalia Cecilia Habib



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 47 - T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



Trabajo realizado en:

Instituto de Bioprospección y Fisiología Vegetal

INBIOFIV



CONICET

UNT

Con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT)

*a mi papá y mis abuelos, mis ángeles
que me guían desde el cielo...*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que me acompañaron y brindaron su apoyo, consejos y ánimos a lo largo de este proceso, sin las cuales no hubiese sido posible alcanzar esta meta...

A mi directora de Beca, Dra. María Inés Isla, quien me aceptó para realizar este trabajo de Tesis, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por ser mi guía, por su confianza, dedicación y por compartir su experiencia académica e intelectual en mi formación profesional. Por enseñarme que trabajando con pasión y esmero todo proyecto es al final recompensado. Le agradezco además el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta Tesis y los consejos tanto profesionales como personales que supo darme en esta etapa.

A mi director de Tesis, Dr. Jorge Sayago, por haberme aceptado para realizar este trabajo. Le agradezco por su apoyo, sus conocimientos, consejos y su pasión por la investigación que han sido fundamentales para la realización de esta Tesis.

A la Dras. Clara Silva y Natalia Habib por las correcciones y el minucioso seguimiento durante el desarrollo de la Tesis.

A la Dra. Amparo López Rubio, por recibirme en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC) y brindarme la posibilidad de capacitarme allí.

A la Dra. Susana Córdoba, por permitirme capacitarme en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

A las Dras. Soledad Cuello, María Inés Mercado y Graciela Ponessa por su asesoramiento y ayuda en la identificación y caracterización botánica de las especies vegetales.

Al Dr. Guillermo Schmeda-Hirschmann por su colaboración con los perfiles de HPLC-ESI-MS/MS y la identificación de compuestos químicos.

A las Dras. Catiana Zampini y María Rosa Alberto, por su colaboración en los ensayos de toxicidad y de técnicas antiinflamatorias, y por estar siempre disponibles durante estos años.

A la Magíster Myriam Arias, por su asesoramiento y colaboración en el desarrollo de los formulados farmacéuticos.

A la Dra. Fátima Nader y al Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA) por proveerme de las bacterias lácticas necesarias y por sus aportes en el uso de las mismas.

A mis compañeras/os de laboratorio por los momentos compartidos, por el ida y vuelta de técnicas, protocolos y material de trabajo. Por hacer más amenos y alegres los extensos días de trabajo dedicados a esta Tesis y por las reuniones y almuerzos compartidos, porque más allá de compañeros muchos se convirtieron en grandes amigos.

A mi familia, por su apoyo incondicional. Agradezco en especial a mi madre, por estar siempre presente en todos los momentos de mi vida, por haberme enseñado valores, por haberme brindado todas las posibilidades para poder estudiar y crecer personal y profesionalmente, y por brindarme contención y cariño cada día a pesar de la distancia. A mis hermanos porque siempre estuvieron cuando los necesite y a mis sobrinos que llenan mi corazón de alegría.

Agradezco especialmente a mi marido Fernando, por estar siempre a mi lado, apoyándome en todo momento, por su paciencia durante esta etapa, por su amor incondicional y compañerismo, por alentarme siempre a seguir avanzando y confiar en mis capacidades incluso más que yo misma.

A mis amigas/os de la facultad y de la vida, por ser mis pilares, por ayudarme a crecer y madurar como persona y por estar siempre conmigo apoyándome en todas las circunstancias vividas.

Doy gracias a Dios y a la Virgen por ser mi luz y guía en cada momento de mi vida.

A la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, a la Universidad Nacional de Tucumán y a mi país por brindarme la posibilidad de realizar mi formación de grado y posgrado de manera gratuita.

Al personal del Departamento de Posgrado de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, especialmente a la Lic. Marta Quinteros y a Carlos Puig por su paciencia y predisposición durante todo este tiempo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado una Beca de posgrado durante estos últimos años.

Finalmente extendiendo mi sincera gratitud a todas las personas que de alguna manera colaboraron a lo largo de estos años para poder concluir este trabajo...

Publicaciones realizadas durante este trabajo de Tesis Doctoral:

Moreno, M.A., Gómez-Mascaraque, L., Arias, M., Zampini, I.C., Sayago, J.E., Pino Ramos, L.L., Schmeda-Hirschmann, G., López-Rubio, A., Isla, M.I. (2018). Electrospayed chitosan microcapsules as delivery vehicles for vaginal phytoformulations. *Carbohydrate polymers*, 201, 425-437.

Mercado, M.I., **Moreno, M.A**, Ruiz, A.I., Rodríguez I.F., Zampini, C.I., Isla M.I., Ponessa, G.I. (2018). Morphoanatomical and histochemical characterization of *Larrea* species (Zygophyllaceae) from Northwestern of Argentina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(4), 393-401.

Moreno, M.A., Córdoba, S., Zampini, I.C., Mercado, M.I., Ponessa, G., Sayago, J.E., Pino Ramos, L.L., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I. (2018). Argentinean *Larrea* dry extracts with potential use in vaginal candidiasis. *Natural Product Communications*, 13, 171-174.

Moreno, M.A., Córdoba, S., Zampini, I.C., Mercado, M.I., Ponessa, G., Alberto, M.R., Nader-Macias, F., Sayago, J., Burgos-Edwards, A., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I. (2018). *Tetraglochin andina* Ciald.: A medicinal plant from the Argentinean highlands with potential use in vaginal candidiasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 216, 283-294.

Isla, M.I., **Moreno, M.A.**, Nuño, G., Carabajal, A., Alberto, M.R., Zampini, I.C. (2016). *Zuccagnia punctata* Cav.: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. Review. *Natural Product Communications*, 11, 1749-1755.

Moreno, M.A., Mercado, M.I, Nuño, G., Zampini, I.C., Cuello, A.S., Ponessa, G.I., Sayago, J.E., Isla, M.I. (2015). Histochemical localization and characterization of chalcones on the foliar surface of *Zuccagnia punctata* Cav. Insights into their physiological role. *Phytochemistry Letters*, 13, 134-140.

Moreno A., Nuño G., Cuello S., Sayago J.E., Alberto M.R., Zampini I.C., Isla M.I. (2015). Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activity characterization and toxicity studies of flowers of jarilla, a medicinal shrub from Argentina. *Natural Product Communications*, 6, 991-994.

Moreno, M.A, Zampini, I.C., Costamagna, M., Sayago, J.E., Ordoñez, R.M., Isla, M.I. (2014). Phytochemical composition and antioxidant capacity of *Psidium guajava* fresh fruits and flour. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 725-732.

Resúmenes publicados en revistas nacionales e internacionales:

Moreno, M.A., Orqueda, M.E., Gómez Gómez-Mascaraque, L., Sayago, J.E., López-Rubio, A., Isla, M.I. (2017). Films conteniendo extractos de “chilto” microencapsulados para su uso como envases de alimentos con propiedades antioxidantes. XIII Jornadas de Comunicaciones -V Interinstitucionales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L., U.N.T. Fundación Miguel Lillo. ISSN 2591-5819.

Salas, A., Isla, M.I., Zampini, I.C., Alberto, M.R., Torres, S., Sayago, J., Frenzel, A.M., Cuello, S., Cattaneo, F., Rodriguez, F., Torres Carro, R., Pérez, J., **Moreno, A.**, Carabajal, A., Orqueda, M.E., Gallo, C., Masino, L.M., Correa, F., Verón, H. (2017). Conociendo el “chilto”. XIII Jornadas de Comunicaciones- V Interinstitucionales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L., U.N.T. Fundación Miguel Lillo. ISSN 2591-5819.

Álvarez, M.A., Enrico, R.J, **Moreno, A.**, Zampini, C., Isla, M.I. (2017). Análisis de producción de polifenoles de plántulas obtenidas por cultivo *in vitro* de *Zuccagnia punctata*. XIII Jornadas de Comunicaciones- V Interinstitucionales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L., U.N.T. Fundación Miguel Lillo. ISSN 2591-5819.

Álvarez, M.A., Isla, M.I., Enrico, R.J., **Moreno, A.**, Zampini, C., Ponessa, G., Mercado, M.I. (2017). Caracterización morfo-anatómica de plántulas de *Zuccagnia punctata* (FABACEAE), obtenidas *in vitro*. XIII Jornadas de Comunicaciones- V Interinstitucionales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L., U.N.T. Fundación Miguel Lillo. ISSN 2591-5819.

Moreno, M.A., Córdoba, S., Zampini, I.C., Alberto, M.R., Nader-Macias, F., Sayago, J., Burgos-Edwards, A., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I. (2017). *Tetraglochin cristatum*, una planta medicinal de la puna argentina y su potencial uso en infecciones vaginales y procesos inflamatorios asociados. XII Simposio Argentino de Farmacobotánica- I Jornadas de Enseñanza de la Farmacobotánica. Posadas. Misiones. ISSN 1669-6859.

Zampini, I.C., Alberto, M.R., Carabajal, M.P.A., Torres Carro, R., **Moreno, A.**, Heredia, J., Isla, M.I. (2017). Flora del Noroeste Argentino, fuente de productos bioactivos con aplicación biotecnológica. XII Simposio Argentino de Farmacobotánica- I Jornadas de Enseñanza de la Farmacobotánica. Posadas. Misiones. ISSN 1669-6859.

Salas, A.L., Garcia, M.E., Espeche, L., Reyes, N., Mercado, M.I., Ponessa, G.I., Maldonado, L., **Moreno, M.A.**, Verón Ponce, H.E., Zampini, I.C., Isla, M.I. (2017). Origen botánico de muestras de propóleos de Catamarca mediante análisis de estructuras vegetales y granos de polen presentes en los mismos. XII Simposio Argentino de Farmacobotánica- I Jornadas de Enseñanza de la Farmacobotánica. Posadas. Misiones. ISSN 1669-6859.

Moreno, M.A., Córdoba, S., Zampini, I.C., Alberto, M.R., Sayago, J.E., Pino Ramos, L.L., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I. (2017). Potencial uso de extractos secos de especies de *Larrea* en el tratamiento de candidiasis vaginal. XII Simposio Argentino de Farmacobotánica- I Jornadas de Enseñanza de la Farmacobotánica. Posadas. Misiones. ISSN 1669-6859.

Isla, M.I., Alberto, M.R., Zampini, I.C., Sayago, J., Torres, S., Cuello, S., Quarenghi, M., Martínez Arriazu, M., Heredia, J., Arias, M., Nieva Moreno, M.I., Juárez, B., Lagorria Wilfredo, M., Albornoz, B., Kermes, N., Manzur, M., Tomas Grau, R., López Morales, N., Martínez, F., Alumnos de la Escuela Secundaria Nuestra Señora del Rosario de Colalao del Valle, Pérez, J., Torres Carro, R., Salas, A., **Moreno A.**, Costamagna, M., Carabajal, A., Gallo, C., Verón, H., Orqueda, E., Rodríguez, F., Cattaneo, F., Nuño, G. (2016). Proyecto de extensión: Voluntariado Universitario "Plantas Calchaquíes y Salud". Publicado en la revista *Lapsus Calami* Publicación especial Edición 1, 120. ISSN/ISBN: 2422-639X. II° Jornadas de Investigación, Docencia y Extensión en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. UNT. Presentación: Póster.

Zampini, I.C., Alberto, M.R., Sayago, J.E., Torres, S., Cuello, S., Arias, M., **Moreno, A.**, Carabajal, A., Torres Carro, R., Heredia, J., Rodríguez, F. (2016). Uso de ambientes áridos y semiáridos del NOA para el desarrollo de fitomedicamentos y productos cosméticos. Publicado en la revista *Lapsus Calami* Publicación especial Edición 1, 51. ISSN/ISBN: 2422-639X. II° Jornadas de Investigación, Docencia y Extensión en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. UNT. Presentación: Póster.

Moreno, M.A., Córdoba, S., Zampini, I.C., Sayago, J.E., Isla, M.I. (2015). Fitomedicamentos para infecciones vaginales obtenidos de plantas medicinales argentinas. XII Jornadas de Comunicaciones. IV Interinstitucionales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. Fundación Miguel Lillo. Presentación: Póster.

Moreno, M.A., Cuello, A.S., Zampini, I.C., Sayago, J.E., Isla, M.I. (2015). Caracterización fitoquímica y actividad antioxidante de extractos obtenidos con especies vegetales que crecen en ambientes de altura. XII Jornadas de Comunicaciones. IV Interinstitucionales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. Fundación Miguel Lillo. Presentación: Póster.

Moreno, M.A., Mercado, M.I., Nuño, G., Zampini, I.C., Cuello, A.S., Ponessa, G.I., Sayago, J.E., Isla, M.I. (2015). Localización histoquímica y caracterización de chalconas en la superficie foliar de *Zuccagnia punctata*. XII Jornadas de Comunicaciones. IV Interinstitucionales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. Fundación Miguel Lillo. Presentación: Póster.

Ezquer, M.E, Cuello, S., **Moreno, A**, Isla, M.I. (2015). Infusiones y decocciones de flores de plantas nativas del Noroeste Argentino como fuente de antioxidantes naturales y su comparación con té negro y té verde. XII Jornadas de Comunicaciones. IV Interinstitucionales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. Fundación Miguel Lillo. Presentación: Póster.

Hael, C.E., **Moreno, A**, Pérez, J., Isla, M.I. (2015). Caracterización química y biológica de extractos de propóleos de Santiago del Estero. XII Jornadas de Comunicaciones. IV Interinstitucionales. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. Fundación Miguel Lillo. Presentación: Póster.

Moreno, M.A., Nuño, G., Cuello, S., Sayago, J., Alberto, M.R., Zampini, I.C., Isla, M.I. (2015). Bioactividades y estudios de toxicidad de tinturas de flores de Jarilla macho, una planta medicinal argentina. X Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2015. Tucumán. Presentación: Póster.

Sayago, J.E., **Moreno, A.**, Nuño, G., Isla, M.I. (2015). Plantas con potencial uso en la prevención de enfermedades de poscosecha de citrus. X Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2015. Tucumán. Presentación: Póster.

Nuño, G., Alberto, M.R, Sayago, J.E., Arena, M., **Moreno, A.**, Cuello, S., Zampini, I.C., Isla, M.I. (2015). Potencial uso de extractos de partes aéreas de *Zuccagnia punctata* Cav. y sus compuestos aislados en procesos infecciosos bacterianos e inflamatorios. X Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2015. Tucumán. Presentación: Póster.

Moreno, M.A., Costamagna, M., Ordoñez, R., Zampini, I.C., Isla, M.I. (2013). Principales fitoquímicos bioactivos de harina de *Psidium guajava* (guayaba). XIII Jornadas Científicas y Encuentro de Jóvenes Investigadores “Augusto Palavecino”. Resolución H.C.D. N°0429-2013. San Miguel de Tucumán. Presentación: Póster.

Moreno, M.A., Costamagna, M., Ordoñez, R., Zampini, I.C., Isla, M.I. (2012). Propiedades nutricionales y funcionales de frutos de *Psidium guajava* (guayaba). XIII Jornadas Científicas y Encuentro de Jóvenes Investigadores “Augusto Palavecino”. Resolución H.C.D. N°0376-2012. San Miguel de Tucumán. Presentación: Póster.

INDICE

RESUMEN	21
ABSTRACT	23
CAPÍTULO I: Introducción	25
Microbiota vaginal	26
Infecciones vaginales	27
Vulvovaginitis por <i>Candida</i>	28
Características generales de las levaduras del género <i>Candida</i>	28
Sintomatología de vaginitis causada por <i>Candida</i>	29
Factores predisponentes para la candidiasis.	29
Factores de Virulencia en <i>Candida</i>	30
Diagnóstico de vaginitis causada por <i>Candida</i>	33
Tratamiento	37
Resistencia	39
Actividad antifúngica de productos naturales obtenidos de plantas	41
Metabolitos secundarios presentes en plantas medicinales	44
Compuestos fenólicos	44
Actividad biológica de los compuestos fenólicos	53
Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante.....	54
Los compuestos fenólicos como antioxidantes naturales	60
Proceso inflamatorio	61
Limitaciones en el uso de antiinflamatorios comerciales.....	64
Los compuestos fenólicos como antiinflamatorios	65
Relación entre los procesos infecciosos, oxidantes e inflamatorios.....	67
Hipótesis y objetivos	69
CAPÍTULO II: Materiales y Métodos	71
1. Material vegetal	72
2. Estudio microscópico de la morfología, estructura y anatomía de partes aéreas de las especies vegetales	74
2.1. Análisis micrográfico de las especies vegetales	74

2.2. Análisis histoquímico	74
3. Soluciones extractivas	75
4. Determinación de fitoquímicos	76
4.1. Determinación cualitativa de fitoquímicos	76
4.1.1. Determinación de alcaloides	76
4.1.2. Determinación de glucósidos cardiotónicos	76
4.1.3. Determinación de cumarinas.....	77
4.1.4. Determinación de flavonoides.....	77
4.1.5. Determinación de taninos.....	77
4.1.6. Determinación de saponinas	77
4.1.7. Determinación de derivados antracénicos libres.....	77
4.1.8. Determinación de triterpenos y/o esteroides	78
4.2. Determinación cuantitativa de fitoquímicos	78
4.2.1. Determinación del contenido de compuestos fenólicos	78
4.2.2. Determinación del contenido de compuestos fenólicos no flavonoides	78
4.2.3. Determinación del contenido de compuestos fenólicos flavonoides	79
4.2.4. Determinación de flavonas y flavonoles	79
4.2.5. Extracción y determinación del contenido de taninos condensados e hidrolizables	79
4.3. Perfil cromatográfico	80
4.3.1. Cromatografía en capa fina	80
4.3.2. HPLC-DAD	80
4.3.3. HPLC-ESI-MS/MS	80
5. Actividades biológicas.....	81
5.1. Evaluación de la actividad antifúngica	81
5.1.1. Microorganismos	81
5.1.2. Preparación del inóculo.....	82
5.1.3. Ensayos bioautográficos	82
5.1.4. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	82
5.1.4.1. Método de macrodilución seriada en agar.....	82
5.1.4.2. Método de microdilución en medio líquido	83

5.1.4.3. Evaluación del efecto de las combinaciones de extractos antimicrobianos	83
5.1.5. Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i>	85
5.1.5.1. Ensayo en medio líquido	85
5.1.5.1. Métodos de difusión en agar	86
5.1.6. Compatibilidad con lactobacilos	87
5.1.6.2. Microorganismos.....	87
5.1.6.2. Activación de lactobacilos.....	87
5.1.6.3. Ensayo de actividad antibacteriana	87
5.2. Actividad antiinflamatoria	88
5.2.1. Efecto de los extractos sobre la actividad de la enzima lipooxigenasa (LOX).....	88
5.2.2. Efecto de los extractos sobre la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX-2)	88
5.2.3. Efecto de los extractos sobre la actividad de la enzima fosfolipasa A2 (sFLA2).....	89
5.3. Actividad antioxidante.....	89
5.3.1. Capacidad de depuración de radicales libres por el método del radical catión 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina -6- ácido sulfónico) (ABTS ^{•+}).....	89
5.3.1.1. Preparación del radical catión ABTS	89
5.3.1.2. Método espectrofotométrico.....	90
5.3.2. Actividad depuradora de peróxido de hidrógeno	90
5.3.3. Actividad depuradora de radical hidroxilo.....	90
5.3.4. Actividad inhibitoria de la hemólisis oxidativa	91
5.3.4.1. Preparación de la suspensión de eritrocitos humanos	91
5.3.4.2. Ensayo de inhibición de la hemólisis oxidativa	91
5.4. Actividad mutagénica. Test de Ames	91
6. Formulación de fitoterápicos	92
6.1. Diseño de formulaciones fitoterápicas	92
6.1.1. Microencapsulación de extractos por electrospraying	92
6.1.2. Formulación de tabletas vaginales	93
6.1.3. Formulación de óvulos vaginales.....	93

6.2. Caracterización de formulados	93
6.2.1. Eficiencia de carga	93
6.2.2. Evaluación de las propiedades físicas de las tabletas.....	94
6.2.2.1. Determinación de dureza.....	94
6.2.2.2. Tiempo de desintegración (TD)	94
6.2.2.3. Ensayo de friabilidad.....	94
6.2.3. Caracterización morfológica de los formulados	95
6.2.4. Análisis infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR)	95
6.2.5. Evaluación de la capacidad de hinchamiento de los formulados	95
6.2.6. Liberación <i>in vitro</i> de extractos desde los formulados.....	96
6.2.7. Liberación de compuestos fenólicos desde los formulados en fluido vaginal sintético	96
7. Análisis estadístico	97
CAPÍTULO III: <i>Zuccagnia punctata</i>	98
1. Introducción.....	99
1.1. <i>Zuccagnia punctata</i> Cav.	99
1.2. Descripción botánica de <i>Z. punctata</i>	99
1.3. Distribución geográfica y hábitat de <i>Z. punctata</i>	99
1.4. Usos populares	101
1.5. Composición química y actividades biológicas.....	101
2. Resultados y discusión	104
2.1. Caracterización morfoanatómica de <i>Z. punctata</i>	104
2.2. Caracterización fitoquímica de un extracto hidroalcohólico de <i>Z. punctata</i> .	105
2.2.1. Determinación cualitativa de fitoquímicos	105
2.2.2. Determinación cuantitativa de fitoquímicos	105
2.2.3. Perfil cromatográfico	106
2.2.3.1. Cromatografía en capa fina	106
2.2.3.2. HPLC-ESI-MS/MS	106
2.2.4. Análisis fitoquímico del lavado foliar.....	109
2.3. Localización histoquímica de chalconas en tejidos de <i>Z. punctata</i>	110
2.4. Actividades biológicas del extracto de <i>Z. punctata</i>	113

2.4.1. Actividad antifúngica	113
2.4.2. Actividad antioxidante	116
2.4.3. Actividad antiinflamatoria	118
2.4.4. Actividad mutagénica. Test de Ames.....	120
CAPÍTULO IV: Especies de <i>Larrea</i>.	122
1. Introducción.....	123
1.1. Género <i>Larrea</i>	123
1.2. Descripción botánica.....	123
1.3. Distribución geográfica y hábitat de <i>Larrea</i>	123
1.4. Usos populares	124
1.5. Composición química y actividades biológicas.....	124
2. Resultados y discusión	127
2.1. Caracterización morfoanatómica de especies de <i>Larrea</i>	127
2.2. Caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Larrea</i>	132
2.2.1. Determinación cualitativa de fitoquímicos	132
2.2.2. Determinación cuantitativa de fitoquímicos	133
2.2.3. Perfil cromatográfico	134
2.2.3.1. Cromatografía en capa fina	134
2.2.3.2. HPLC-ESI-MS/MS	134
2.3. Localización histoquímica de los principales grupos químicos identificados en especies de <i>Larrea</i>	138
2.4. Actividades biológicas de los extractos de <i>Larrea</i>	140
2.4.1. Actividad antifúngica	140
2.4.2. Actividad antioxidante	143
2.4.3. Actividad antiinflamatoria.....	144
2.4.4. Actividad mutagénica. Test de Ames.....	145
CAPÍTULO V: <i>Tetraglochin andina</i>	147
1. Introducción.....	147
1.1. <i>Tetraglochin andina</i>	147
1.2. Descripción botánica	147
1.3. Distribución geográfica y hábitat.....	147

1.4. Usos populares	148
1.5. Composición química y actividades biológicas	148
2. Resultados y discusión	151
2.1. Caracterización morfoanatómica de <i>T. andina</i>	151
2.2. Caracterización fitoquímica de los extractos de <i>T. andina</i>	156
2.2.1. Determinación cualitativa de fitoquímicos	156
2.2.2. Determinación cuantitativa de fitoquímicos	156
2.2.3. Perfil cromatográfico	156
2.2.3.1. Cromatografía en capa fina	156
2.2.3.2. HPLC-ESI-MS/MS	157
2.3. Actividades biológicas del extracto hidroalcohólico de <i>T. andina</i>	162
2.3.1. Actividad antifúngica	162
2.3.2. Actividad antioxidante	164
2.3.3. Actividad antiinflamatoria	165
2.3.4. Actividad mutagénica. Test de Ames.....	167
CAPÍTULO VI: Sinergismo entre los extractos de las especies analizadas	168
1. Introducción.....	169
2. Resultados y discusión	171
2.1. Efecto de las combinaciones de extractos o mezclas bi-herbales sobre el crecimiento de levaduras aisladas de candidiasis vaginal	172
2.2. Estandarización química de la formulación bi-herbal	175
2.3. Estandarización biológica de preparaciones bi-herbales.	177
2.3.1. Actividad antioxidante	177
2.3.2. Actividad antiinflamatoria	179
2.3.3. Actividad mutagénica. Test de Ames	180
CAPÍTULO VII: Formulación de fitoterápicos	182
1. Introducción.....	183
2. Resultados y discusión	187
2.1. Diseño y caracterización de formulaciones fitoterápicas	187
2.1.1. Tabletas.	188
2.1.2. Microcápsulas	190

2.1.3. Óvulos	192
2.1.4. Ensayo de hinchamiento de formulados	194
2.1.5. Liberación <i>in vitro</i> de los extractos de plantas desde los formulados en un sistema tampón y en fluido vaginal simulado (FVS).	197
2.1.6. Actividades biológicas de extractos de plantas liberados desde los formulados	200
Aportes de este trabajo de Tesis Doctoral para promover la conservación y uso sustentable de plantas medicinales del NOA	205
CONCLUSIONES GENERALES	213
BIBLIOGRAFIA	214

RESUMEN

En los últimos años, la investigación de productos naturales ha atraído mucha atención en todo el mundo. Las plantas medicinales se han utilizado desde la antigüedad y constituyen una importante fuente de nuevos medicamentos. El objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral fue avanzar en el diseño de productos fitoterapéuticos para la prevención y/o tratamiento de infecciones vaginales, utilizando extractos hidroalcohólicos de especies vegetales que crecen en el noroeste de Argentina, tales como *Zuccagnia punctata*, *Larrea cuneifolia*, *Larrea divaricata*, *Larrea nitida* y *Tetraglochin andina*. Estas especies se utilizan en la medicina tradicional para tratar infecciones fúngicas y procesos inflamatorios.

Los perfiles fitoquímicos reflejaron la presencia de taninos, flavonoides, triterpenos y/o esteroides y derivados antracénicos en todas las especies vegetales. Se detectó la presencia de cumarinas en *L. divaricata* y de saponinas y glucósidos cardiotónicos en *T. andina*.

Se realizaron estudios de HPLC-ESI-MS/MS y se identificaron 23 compuestos en extractos de *Z. punctata* (principalmente chalconas), 50 compuestos en *T. andina* (en su mayoría taninos hidrolizables) y 12 compuestos en las especies de *Larrea* (trihidroxi-6,7' ciclolignano fue encontrado solo en *L. divaricata* y dihidroxi-metoxi-epoxilignano en *L. cuneifolia* y *L. nitida*).

Se determinó la actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos de las especies vegetales frente a hongos levaduriformes aislados de infecciones vaginales. De acuerdo a los resultados obtenidos, se podrían considerar a los fitoextractos de *Z. punctata*, *L. divaricata* y *L. nitida* como inhibidores fuertes del crecimiento de *Candida* spp., *L. cuneifolia* como inhibidor moderado y *T. andina* como inhibidor moderado o débil dependiendo de la cepa analizada. Se realizaron mezclas binarias entre las cinco especies vegetales utilizando el método del tablero de ajedrez. Algunas de las combinaciones mostraron efecto sinérgico, siendo las más activas las mezclas de *Z. punctata/L. nitida* (*Zp/Ln*); *Z. punctata/L. divaricata* (*Zp/Ld*) y *Z. punctata/L. cuneifolia* (*Zp/Lc*).

En general, las infecciones vaginales están asociadas a situaciones de estrés oxidativo y procesos inflamatorios, por ello se analizó la actividad de estos productos naturales como antioxidantes y antiinflamatorios. Tanto los extractos como las mezclas más activas (*Zp/Ln*, *Zp/Ld*, *Zp/Lc*) presentan capacidad de depurar radicales libres y especies de oxígeno reactivas, capacidad de inhibir la hemólisis oxidativa de eritrocitos humanos

y de inhibir la actividad de enzimas que participan en el proceso inflamatorio (fosfolipasa, lipooxigenasa y ciclooxigenasa).

Con el propósito de garantizar el uso terapéutico seguro de los extractos y mezclas binarias de los mismos, se evaluó el efecto genotóxico a través del test de Ames, demostrando que no presentan actividad mutagénica sobre ninguna de las dos cepas utilizadas (TA98 y TA100).

Se desarrollaron formulaciones farmacéuticas (óvulos, tabletas y microcápsulas) tanto de los extractos individuales como de las combinaciones más activas. Los formulados mantuvieron las actividades biológicas ensayadas, comparando con los valores obtenidos con los extractos utilizados para su formulación. Además, los formulados no mostraron contaminación biológica con hongos ni bacterias.

Estos resultados indicarían que los fitoextractos (individuales o combinados) y los formulados obtenidos a partir de ellos serían una buena alternativa para el tratamiento de las infecciones fúngicas y de los procesos oxidativos asociados.

ABSTRACT

In recent years, researches focused on natural products have attracted a lot of attention around the world. Medicinal plants have been used since ancient times and are an important source of new medicines. The aim of this Doctoral Thesis is to advance in the design of phytotherapeutic products for the prevention and / or treatment of vaginal infections using hydroalcoholic extracts of plant species that grow in northwestern Argentina, such as *Zuccagnia punctata*, *Larrea cuneifolia*, *Larrea divaricata*, *Larrea nitida* and *Tetraglochin andina*. These species are used in traditional medicine to treat fungal infections and inflammatory-related pathologies.

The phytochemical study showed the presence of tannins, flavonoids, triterpenes and/ or steroids and anthracene derivatives in all plant species. Coumarins were also detected in *L. divaricata*, while *T. andina* tested positive for saponins and cardiogenic glucosides.

HPLC-ESI-MS/MS studies were performed. This analysis allowed to identify 23 compounds in *Z. punctata* (mainly chalcones), 50 compounds in *T. andina* (mostly hydrolysable tannins) and 12 compounds in *Larrea* species (trihydroxy-6,7'-ciclolignan was found only in *L. divaricata* and dihydroxy-methoxy-epoxilignan in *L. cuneifolia* and *L. nitida*).

The plant species hydroalcoholic extracts were assayed for their anti-fungal capacity against yeast-like fungi isolated from vaginal infections. According to the results obtained, the phytoextracts of *Z. punctata*, *L. divaricata* and *L. nitida* could be considered as strong inhibitors of the growth of *Candida* spp., *L. cuneifolia* as a moderate inhibitor and *T. andina* as a moderate or weak inhibitor depending on the strain analyzed. Binary mixtures were made following the checkboard method with the five plant species. Some of the combinations showed a synergic effect, being the most active the mixtures of *Z. punctata/L. nitida* (*Zp/Ln*); *Z. punctata/L. divaricata* (*Zp/Ld*) y *Z. punctata/L. cuneifolia* (*Zp/Lc*).

In general, vaginal infections are associated to oxidative stress and inflammatory processes; thus, studies on the antioxidant and anti-inflammatory properties of these natural products were carried out. The extracts and the most active mixtures (*Zp/Ln*, *Zp/Ld*, *Zp/Lc*) were able to scavenge free radicals and reactive oxygen species, to inhibit the oxidative hemolysis of human erythrocytes and the activity of enzymes involved in the inflammatory process (phospholipase, lipoxygenase and cyclooxygenase).

To guarantee the safe therapeutic use of the extracts and mixtures, the genotoxic effect was evaluated using the Ames test, which indicated that they do not have a mutagenic activity on any of the two strains used (TA98 and TA100).

Pharmaceutical preparations (ovules, tablets and microcapsules) were prepared using the individual plant species and the most active combinations. The pharmaceutical preparations maintained the biological activities when compared to the values obtained for the extracts used for their formulation. Additionally, the formulations showed no biological contamination with fungi or bacteria.

These results indicate that the phytoextracts (individual or combined) and their pharmaceutical formulations would be a good alternative for the treatment of fungal infections and the associated oxidative processes.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Microbiota vaginal

El término microbiota hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos reunidos en un nicho ecológico determinado, siendo la microbiota normal el conjunto de microorganismos que conviven con el huésped sin causarle enfermedad (Herrero de Lucas y col., 2018). La microbiota vaginal ha sido estudiada desde 1892 por Döderlein cuando describió el patrón normal que se observa en la mujer en edad reproductiva, la cual está constituida por microorganismos aerobios, anaerobios y bacilos de Döderlein. Estos en conjunto le confieren un pH a la vagina que oscila entre 4 y 5 (Vizcaíno y col., 2016).

La ecología vaginal de una mujer no es constante, sufre variaciones en respuesta a factores endógenos y exógenos. Los factores endógenos abarcan la edad de la mujer, las variaciones hormonales, el embarazo, entre otros; los factores exógenos incluyen las relaciones sexuales, el uso de antibióticos, espermicidas o duchas vaginales. Algunas comunidades vaginales pueden cambiar marcadamente en períodos de tiempo cortos, mientras que otras son relativamente estables (Gajer y col., 2012). La microbiota vaginal juega un papel muy importante en la protección frente a infecciones vaginales (Winn, 2008). Durante la gestación, a medida que el embarazo progresa, aumenta la densidad de lactobacilos y disminuyen los bacilos Gram negativos anaerobios y facultativos. También puede aumentar la cantidad de levaduras y, eventualmente, pueden causar síntomas (Forbes y col., 2004; Winn, 2008). En la etapa prepuberal predominan microorganismos de origen cutáneo y perineal como *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium* spp., pueden aislarse levaduras en escaso número, al igual que enterobacterias y algunos bacilos Gram negativos anaerobios. En la mujer postmenopáusica, al cesar el estímulo hormonal, la microbiota retorna al patrón de la infancia (Forbes y col., 2004).

Los grupos de microorganismos predominantes en el área de la vagina pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* (Vizcaíno y col., 2016).

Los lactobacilos son bacterias Gram positivas, en su mayoría anaeróbicas facultativas, y pertenecen al grupo de las bacterias ácido-lácticas que, como su propio nombre indica, producen ácido láctico a partir de la fermentación de hidratos de carbono presentes en el medio (Martínez-Peña y col., 2012). La presencia de lactobacilos es la barrera más importante para evitar las infecciones por *Candida* (Ferrer, 2000). Estos microorganismos están involucrados en tres mecanismos de defensa. En primer lugar,

compiten con *Candida* por los nutrientes, sin embargo este no es el mecanismo más eficaz. En segundo lugar, y más importante aún, provocan un proceso de auto-agregación al moco vaginal, formando un biofilm que funciona como barrera a la colonización patogénica que bloquea los receptores epiteliales para los blastoporos, por lo tanto, la adhesión no puede tener lugar. En tercer lugar, los lactobacilos producen metabolitos antimicrobianos, como el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas (proteínas con actividad antimicrobiana), que actúan sinérgicamente dificultando la germinación de micelios e inhibiendo la proliferación de agentes patógenos (Ferrer, 2000, Petrova y col., 2013; Vizcaíno y col., 2016). Estos mecanismos pueden explicar las causas por las cuales la candidiasis clínica puede ser disparada en algunos pacientes cuando se administran agentes antibióticos que causan una disminución de lactobacilos (Ferrer, 2000). Debido a esto ante una infección vaginal debe no solo tratarse el microorganismo causal con un tratamiento específico, sino que también hay que procurar que se recupere el equilibrio del ecosistema vaginal mediante la administración de lactobacilos (Forbes y col., 2004; Winn, 2008).

Infecciones vaginales

Las infecciones vaginales surgen cuando existe un desequilibrio en la microbiota vaginal y los efectos de los microorganismos patógenos se superponen a los de los lactobacilos comensales protectores. Se pueden destacar tres causas primarias de infección a nivel vaginal: la infección por *Trichomonas vaginalis*, por levaduras como *Candida albicans* y la polibacteriana (bacteriosis vaginal) (Van Der Pol, 2010). La bacteriosis vaginal no es atribuible a la presencia de un solo microorganismo, sino a un conjunto de ellos, especialmente *Gardnerella vaginalis* y otros bacilos Gram negativos anaerobios (Reid y Bruce, 2003). Además de *C. albicans*, existe un aumento progresivo de infecciones graves causadas por diversas levaduras como *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *Malassezia* spp., *Saccharomyces cerevisiae* y principalmente diversas especies del género *Candida* no-*albicans* (Cuenca-Estrella y col., 2000; Pfaller y col., 2002; Sobel, 2007).

Las infecciones vulvovaginales son un motivo muy frecuente de consulta en atención primaria, especializada y urgencias hospitalarias, llegando a representar el 20% de las consultas ginecológicas.

Vulvovaginitis por *Candida*

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una afección común caracterizada por inflamación vulvovaginal en combinación con la detección de una o más especies de *Candida*. La vulvovaginitis por *Candida* es la más prevalente en Europa y la segunda en EE. UU., solo superada por la vaginosis bacteriana (Cancelo Hidalgo y col., 2013).

La candidiasis vulvovaginal es probablemente la infección clínica por *Candida* más frecuente. Se puede aislar *Candida* de muestras vaginales en aproximadamente una cuarta parte de las mujeres sin síntomas. Alrededor del 75% de las mujeres tendrán CVV durante su vida, y aproximadamente la mitad de ellas sufrirá un segundo evento de CVV (Abruzzo y col., 2013; Nagashima y col., 2016; Hay, 2018). Alrededor del 5-8% de las mujeres adultas desarrollan candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR), definida como cuatro o más episodios en un año (Palmeira-de-Oliveira y col, 2012). Con una tasa de prevalencia del 6%, se estima que 593.695 mujeres en Argentina padecen CVVR (Riera y col., 2018). *Candida* puede aislarse de 30 a 40% de las mujeres durante el embarazo, y la infección es particularmente virulenta en el último trimestre (Ferrer, 2000).

El género *Candida* comprende más de 200 especies, pero solo una docena de ellos se han asociado con la infección humana, siendo *Candida albicans* la más frecuentemente informada (Oliva, 2013). *C. albicans* representa la mayoría de los casos de CVV (63-90%), pero otras especies de *Candida* (*C. glabrata* (28%), *C. parapsilosis* (2,4%), *C. tropicalis* (1,7%), *C. krusei* (1,5%), etc.) también son frecuentemente detectadas (Tardif y Schlaberg, 2017).

Características generales de las levaduras del género *Candida*

El género *Candida* pertenece a la familia *Cryptococcaceae*, dentro de los Deuteromicetos. Son células ovaladas o redondas; de 2 a 5 μm , con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 μm de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación (Pardi Célis y col., 2008).

La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de

blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical (Pardi Célis y col., 2008). A excepción de *Candida glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidiasis pueden formar pseudomicelios (Enache-Angoulvant, 2007).

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable (Ghannoum, 1986). La pared celular de este microorganismo está formada por múltiples capas, compuestas por quitina, glicanos, mananos, glicomananos y péptidos.

La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son Gram positivas, en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica (Pardi Célis y col., 2008).

Diversas especies de *Candida* habitan en la piel, las mucosas, el tracto respiratorio alto, el tracto genitourinario y el tracto digestivo, colonizándolo desde los primeros días del nacimiento, pero en determinadas condiciones pueden transformarse en patógenos oportunistas (Dadar y col., 2018).

Sintomatología de vaginitis causada por *Candida*

La candidiasis comúnmente causa un flujo espeso, blanco, que puede o no tener olor desagradable. Puede causar mucha picazón e irritación dentro y fuera de la vagina. Los labios vaginales pueden enrojecer e inflamarse y arder o picar (Blostein y col., 2017; Hay, 2018). Este tejido irritado e inflamado es frágil, el rascarse o la actividad sexual pueden causar pequeñas cortaduras. En casos muy graves, se pueden formar úlceras u otros tipos de infecciones bacterianas en los tejidos lesionados. No todas las candidiasis se presentan de la misma manera, puede haber casos asintomáticos en 10 a 20% de mujeres en edad fértil, casos agudos y severos (Logemann, 2000).

Factores predisponentes para la candidiasis

La transformación de *Candida* spp. de comensal en patógeno para el ser humano depende de varios factores, entre los que se encuentran el empleo de hormonas orales, el estrés, higiene personal, tipo de ropa utilizada, uso de duchas vaginales y antibióticos, los cuales trastornan la microbiota vaginal al disminuir la concentración de lactobacilos y otros miembros de la microbiota normal, por lo que permite la proliferación de microorganismos patógenos (Blostein y col., 2017). El embarazo y la diabetes se acompañan de una disminución cualitativa de la inmunidad mediada por células, lo que ocasiona una incidencia más elevada de vaginitis (Hay, 2018; Smyth y col., 2018).

Las múltiples parejas sexuales aumentan el riesgo de contagio y más si se tiene antecedentes de infecciones urinarias (Ferrer, 2000; Blostein y col., 2017). La inmunosupresión, cirugías y procedimientos invasivos también son factores predisponentes para presentar infecciones por levaduras (Gong y col., 2016; Hay, 2018; Wu y col., 2018).

Factores de Virulencia en *Candida*

Los factores que hacen que *Candida* no sea patógena son principalmente la microbiota bacteriana, que produce sustancias que limitan el crecimiento de otros microorganismos y pueden evitar el acceso de *Candida* a los receptores epiteliales (Martin y col., 2008), y los relacionados con la inmunidad tanto humoral como celular (Ferrer, 2000). La modificación de estos factores puede hacer que las levaduras se vuelvan patógenos oportunistas, produciendo una invasión del tejido subyacente o incluso una patología sistémica (Calderone y Fonzi, 2001).

La patogenia depende principalmente de la condición del paciente (inmunosupresión, diabetes, etc.) y de los factores de virulencia del microorganismo. Entre los factores de virulencia desarrollados por *Candida* spp. podemos citar el dimorfismo, la adhesión a mucosas y a tejidos del hospedador, la hidrofobicidad de la superficie celular, la producción de enzimas hidrolíticas, el cambio fenotípico, la formación de biopelículas y la modulación de la respuesta inmunitaria (Dadar y col., 2018).

El dimorfismo es uno de los factores de virulencia más estudiados en *C. albicans* y se inicia mediante la formación del tubo germinativo a partir de levaduras (van Burik y Magee, 2001). La transición levadura-micelio implica una respuesta celular a ciertos estímulos ambientales que desencadenan un cambio de patrón de crecimiento y de las características de la pared celular (Whiteway y Bachewich, 2007). Estos cambios le confieren particularidades propias a la forma micelial que afectan la adhesión, la hidrofobicidad y la expresión de antígenos, y podrían estar implicados en una mayor virulencia (Soll, 1990; Gozalbo y col., 2004; Ruiz-Herrera y col., 2006).

Para que se produzca la invasión lo primero que debe ocurrir es la adhesión del hongo a la superficie del epitelio. Este proceso se realiza a través de las adhesinas, glucoproteínas de membrana que se unen a receptores específicos de la célula epitelial (Ferrer, 2000). La adherencia al epitelio se ve incrementada por el aumento de los estrógenos en la mujer, efecto que hace que la candidiasis vaginal sintomática sea hormono-dependiente y se produzca en determinados momentos del ciclo menstrual

(Tibaldi y col., 2009). *Candida* spp. dispone de mecanismos específicos de adherencia que le permiten el anclaje a receptores orgánicos e inorgánicos presentes en el sustrato. Se han descrito múltiples adhesinas implicadas en la adherencia de *C. albicans* como pueden ser las proteínas con secuencia tipo aglutinina Als1 y Als3, las cuales poseen dominios hidrófobos ricos en aminoácidos serina-treonina y forman agregados que favorecen la aglutinación de las células fúngicas (Otoo y col., 2008; Liu y Filler 2011). También se han descrito otras adhesinas como la proteína asociada a la pared de la hifa Hwp1, la proteína de adherencia aumentada a poliestireno Eap1 y la proteína relacionada con la hidrofobicidad celular superficial Csh1 (Modrzewska y Kurnatowski, 2015).

Existen pocos estudios relacionados con la identificación de adhesinas en otras especies del género *Candida*. Se han mencionado algunas proteínas con secuencias similares a las Als de *C. albicans*, como pueden ser la lectina dependiente de calcio Epa1p en *C. glabrata* y la proteína con anclaje a glicosilfosfatidilinositol Pga30 en *C. parapsilosis* (Silva y col., 2012).

Una vez adherido el hongo, se inicia el proceso de proliferación, desarrollando hifas para invadir el epitelio celular (Figura 1) (Nobile y Johnson, 2015). Las hifas secretan una matriz extracelular de polisacáridos (Niimi y col., 2010), proteasas y lipasas (Calderone y Fonzi, 2001). Esta matriz es responsable de la formación de biofilms (Mohandas y Ballal, 2011). Las biopelículas microbianas se definen como comunidades microbianas complejas, estructuradas y espacialmente orientadas que están encerradas en una matriz extracelular y unidas a una superficie (Aggarwal y Kashyap, 2018). Se sabe que las especies de *Candida* construyen biofilms altamente estructurados y dinámicos que comprenden diversas formas morfológicas del hongo (levaduras, pseudohifas e hifas) (Bandara y col., 2017). La formación de estos biofilms dota a la célula de resistencia a antifúngicos, siendo mucho más resistentes que las células planctónicas (Aggarwal y Kashyap, 2018; Bandara y col., 2017). En este sentido la resistencia no solo se debe a que la exposición a bajas concentraciones de fármaco aumenta la selección de cepas resistentes (Rautemaa y Ramage, 2011), sino a la dificultad de difusión del fármaco a través de la matriz extracelular (Niimi y col., 2010). Por otro lado, las levaduras que forman biofilm producen enzimas (proteasas, que hidrolizan las uniones peptídicas, y fosfolipasas, que hidrolizan los fosfoglicéridos) que son las responsables de la invasión epitelial (de Vasconcellos y col., 2014). Cuando la acción de estas enzimas afecta a la función y viabilidad del hospedador, las enzimas se

consideran factores de virulencia, ya que contribuyen al establecimiento de la infección (Chaffin y col., 1998; Calderone, 2002). Alrededor de 20 a 24 horas después de la adhesión de las primeras células se obtiene una biopelícula madura, que continuará sintetizando nueva matriz extracelular y dispersando células planctónicas que intentarán colonizar nuevas superficies (Figura 1) (Ramage y col., 2001; Nobile y Johnson, 2015). Estos factores hacen necesaria la eliminación de los biofilms. Desafortunadamente, para su eliminación se recurren frecuentemente a métodos quirúrgicos y/o mecánicos (Stewart y Costerton, 2001).

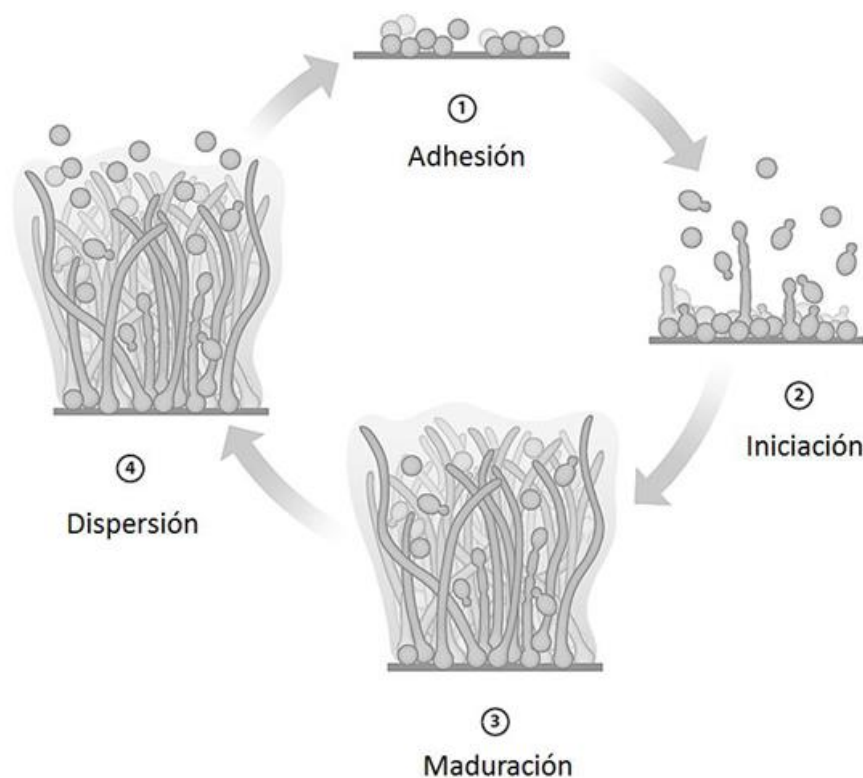


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo de la biopelícula de *C. albicans*. Imagen obtenida de Nobile y Johnson, 2015.

Otro factor para tener en cuenta incluye los cambios fenotípicos que puede sufrir el hongo debido a diversos elementos ambientales, lo que también contribuirá al aumento de la virulencia, cambiando las interacciones entre las células epiteliales y el hongo (Jayatilake, 2011). Estos cambios fenotípicos no se refieren a la transición entre levadura e hifa, sino al cambio de la morfología de las colonias (França y col., 2011).

Candida puede ser fagocitado por leucocitos polimorfonucleares, así como por células epiteliales; estas últimas parecen jugar un papel importante en las infecciones

recurrentes actuando como un reservorio, disminuyendo la exposición a antifúngicos y al sistema inmune (Jayatilake, 2011).

Si el sistema inmune no logra controlar la infección y/o el hongo es altamente virulento, *Candida* puede diseminarse sistémicamente a través del torrente sanguíneo. Así, nos podemos encontrar con candidiasis superficiales (infectando piel y mucosas) y con candidiasis invasivas (infectan órganos internos) que se asocian con una alta incidencia de mortalidad, pudiendo llegar al 45% (Leroy y col., 2009; Pfaller y Diekema, 2010; de Castro y col., 2013; Pierce y Lopez-Ribot, 2013; Spampinato y Leonardi, 2013).

La provocación de una respuesta inflamatoria en los tejidos del huésped es el próximo paso tras la invasión de las células de la superficie epitelial. La invasión del epitelio provoca la liberación de varias otras sustancias, tales como las prostaglandinas y la bradicinina, que inducen cambios inflamatorios en los tejidos. Este proceso puede llevar a un edema, eritema, aumento de exudado y desprendimiento de células. Estos cambios pueden ser detectados en ocasiones con un examen colposcópico (Ferrer, 2000).

El proceso de colonización se ha relacionado con la adherencia de *Candida* spp. a las células epiteliales, mientras que los factores de virulencia como la formación del tubo germinal y la capacidad de producir enzimas proteolíticas, toxinas y fosfolipasas explican la patogenicidad clínica, superando las defensas del huésped. La existencia de un estado de colonización antes de la infección respalda la definición de *Candida* spp. como patógeno oportunista (Sobel, 2007; Palmeira-de-Oliveira y col., 2015). Gil y col. (2017) demostraron que todas las especies del género *Cándida* son capaces de formar biopelículas en diferentes grados en un momento determinado, y que no hay relación entre la capacidad de formación de biopelículas y el grado de formación con la especie involucrada. Algunos de los mecanismos principales que participan en la patogenicidad, por ejemplo, la capacidad de formar biofilms, se consideran relevantes para explicar los fracasos del tratamiento (Palmeira-de-Oliveira y col., 2015; Turán y Demirbilek, 2018).

Diagnóstico de vaginitis causada por *Candida*

El 40% de las mujeres sin alguna sintomatología aparente poseen *Candida* como comensal, por lo que la presencia de este microorganismo en los cultivos no demuestra en sí el diagnóstico de la enfermedad, ni los síntomas de eritema, flujo blanco, ni prurito vulvovaginal dado que también lo encontramos en el estado fisiológico de secreción auto limitada que lleva al paciente a auto medicarse, pensando que se trata de la recurrencia de la enfermedad, lo que provoca un sub-registro de la real incidencia de la

misma (Brooks y col., 2011). Se considera que solo de un 20-30% de las mujeres que se automedican por *Candida*, realmente la tienen (Ciudad- Reynaud, 2007). Muchas mujeres pueden darse cuenta por sus síntomas que tienen una infección. Sin embargo, un diagnóstico correcto es esencial.

La identificación de las levaduras puede variar desde unos pocos tests simples, para identificación presuntiva de algunas especies del género *Candida* a una gran variedad de pruebas necesarias para identificar definitivamente a estas y otras levaduras comúnmente aisladas en los laboratorios de micología. El primer paso en el estudio de una cepa es la obtención de un cultivo puro a partir del cual se puedan iniciar los estudios sistemáticos de sus características morfológicas, fisiológicas y sexuales bajo condiciones estandarizadas. Si no se ha comprobado la pureza de una cepa y las pruebas no se han realizado en condiciones debidamente estandarizadas, es imposible identificarla o describirla con certeza.

El diagnóstico de candidiasis se puede hacer mediante inspección visual, determinación del pH vaginal, microscopía, Papanicolaou y cultivo de secreción cervicovaginal. En el examen físico, el profesional de salud determinará la presencia de signos, características del flujo, lesiones vulvovaginales agregadas (úlceras, etc.). En la gran mayoría de los casos, se recurre a la observación de leucorrea y de la mucosa vaginal mediante la especuloscopia, sin recurrir a exámenes complementarios. Es muy útil determinar el pH vaginal, donde sabemos que el valor normal es de 4-4,9 y que cuando el pH alcanza un valor menor que 4,5 se debe pensar la posibilidad de una infección por hongos; con un pH mayor que 4,5 sugiere una infección bacteriana, tricomoniasis o endocervicitis mucopurulenta (Ciudad- Reynaud, 2007).

Dentro de los exámenes complementarios, se puede realizar microscopía con KOH o NaOH que permiten reconocer blastoconidias, filamentos y pseudohifas de *Candida* spp. Para mejorar la observación y buscar la fase parasitaria de la levadura se puede realizar tinción de los preparados (azul de algodón-lactofenol, blanco de calcoflúor, tinción de Gram). Si solo se encuentra la levadura se debe a su presencia normal como comensal; inicialmente con visión microscópica de x100 aumentos se pueden observar hifas, pero para detectar células clave se debe de utilizar el aumento x400 y se evidenciarán hongos en gemación (Ciudad- Reynaud, 2007).

Candida se desarrolla con gran facilidad en medios de cultivo (Negroni, 1999). El cultivo es un método diagnóstico realizado en agar glucosado Sabouraud, utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos saprofitos, en este caso *Candida*

sp., compuesto por peptona, tripteína, glucosa, cloranfenicol y agar; en lo que respecta a los primeros tres compuestos aportan los nutrientes para el desarrollo del microorganismo, el cloranfenicol y el pH ácido de 5,2 inhiben el crecimiento bacteriano y proporcionan así el crecimiento adecuado de la especie en estudio. *Candida* se desarrolla en el medio de agar Sabouraud como colonias cremosas lisas o rugosas en un tiempo promedio de 24 a 48 horas, a temperaturas de 24 a 37°C, con un olor característico a levadura de pan o cerveza (Liébana-Ureña, 2002).

Dentro de las pruebas posibles de realizar en los laboratorios microbiológicos de los centros de salud a fin de arribar a la identificación presuntiva de las especies más frecuentemente asociadas a infecciones humanas se encuentran la prueba de formación de tubo germinativo por *Candida albicans*, que tiene la capacidad para producir tubos germinales (filamentación) cuando las colonias son inoculadas en suero. En contraste con otras especies de *Candida*, *C. albicans* tiene una marcada tendencia a formar esporas grandes de pared gruesa, denominadas clamidosporas, sobre todo cuando se cultivan en un medio especial como agar harina de maíz; la clamidospora tiene un diámetro de 7 a 8 µm y casi siempre se origina en el extremo del pseudomicelio. Asimismo, se pueden realizar la prueba de producción de ureasa en medio de Christensen y la de fenoloxidasa en medio de girasol, crecimiento a 28°C y 37°C, crecimiento en extracto de malta para estudio micromorfológico, cultivo en lámina en agar harina de maíz o agar morfología (Difco) para estudio micromorfológico o macromorfología (Pardi Célis y col., 2008; Alfonso y col., 2010).

Para la identificación definitiva a nivel de especie en los laboratorios de los centros de salud pueden realizarse pruebas de fermentación y asimilación de hidratos de carbono y fuentes nitrogenadas para la identificación del microorganismo correspondiente (Liébana-Ureña, 2002; Cirak y col., 2003).

Por otra parte, existen reactivos comerciales que permiten arribar a la identificación presuntiva como el CHROMagar Candida, CHROMagar ID, o bien los reactivos comerciales que permiten la identificación confirmatoria como el ID 32C, API 20C, Vitek, entre otros. Los resultados de estos métodos deben ser tomados con criterio y tenerse en cuenta además de las características macro y micromorfológicas para una correcta identificación.

La incorporación de medios con sustratos cromogénicos ha sido un gran adelanto en la identificación presuntiva de levaduras, a la vez que ha permitido reconocer la presencia simultánea de 2 o más especies en una misma muestra clínica. La orientación acerca del

microorganismo involucrado permite seleccionar el antifúngico más adecuado hasta que se realice la identificación definitiva (Eraso y col., 2006; Alfonso y col., 2010). En nuestro país se comercializan desde hace tiempo CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company Ltd., Francia) y *Candida* ID2s (bioMérieux, Francia), y últimamente se ha incorporado Brilliances *Candida* Agar (Oxoid, Reino Unido). El fundamento de estos medios es la inclusión de sustratos cromogénicos que, ante la presencia de actividad enzimática específica de las levaduras, producen un color determinado. Las enzimas que se revelan son hexosaminidasa y fosfatasa alcalina; la primera está presente en *Candida tropicalis*, *C. albicans* y *Candida dubliniensis*, en tanto que *Candida krusei* posee fosfatasa alcalina; otras especies también pueden presentar discreta actividad de esta última enzima y la variación en la tonalidad depende del sustrato cromógeno y la pigmentación natural de la levadura. En medio CHROMagar *Candida*, *C. albicans*/*C. dubliniensis* toman un color y aspecto verde cremoso, *C. tropicalis* azul cremoso, *C. krusei* rosa seca y borde rugoso, *Saccharomyces* spp. violeta cremoso (Liébana-Ureña, 2002; Hospenthal y col., 2006; Alfonso y col., 2010).

La prueba API ID 32C auxanograma de BioMérieux es un kit comercial disponible para la identificación de diferentes especies de levaduras. Por este método se determinan las capacidades de estas de utilizar diversas fuentes de carbono o nitrógeno para su crecimiento (Polacheck y col., 2000); sin embargo, para su confirmación ha sido necesario usar técnicas moleculares de tipificación genética (Giammanco y col., 2000; Silva y col., 2003).

Por las grandes limitaciones de los métodos de fenotipificación, se han hecho uso de metodologías de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que ha servido para la identificación molecular de las especies de *Candida*, facilitando el desarrollo de sistemas de identificación a nivel de especie (Cirak y col., 2003). Los avances en Biología Molecular han permitido la descripción e identificación de nuevas especies de levaduras, algunas de las cuales solo pueden ser correctamente identificadas mediante el uso de estas técnicas.

La rápida y correcta identificación a nivel de especie de los aislamientos de *Candida*, son fundamentales para garantizar la adecuada prescripción específica, tanto en dosificación como duración, que permita una pronta y eficaz terapia antifúngica (Guiver y col., 2001; Alcoba-Florez y col., 2005; Alfonso y col., 2010).

Tratamiento

Los tratamientos convencionales para las enfermedades fúngicas son limitados debido al hecho de que los hongos son organismos eucariotas, por lo que es difícil el desarrollo de un fármaco que sea selectivamente tóxico para la célula fúngica y no para el huésped. Los antifúngicos o antimicóticos son moléculas que ayudan a luchar contra los hongos actuando a distintos niveles en la célula fúngica, provocando alteraciones en su estructura e inhibiendo su desarrollo o viabilidad mediante los mecanismos de acción propios de cada fármaco, de estos mecanismos va a depender su efectividad y hasta en cierto grado los efectos que puede provocar en el huésped (Gregorí Valdés, 2005).

Actualmente, el tratamiento de las infecciones fúngicas se basa en el uso de tres familias de antifúngicos: polienos (anfotericina B, nistatina), azoles (fluconazol, ketoconazol, voriconazol, itraconazol, posaconazol) y equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina). Durante los últimos 50 años, el descubrimiento de los diferentes antifúngicos ha sido progresivo, iniciándose con la anfotericina B hasta llegar a las equinocandinas.

El tratamiento de la candidiasis vulvovaginal puede ser oral o tópico. La duración del tratamiento dependerá no solo del principio activo seleccionado, sino también de la forma galénica que tiene el producto farmacéutico seleccionado (Ciudad- Reynaud, 2007). De acuerdo con Rice y col. (2016) las opciones terapéuticas más frecuentes que se aplican para casos de candidiasis vaginal son:

A. Productos de venta libre:

- a) Cremas intravaginales: clotrimazol 1% 5 g diariamente por 7-14 días, clotrimazol 2% 5 g diariamente por 3 días, miconazol 2% 5 g diariamente por 7 días, miconazol 4% 5 g diariamente por 3 días.
- b) Supositorios vaginales: miconazol 100 mg diariamente por 7 días, miconazol 200 mg por 3 días, miconazol 1200 mg en una sola dosis.
- c) Ungüento intravaginal: tioconazol 6,5%, 5 g, aplicación vaginal única.

B. Agentes que requieren prescripción médica:

- a) Cremas intravaginales: butoconazol 2% 5 g en una sola aplicación, terconazol 0,4% 5 g diariamente por 7 días, terconazol 0,8% 5 g diariamente por 3 días.
- b) Supositorios vaginales: terconazol 80 mg, diariamente por 3 días.
- c) Agente oral: fluconazol 150 mg, una sola dosis oral.

Además, Sobel 2016 considera utilizar para *C. glabrata*, ácido bórico (600 mg diariamente por 14 días) y nistatina (supositorios de 100,000 U por 14 días), para *C.*

krusei no utilizar fluconazol, y para especies de *Candida* resistentes a azoles utilizar ácido bórico, nistatina, anfotericina B y flucitosina (por 14 días). Si el tratamiento es fielmente cumplido, la tasa de cura terapéutica puede alcanzar el 80% (Rice y col., 2016).

Los antifúngicos presentan diversas estructuras químicas y mecanismos de acción (Tabla 1). Los azoles actúan interrumpiendo la biosíntesis de ergosterol, un esteroide específico de las membranas celulares del hongo (Heimark y col., 2002; Chen y col., 2010). Estos inhiben al citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14- α -demetilasa, que es esencial para la conversión de lanosterol a ergosterol en las membranas celulares de los hongos. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo (Perlin, 2009; Vandeputte y col., 2012; Morace y col., 2014).

Los medicamentos polienos se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causando la muerte celular (Kanafani y Perfect, 2008; Spampinato y Leonardi, 2013).

Las equinocandinas matan las células fúngicas desestabilizando sus paredes celulares a través de la inhibición de la síntesis de β -1,3-glucanos (Morace y col., 2014). Otros antifúngicos, como la sordarina, bloquea la síntesis de proteínas de hongos mediante la inhibición del factor de elongación-2. Los nicomicinas inhiben competitivamente la quitina sintasa, bloqueando así la formación de la quitina, un componente de la pared celular fúngica. La flucitosina es un análogo de pirimidina que inhibe la base de ADN celular y la síntesis de ARN (Oliva y col., 2013).

Tabla 1. Mecanismos de acción de drogas antifúngicas convencionales

Droga	Mecanismo de acción
Azoles	Interrumpen la biosíntesis de ergosterol
Polienos	Inserción en la membrana fúngica
Equinocandinas	Inhiben la síntesis de β -1,3-glucanos
Sordarina	Bloquea la síntesis de proteínas
Nicomicinas	Inhiben la formación de quitina
Flucitosina	Inhibe la síntesis de ARN

Es muy frecuente que se recomiende el uso de fluconazol en infecciones por hongos (Oliva y col., 2013). Es importante señalar, sin embargo, que prácticamente todos los aislados de *Candida* tienen el potencial para desarrollar resistencia a los agentes antifúngicos *in vitro*, especialmente a los agentes azólicos. En la última década, se han notificado casos de mujeres con candidiasis vulvovaginal que no responden a la terapia con fluconazol (Gómez Quintero, 2010; Sobel, 2016; Smyth y col., 2018).

El uso clínico de los diferentes antifúngicos se ve afectado por diversas razones, como son: (i) la resistencia intrínseca que presentan algunos hongos a uno o varios antifúngicos, (ii) el desarrollo de resistencia secundaria a los mismos, (iii) la toxicidad asociada y/o (iv) el elevado costo de algunos de ellos. Por estos motivos la búsqueda de compuestos antifúngicos alternativos ha sido una gran preocupación en los últimos años (Oliva y col., 2013).

Resistencia

El número de casos de micosis con falla terapéutica se ha incrementado en el mundo, lo cual es atribuible a una deficiencia en la función inmunológica, baja biodisponibilidad de los antimicóticos, alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos, interacciones medicamentosas y resistencia antifúngica primaria o secundaria (Tamayo y Cordella, 2007).

La *resistencia microbiológica* a antifúngicos convencionales se produce cuando el crecimiento de un patógeno se inhibe por un agente antimicrobiano a una concentración mayor que el intervalo requerido para las cepas de tipo salvaje. La *resistencia clínica* se define como el fracaso en la erradicación de una infección fúngica a pesar de la administración de un agente antifúngico con actividad *in vitro* contra el organismo. Tales fallas pueden atribuirse a una combinación de factores que pueden estar relacionados con el huésped, el agente antifúngico o el patógeno (Oliva y col., 2013).

La resistencia microbiológica puede ser primaria (intrínseca) o secundaria (adquirida). La resistencia primaria se encuentra naturalmente en ciertos hongos sin exposición previa a la droga; esto manifiesta la importancia de la identificación de las especies de hongos a partir de muestras clínicas. La resistencia secundaria se desarrolla entre las cepas previamente susceptibles tras la exposición al fármaco (Silva y col., 2002). Los mecanismos de resistencia antifúngica, ya sea primaria o secundaria, se relacionan con las características intrínsecas o adquiridas del hongo patógeno (Mellado y col., 2002; Oliva y col., 2013).

Se informaron altos niveles de resistencia a los medicamentos antifúngicos en *Candida* sp.; éstos muestran patrones de resistencia primaria a anfotericina B, clotrimazol, fluconazol, itraconazol y nistatina. El hecho de que el fluconazol sea fungistático y no fungicida se relaciona directamente con la capacidad de desarrollar resistencia secundaria, porque siempre quedan poblaciones que no mueren con el fármaco y comienzan a generar mecanismos para defenderse del mismo (Tobar y col., 2011). Existen muchos informes que indican resistencia de *C. albicans* a los azoles, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad vinculados con el uso de polienos, en particular anfotericina B (Oliva y col., 2013). Se sabe que *C. glabrata* presenta una susceptibilidad intrínsecamente baja a los azoles y desarrolla resistencia luego de la exposición a estos fármacos, y que *C. krusei* es naturalmente resistente al fluconazol, lo que complica el tratamiento de la candidiasis causada por estas especies (Rossoni y col., 2017). Otro aspecto importante de la resistencia de la levadura es que la formación de biopelículas puede correlacionarse con el desarrollo de resistencia. Se observó que las células adherentes de *Candida* son más resistentes a los antimicóticos que las células en su forma planctónica, y que la resistencia aumenta aún más con la formación de biopelículas (Oliva y col., 2013; Del Pozo y Cantón, 2016).

El aumento creciente de infecciones fúngicas y la aparición de resistencia a los antimicóticos han hecho necesario el desarrollo de métodos estandarizados para la determinación de la susceptibilidad antifúngica. Tales métodos deben ser reproducibles y adaptables a un laboratorio asistencial, de manera que permitan la detección de resistencia *in vitro*, la cual, en la mayoría de los casos, suele correlacionarse con una evolución clínica desfavorable. Tanto el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) en EE. UU., como el European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) en Europa han desarrollado guías para la medición estandarizada de la sensibilidad de varias especies de hongos a los antimicóticos actuales (Cuenca-Estrella y Rodríguez-Tudela, 2010; Pfaller, 2012).

Como se describió anteriormente, en los últimos años el número de infecciones fúngicas en todo el mundo por especies de *Candida* ha aumentado considerablemente y la resistencia a las terapias antifúngicas tradicionales también está aumentando. Las opciones terapéuticas actuales parecen ser altamente tóxicas y hay una gran cantidad de interacciones entre medicamentos, lo cual ha alentado la búsqueda de nuevas alternativas entre productos naturales (Martínez y col., 2011; Khan y col., 2017; Zida y col., 2017). Los compuestos naturales, obtenidos principalmente de las plantas

superiores, son una fuente potencial de agentes antimicóticos, ya sea en su forma natural o como modelos de estructuras para derivados más eficaces (Anibal, 2010; Oliva y col., 2013).

Actividad antifúngica de productos naturales obtenidos de plantas

En los últimos años, la investigación de plantas medicinales ha atraído mucha atención en todo el mundo debido a diversos factores, entre los que podemos mencionar el interés por un tratamiento más natural y la disminución de costos. La evidencia acumulada ha demostrado el potencial de las plantas medicinales utilizadas en diversos sistemas tradicionales, complementarios, y alternativos para el tratamiento de enfermedades humanas (Sher, 2009; Sardi y col., 2013; Rivas-Morales y col., 2016; Bernstein y col., 2018). Las plantas medicinales se han utilizado desde la antigüedad y constituyen una importante fuente de nuevos medicamentos. Los pueblos nativos de América tienen un gran patrimonio de conocimientos del uso de plantas medicinales que pueden sorprender a la comunidad científica (Ratera y Ratera, 1980).

La Fitoterapia es una parte de la Terapéutica, cuyo desarrollo nos permite disponer de medicamentos a base de plantas, para prevenir, atenuar o curar un estado patológico, generalmente con una actividad suave o moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios, que dan lugar a tratamientos menos agresivos (Martínez y col., 2011). Una planta medicinal se define como una planta que es útil en terapéutica, ya que contiene compuestos activos. De esta manera, las plantas juegan un papel primordial en los sistemas de salud pública de países en desarrollo. Es más, durante las últimas décadas, el interés del público en las terapias naturales ha aumentado enormemente en países industrializados y se encuentra en expansión el uso de plantas medicinales y medicamentos cuyas materias primas son drogas vegetales o sus extractos (Martínez y col., 2011; Oliva y col., 2013; Abdallah, 2015; Bernstein y col., 2018).

De acuerdo con una estimación de la Organización de la Salud (OMS), alrededor del 80% de la población mundial todavía usa hierbas y otras medicinas tradicionales para sus necesidades de atención primaria de salud (Choudhary y Sekhon, 2011; Rodrigues da Silva y col., 2015).

En la estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 (WHA62.13) se señala el rumbo de la medicina tradicional y complementaria (MTC) para el próximo decenio; la estrategia tiene dos objetivos principales: prestar apoyo a los Estados Miembros para que aprovechen la posible contribución de la MTC a la salud, el

bienestar y la atención de salud centrada en las personas, y promover la utilización segura y eficaz de la MTC mediante la reglamentación de productos, prácticas y profesionales.

Según la definición de la OMS, existen tres tipos de medicamentos a base de plantas: material vegetal en bruto, material vegetal procesado y productos herbales medicinales. Los medicamentos a base de hierbas son productos etiquetados y terminados que contienen ingredientes activos, como partes aéreas o subterráneas de plantas u otros materiales vegetales o combinaciones de estos, ya sea en estado bruto o como preparaciones vegetales. Los productos de hierbas medicinales son suplementos dietéticos que las personas consumen para mejorar su salud y se venden como tabletas, cápsulas, polvos, tés, extractos y plantas frescas o secas (Choudhary y Sekhon, 2011). Las hierbas se consideran tradicionalmente inofensivas y son cada vez más consumidas por personas sin receta médica. Sin embargo, algunos pueden causar problemas de salud, algunos no son efectivos y otros pueden interactuar con otras drogas. La estandarización de las formulaciones de hierbas es esencial para evaluar la calidad de los medicamentos, en función de la concentración de sus principios activos. Los métodos convencionales para la estandarización de formulaciones a base de hierbas incluyen la autenticación botánica, examen macroscópico, microscópico y molecular, determinación de la composición química por diversas técnicas cromatográficas y actividad biológica de la planta completa (Choudhary y Sekhon, 2011; Rivas-Morales y col., 2016).

El uso de fitocomponentes con propiedades antimicrobianas, además de incrementar el gradiente de acción en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, también promueve el uso alternativo de ciertas plantas y el desarrollo de las regiones donde ellas crecen, incentivando al lugareño a asentarse y tener un medio de sustento familiar (Martínez y col., 2011).

Más de 200 especies de plantas han sido estudiadas desde el año 2000 en la búsqueda de productos naturales activos frente a *Candida* spp. Cuando se obtiene un producto antifúngico natural, es mejor si se demuestra que tiene propiedades como fungicida, en lugar de fungistático. Esto es particularmente importante para los pacientes inmunocomprometidos, tales como aquellos con VIH, debido a que el uso profiláctico de fármacos de acción fungistática se ha asociado con un aumento de la frecuencia de la resistencia innata y adquirida de drogas en los aislados clínicos (Tobar y col., 2011; Oliva y col., 2013).

Los productos naturales para combatir *C. albicans* se han incrementado en los últimos diez años, lo que indica un gran esfuerzo para el uso de medicamentos alternativos. Zida y col. (2017) evaluaron 142 productos naturales (111 publicaciones de investigación) con actividades anti-*Candida*, de los cuales un 44,37% se reportaron en Asia, 28,17% en América, 20,42% en África, 6,34% en Europa y 0,7% en Oceanía. La identificación de estos compuestos naturales representa una oportunidad para los países de bajos recursos, donde las plantas siguen siendo una fuente vital de tratamiento de enfermedades. Debido a que el tratamiento con medicamentos modernos suele ser costoso y no tan fácilmente accesible, muchas personas de estos países recurren actualmente al uso de remedios tradicionales naturales (Zida y col., 2017). Más del 25% de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años derivan directamente de las plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales, químicamente modificados. Cabe mencionar que tan solo entre el 5% al 15% de las aproximadamente 250,000 plantas de uso medicinal han sido investigadas para compuestos bioactivos. Esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos (Rivas-Morales y col., 2016).

El uso tradicional de cada planta generalmente se guía por su disponibilidad y la facilidad de preparación del extracto. Existe una variedad de métodos de extracción que utilizan solventes y técnicas de extracción diferentes, y el éxito de la extracción depende de la duración del período de extracción, el disolvente utilizado, el pH y la temperatura. Tanto el material vegetal fresco como el secado pueden usarse como tratamientos, aunque la mayoría de los investigadores tienden a usar material seco para estudios de extractos. El agua es un excelente solvente para extraer compuestos del material vegetal seco. Los compuestos tales como taninos y terpenoides son solubles en agua y se sabe que ambos tienen actividad antimicrobiana. Sin embargo, muchos de los principales componentes son poco solubles o insolubles en agua y para extraerlos se deben usar disolventes orgánicos de polaridad creciente, por ejemplo, éter, éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y etanol (Edwards-Jones, 2013). Se ha demostrado que los extractos de plantas consisten en una mezcla compleja de compuestos orgánicos metabolitos primarios (polipéptidos y lectinas) y secundarios (compuestos fenólicos como flavonoides, flavonoles, flavonas, taninos, cumarinas y poliacetilenos; terpenoides; alcaloides, y aceites esenciales), muchos de los cuales son antimicrobianos (Edwards-Jones, 2013).

Metabolitos secundarios presentes en plantas medicinales

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, llamadas metabolitos primarios, indispensables para el crecimiento y desarrollo del individuo; se trata de proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos, presentes en todas las plantas. Estos metabolitos son esenciales para la vida, universales y conservativos (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no son indispensables para el crecimiento y desarrollo del vegetal, pero sí para su supervivencia. Estos compuestos se denominan metabolitos secundarios (también llamados fitoquímicos, productos secundarios o productos naturales) e incluyen compuestos fenólicos, terpenos, alcaloides y glicósidos (Tiwari y col., 2016).

Difieren de los metabolitos primarios ya que no son universales y conservativos (Suárez-Medina y Coy-Barrera, 2016). Estos compuestos pueden servir para disuadir a herbívoros o patógenos potenciales y a especies de plantas competidoras o para atraer polinizadores o simbioses. Algunos pueden tener función de defensa ya que actúan como fitoalexinas, antialimentarios, antioxidantes y protectores contra la radiación UV, la sequía y la salinidad, entre otros (Ignat y col., 2011; Suárez-Medina y Coy-Barrera, 2016). Se producen en partes específicas de plantas en etapas de desarrollo definidas. Las cantidades producidas a menudo son bajas y muy variables (Davey, 2017).

Además de su valor intrínseco para la planta, muchos metabolitos secundarios son comercialmente valiosos y tienen aplicaciones extensas en alimentos, nutraceuticos, medicamentos y preparaciones farmacéuticas. En la actualidad, alrededor del 25% de todos los medicamentos recetados son derivados de plantas (Tiwari y col., 2016; Davey, 2017).

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son el grupo más grande de metabolitos secundarios. El elemento estructural fundamental que los caracteriza es la presencia de al menos un anillo aromático sustituido por uno o más grupos hidroxilos libres u ocupados por otra función: éter, éster o glicósido. Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos

hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

La biosíntesis de los compuestos fenólicos tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la *ruta del ácido shiquímico* y la *ruta de los poliacetatos* (Leyva y col., 2011). La ruta del ácido shiquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), que conducen a la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas, entre otros.

La ruta del ácido shiquímico es dependiente de la luz. Se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa-4-fostato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis. Tras diversas modificaciones, se obtiene el ácido shiquímico, del que derivan directamente algunos fenoles. La vía del ácido shiquímico puede continuar con la adhesión de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, dando lugar a la fenilalanina, un aminoácido esencial propio del metabolismo primario de las plantas. La fenilalanina forma parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando la fenilalanina en el ácido trans-cinámico. Posteriormente, el ácido trans-cinámico se transforma en ácido p-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático. La acción de una Coenzima A (CoA), la CoA-ligasa, transforma el ácido p-cumárico en p-cumaroilCoA, que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles de origen vegetal (Quiñones y col., 2012). Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas. Esta vía es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

Las *rutas mixtas* combinan precursores tanto de la vía del ácido shiquímico como de la ruta de los poliacetatos (Quiñones y col., 2012). Los flavonoides se biosintetizan por biogénesis mixta (Figura 2).

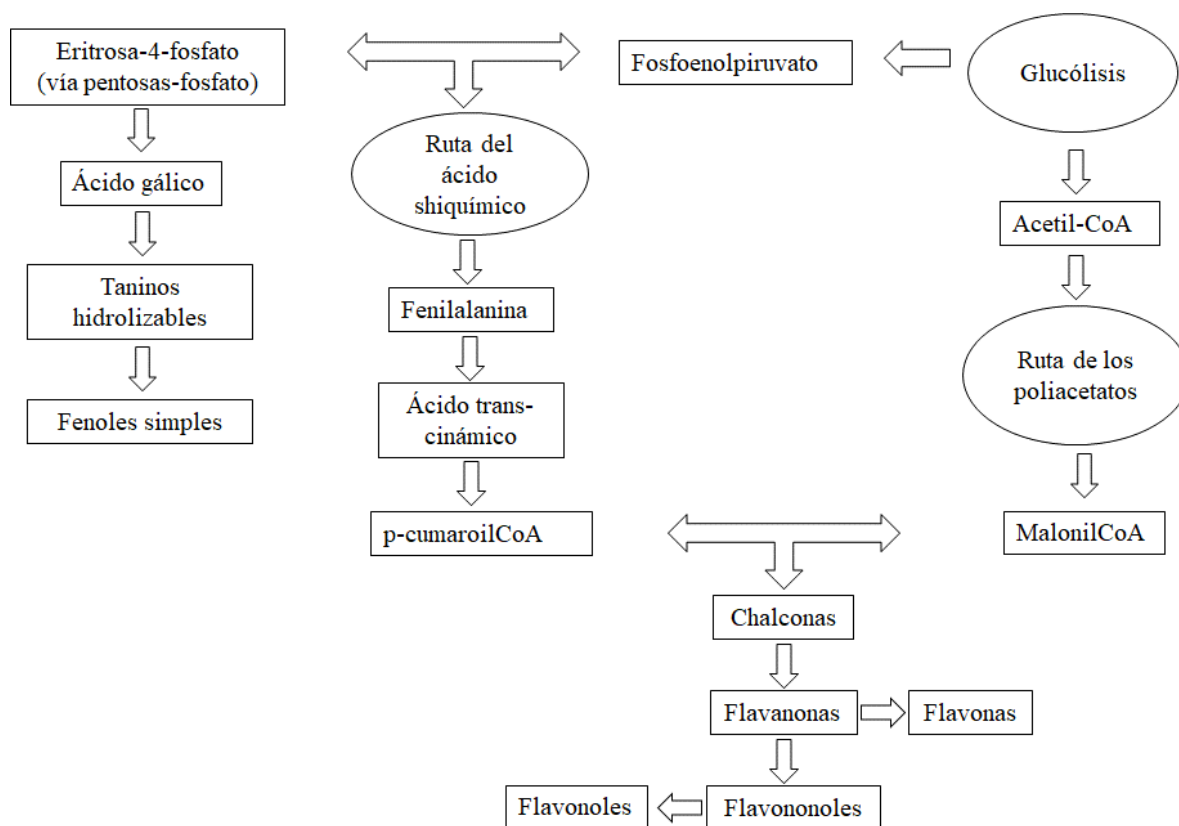


Figura 2. Esquema de las rutas biosintéticas de los polifenoles.

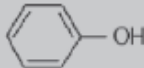
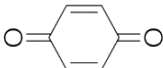
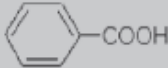
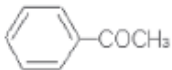
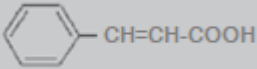
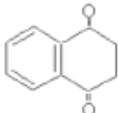
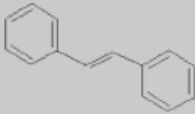
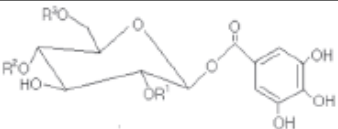
Los compuestos fenólicos se pueden clasificar de acuerdo con su estructura en:

- *Compuestos fenólicos no flavonoides*: fenólicos simples, ácidos benzoicos y relacionados, acetofenonas, ácidos fenol acéticos, ácidos cinámicos y relacionados, cumarinas y relacionados, benzofenonas y estilbencenos, xantonas (Tabla 2).
- *Compuestos fenólicos flavonoides*: donde se incluyen chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas, dihidroflavonoles e isoflavonoides (Tabla 3).

Otra clasificación frecuentemente utilizada es:

- *Compuestos fenólicos simples*: Fenoles, benzoquinonas, ácidos fenólicos (benzoicos, fenilacéticos, cinámicos), acetofenonas, fenilpropenos, cumarinas e isocumarinas, cromonas, naftoquinonas.
- *Compuestos polifenoles*: xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides, lignanos, ligninas, taninos hidrolizables.

Tabla 2. Estructuras químicas de compuestos fenólicos no flavonoides.

Clase	Esqueleto químico	Estructura básica
Fenoles simples	C ₆	
Benzoquinonas	C ₆	
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁	
Acetofenonas	C ₆ -C ₂	
Ácido hidroxicinámico	C ₆ -C ₃	
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄	
Estilbenos	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Taninos hidrolizables	Estructuras variadas	

Fuente: Vázquez-Flores y col. (2012).

Ácidos fenólicos

Entre los ácidos fenólicos se pueden diferenciar dos grupos principales, los ácidos benzoicos y los ácidos cinámicos (Figura 3). Los ácidos benzoicos o derivados del ácido hidroxibenzoico, tienen una estructura básica C₆-C₁. Los principales son el ácido gálico, salicílico, p-hidroxibenzoico, protocatéquico, vainílico y siríngico (Macheix y col., 1990). Los ácidos cinámicos o derivados del ácido hidroxicinámico, están ampliamente distribuidos como conjugados en materias vegetales, tienen una estructura básica C₆-C₃. Los más comunes son el ácido cafeico, ferúlico, sinápico y p-cumárico. Se encuentran raramente libres, ya que por regla general están presentes en forma de derivados.

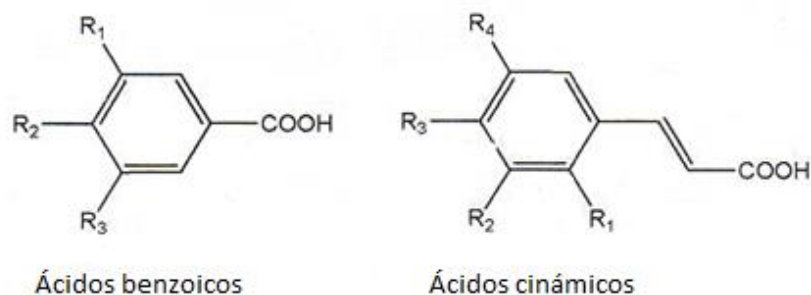


Figura 3. Estructura química de los ácidos benzoicos y cinámicos.

Lignanos

Los lignanos ocupan una gran área en el reino vegetal. Se han identificado en alrededor de 70 familias (Zhang y col., 2014; Yoder y col., 2015). En términos de evolución, los lignanos aparecieron en las plantas terrestres primitivas, pero no están presentes en las algas (Zhang y col., 2014; Satake y col., 2017).

Son compuestos fenólicos derivados del metabolismo fenilpropanoide al igual que las ligninas y comúnmente son dímeros de monolignoles unidos en C6 y C3 al átomo de carbono 8 de la cadena propilo. Los lignanos pueden ser clasificados en cinco tipos de acuerdo a sus estructuras: lignanos, neolignanos, norlignanos, lignanos híbridos y lignanos oligoméricos (Zhang y col., 2014). Basados en el camino por el cual el oxígeno es incorporado en el esqueleto carbonado y el patrón de ciclización, los lignanos son clasificados en 8 subgrupos (Figura 4), furofuranos, furanos, dibencilbutano, dibencilbutirolactona, ariltetralina, arilnaftaleno, dibencilciclooctadieno y dibencilbutirolactol (Satake y col., 2017).

Los lignanos han atraído considerable atención debido a sus numerosas propiedades farmacológicas, tales como antitumoral (cáncer de colon, mama y próstata), hepatoprotectora, insecticida, antifúngica, antihipertensiva, sedativa, antioxidante (Zhang y col., 2014; Yoder y col., 2015).

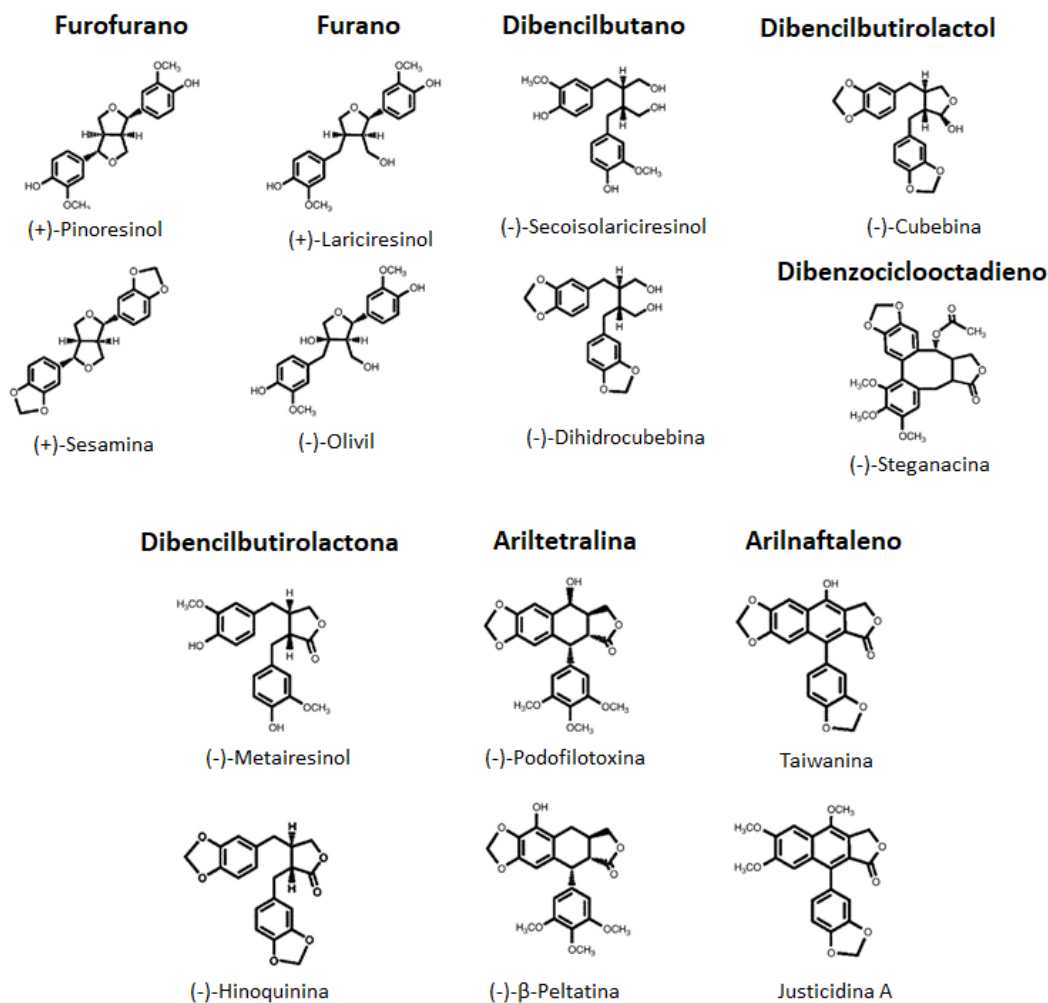
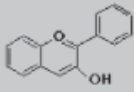
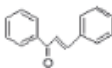
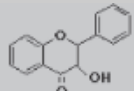
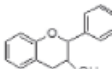
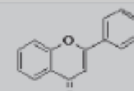
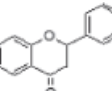
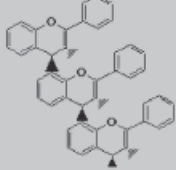
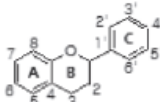


Figura 4. Principales tipos de lignanos (Satake y col., 2017).

Flavonoides

En las plantas, los flavonoides confieren resistencia contra la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de hormonas y algunos funcionan como defensa ante los depredadores o como atrayentes de polinizadores o como antimicrobianos (Estrada-Reyes y col., 2012). Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Tabla 3). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Tabla 3).

Tabla 3. Estructuras químicas de compuestos fenólicos flavonoides.

Clase	Estructura básica
Antocianidina	
Chalconas	
Dihidroflavonoles	
Flavanoles	
Flavonas	
Flavanonas	
Taninos condensados	
Estructura común	

Fuente: Vázquez-Flores y col. (2012).

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. *Flavanos*, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. *Flavonoles*, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. *Flavonas*, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. *Antocianidinas*, que tienen unido el grupo -OH en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Tres características estructurales de los flavonoides son importantes para su función: a)

La presencia en el anillo B de la estructura catecol; b) La presencia de un doble enlace

en posición 2,3; c) La presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 y 5 (Martínez-Flores y col., 2002).

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente.

La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se denomina aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo. Se han identificado más de 5.000 flavonoides diferentes (Cheynier y col., 2015; Bhargav y col., 2018).

Chalconas

Las chalconas son los precursores de todos los flavonoides; presentan los anillos A y B y una cadena carbonada estructuralmente relacionada al propano (Tabla 3).

Las chalconas están involucradas en el color amarillo- anaranjado de las flores y por ende en su polinización (Peñarrieta y col., 2014).

El interés medicinal de las chalconas y su potencial aplicación en el área cosmética y en la industria alimentaria ha incrementado notablemente en los últimos años (Cazarolli y col., 2010; Ramírez y col., 2012; Insuasty-Obando, 2016).

Estos compuestos presentan propiedades como antioxidantes, antiinflamatorios, antiinfecciosos, citoprotectores, hepatoprotectores, antiobesidad, antidiabéticos, anticancerosos, reversión de la resistencia a múltiples fármacos, antihistamínicos, antiarítmicos, antiagregantes plaquetarios, antiesteroidales, antiulcerosos, antiamiloides, anti-angiogénicos, anti-nociceptivos, ansiolíticos, hipnóticos y anti-espasmódicos (Karimi-Sales y col., 2018).

Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular comprendido entre 300 y 3000 Da. Estos compuestos contienen un gran número de grupos hidroxilo, entre otros grupos funcionales, siendo por tanto capaces de unirse a proteínas y a otras macromoléculas (Sieniawska y Baj, 2017).

Los taninos pueden clasificarse en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados o no hidrolizables.

Los *taninos hidrolizables* tienen como núcleo central un alcohol polihidroxilado como la glucosa y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente

con el ácido gálico o con el ácido hexahidroxidifénico, formando los galotaninos y elagitaninos, respectivamente (Chung y col., 1998) (Figura 5). Los galotaninos son los taninos más simples que existen, están formados por unidades galoil o di-galoil esterificadas a un núcleo de glucosa u otro alcohol polivalente. Los elagitaninos son ésteres del ácido hexahidroxidifénico (HHDP); después de la hidrólisis de los elagitaninos, el grupo HHDP se deshidrata y lactoniza espontáneamente, formando ácido elágico (Khanbabae y Van Ree, 2001). La mayoría de los elagitaninos son mezclas de esteres entre el HHDP y el ácido gálico. Además, hay estructuras complejas que contienen elementos estructurales de diversos grupos químicos. Las llamadas procianidinas-elagitaninos contienen catequinas o epicatequinas unidas glicosidicamente a una unidad de elagitanino. Luego de la hidrólisis, los taninos complejos producen catequinas o epicatequinas y ácido gálico o ácido elágico (Serrano y col., 2009).

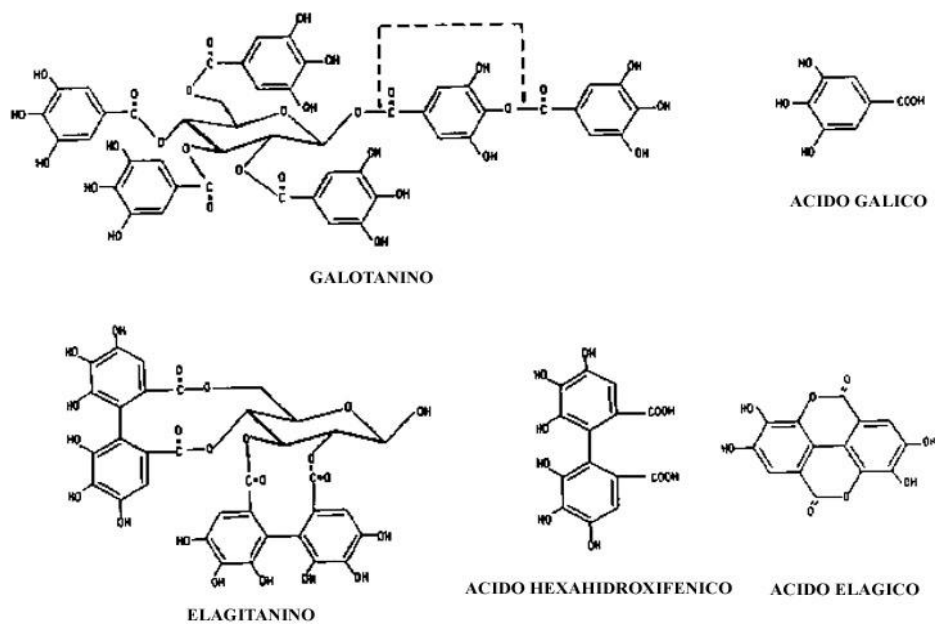


Figura 5. Estructuras de taninos hidrolizables.

Los *taninos condensados* o proantocianidinas son los productos polimerizados de una catequina o flavan-3-ol o flavan-3,4-diol o una mezcla de ambos, mediante enlaces interflavan (4-6 y/o 4-8) (Figura 6). La variación del patrón de hidroxilación permite clasificar a los taninos condensados en varios subgrupos: propelargonidinas (3,4',5,7-OH), procianidinas (3,3',4',5,7-OH), prodelfinidinas (3,3',4',5,5',7-OH), proguibortinidinas (3,4',7-OH), prosetinidinas (3,3',4',7-OH), prorobinetinidinas

(3,3',4',5',7-OH), promelacacidinas (3',4',7,8-OH), pro-apigeninidinas (4',5,7-OH) y proluteolinidinas (3',4',5,7-OH). De estos subgrupos, las procianidinas son las más comunes. En ciertas posiciones las proantocianidinas pueden ser esterificadas con ácido gálico o excepcionalmente con azúcares (Serrano y col., 2009). Se asume que el rol biológico de los taninos en las plantas está relacionado con la defensa contra microorganismos, insectos o animales. Los taninos condensados son acumulados en tanosomas, una organela clorofilácea encerrada en la vacuola. En ese sitio no interfiere con el metabolismo de la planta y no reacciona con las proteínas. Solo después de la ruptura celular puede ejercer efectos metabólicos (Sieniawska y Baj, 2017).

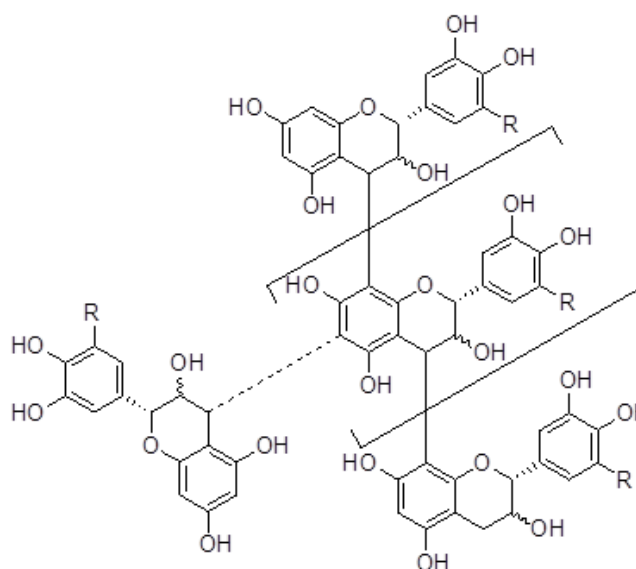


Figura 6. Modelo de estructura de un tanino condensado.

Desde el punto de vista farmacológico, los taninos presentan acciones derivadas de su capacidad de acomplejarse y precipitar con metales, alcaloides y proteínas. Se utilizan como antidiarreicos, antisépticos, antibacterianos, antifúngicos, antiviral, antiinflamatorios, vasoconstrictor, antiúlceras, antitumorales, antioxidantes, inhibidores de enzimas relacionadas con el síndrome metabólico, entre otros (Serrano y col., 2009; Vladimir-Knežević y col., 2011; Vázquez-Flores y col., 2012; Olivas-Aguirre y col., 2015; Sieniawska y Baj, 2017; Amarowicz y Janiak, 2018).

Actividad biológica de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sustancias biológicamente activas y existen numerosas evidencias, estudios *in vitro*, estudios en modelos animales e intervenciones en

humanos, que indican que estos compuestos proporcionan un beneficio al organismo frente a diversas enfermedades. Estos compuestos presentan propiedades como antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios, inmunomoduladores, antihelmínticos, antihepatotóxicos, quimiopreventivos y anticáncer, entre otras (Zampini y col., 2005, 2008, 2009, 2012; Waterman y col., 2010; Fakurazi y col., 2012; D’Almeida y col., 2012, 2013; Cabrera y Mach, 2012; Knežević y col., 2012; Verri y col., 2012; Carochio y Ferreira, 2013, Andrade y Fasolo, 2014; Christensen y Christensen, 2014; Kim y col., 2014; Pérez y col., 2014; Zhang y col., 2014; Saric y Sivamani, 2016; Orqueda y col., 2017; Dunaway y col., 2018; Peixoto y col., 2018; Roleira y col., 2018).

Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante

Todos los organismos aerobios requieren oxígeno para la producción eficiente de energía; sin embargo, el oxígeno puede resultar tóxico en concentraciones elevadas e incluso en concentraciones similares a las del aire. La toxicidad del oxígeno no se debe a la propia molécula de oxígeno, sino a la producción, a partir del oxígeno, de especies parcialmente reducidas y altamente reactivas. La mayor parte de los efectos nocivos del oxígeno pueden ser atribuidos a la formación de radicales libres que se originan a partir de él.

Naturaleza de los radicales libres de oxígeno

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células (Hernández-Rodríguez y col., 2014; Fernandes y col., 2018). La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor, provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Esta situación, conocida como *estrés oxidativo*, se define como un desbalance entre los radicales libres y los sistemas de defensa, donde se imponen los primeros (Sugimoto y Takei, 2017).

El oxígeno es un birradical que fácilmente capta electrones generando las especies reactivas del oxígeno (EROs), que incluyen al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de

hidrógeno y el radical hidroxilo (HO^\bullet), completando su reducción hasta agua, como se muestra en la Figura 7.

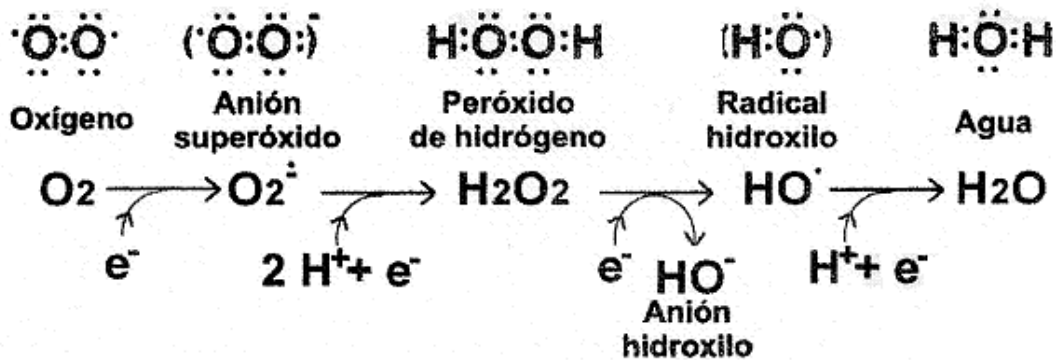


Figura 7. Formación de las especies reactivas del oxígeno.

Las EROs pueden ser:

-*Radicales*: tales como anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), peroxilo (ROO^\bullet), hidroxilo (OH^\bullet), óxido nítrico (NO^\bullet).

-*No radicales*: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), peroxinitrito (ONOO^-), entre otros.

Producción de radicales libres de oxígeno en los sistemas biológicos

▪ *Fuentes exógenas de radicales libres de oxígeno*

La radiación ionizante, la radiación ultravioleta y las radiaciones particuladas son fuentes de radicales libres por transferir su energía a componentes celulares como el agua. Estas radiaciones causan la fisión heterolítica del agua para producir átomos de hidrógeno y radicales hidroxilos y, en presencia de oxígeno, radical superóxido y peróxido de hidrógeno (Oztürk y Ayar-Kayali, 2008; Usenko y col., 2008; Gil-Hernández, 2010; Martins y col., 2016).

Distintos compuestos entre los que se encuentran pesticidas, contaminantes atmosféricos, el humo del tabaco, anestésicos, antimicrobianos, fármacos anticancerígenos y otros medicamentos, cuando son metabolizados en el organismo, dan lugar a radicales libres.

▪ *Fuentes intracelulares de radicales libres de oxígeno*

Las especies reactivas del oxígeno pueden ser producidas por *fuentes endógenas*, en procesos tales como la cadena respiratoria, fagocitosis, sistema citocromo P-450, sistema de prostaglandinas y reacciones no enzimáticas de oxígeno (Delgado Olivares y col., 2010).

Citotoxicidad de los radicales libres de oxígeno

Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus (Avello y Suwalsky, 2006). Pero cuando hay una sobreproducción de estos radicales libres, o bien cuando los sistemas de defensa están deteriorados, estas especies químicas tan altamente reactivas resultan perjudiciales (Gil-Hernández, 2010).

Las interacciones de los radicales libres de oxígeno con los constituyentes celulares dan lugar a alteraciones en el metabolismo celular y provocan daños subcelulares que pueden conducir a la aparición de la enfermedad e incluso a la muerte (Hernández-Rodríguez y col., 2014).

Los radicales libres, incluyendo los derivados del oxígeno molecular, son capaces de interactuar con casi cualquiera de las biomoléculas que constituyen las células. Las proteínas, los lípidos, los ácidos nucleicos y los hidratos de carbono son los blancos fundamentales de las reacciones de los radicales libres de oxígeno (Esfanjani y Jafari, 2017; Grzesik y col., 2018).

El principal efecto de la oxidación de lípidos de membrana a través de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica es la pérdida de fluidez de la membrana. Esto altera sus propiedades y funcionalidad, e incluso puede liberar proteínas ligadas a la membrana celular (Beckman y Ames, 1998). Además, los productos de peroxidación lipídica (ej. malondialdehído) son capaces de reaccionar con proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos, causando modificaciones estructurales de estas moléculas (Lee y col., 2004). En relación con las patologías asociadas con el estrés oxidativo, la oxidación de las lipoproteínas plasmáticas de baja densidad (LDL) ha sido implicada en el desarrollo de la arterosclerosis (Abuja y Albertini, 2001).

El daño oxidativo a las proteínas incluye la oxidación de grupos sulfhidrilo, reacciones de oxidación catalizadas por metales que inducen uniones entre residuos de aminoácidos en las cercanías de los sitios de unión con metales, reacción con aldehídos, uniones cruzadas entre proteínas y fragmentación de péptidos (Beckman y Ames, 1998). Estas lesiones de proteínas son importantes *in vivo* porque introducen modificaciones que pueden afectar la función de receptores, enzimas, proteínas transportadoras, e incluso generar nuevos antígenos capaces de desencadenar una respuesta inmune.

Las modificaciones proteicas podrían contribuir al daño secundario de otras biomoléculas, como por ejemplo inactivando las enzimas reparadoras de ADN o

alterando el funcionamiento de las ADN polimerasas durante la replicación del ADN (Halliwell y Whiteman, 2004).

Los hidratos de carbono también son blanco de los radicales libres de oxígeno. Monosacáridos como la glucosa, el manitol, los desoxiazúcares y también ciertos nucleótidos pueden fácilmente reaccionar con los radicales hidroxilos para producir nuevos radicales libres altamente reactivos. La glucosilación de las proteínas, por lo tanto, las hace más susceptibles a la oxidación por radicales libres.

Los radicales libres también pueden reaccionar con polímeros de hidratos de carbono, induciendo normalmente su fragmentación (Gil-Hernández, 2010).

Los ácidos nucleicos son susceptibles al daño oxidativo, el cual incluye modificaciones en las bases nitrogenadas, la formación de aductos entre bases y azúcares, uniones entre timina y tirosina, roturas de la hebra de ADN y enlaces cruzados con otras moléculas (Zorrilla García y col., 2004).

Si el estrés oxidativo es excesivo, los sistemas de reparación del ADN se pueden ver superados, estas modificaciones pueden conducir a mutagénesis y carcinogénesis (Lee y col., 2004; Venkat-Ratnam y col., 2006; Reuter y col., 2010; Kandikattu y col., 2015; Roleira y col., 2018).

Diariamente, cerca del 1% de las EROs escapan al control de las defensas antioxidantes endógenas, contribuyendo al daño oxidativo de moléculas vitales (Berger, 2005). Las EROs están implicadas en la etiología del envejecimiento y de enfermedades que incluyen los problemas cardiovasculares, esclerosis múltiple, trastornos neurológicos (como el mal de Parkinson o el de Alzheimer), enfermedades autoinmunes o procesos inflamatorios (Valko y col., 2007; Marotte y Zeni, 2013; Martins y col., 2016; Esfanjani y Jafari, 2017; Grzesik y col., 2018).

Sistemas antioxidantes

Las células disponen de un complejo mecanismo de defensa contra los radicales libres, constituido por los agentes antioxidantes conocido como sistema antioxidante endógeno.

▪ *Sistemas antioxidantes endógenos*

Los mecanismos de defensa antioxidante están integrados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos (Tabla 4). El primero de ellos está conformado por enzimas como la *superóxido dismutasa* (SOD), *catalasa* (CAT) y *glutación peroxidasa* (POX), éstas son

las primeras defensas contra los radicales libres y actúan neutralizando a especies altamente reactivas en moléculas menos dañinas para la célula (Figura 8).

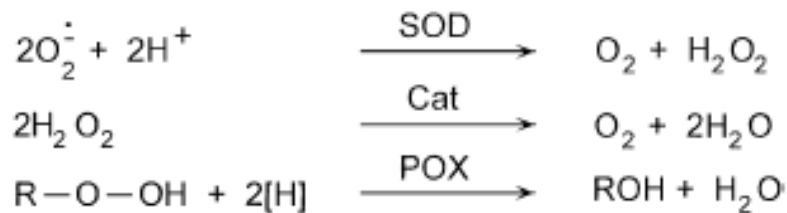


Figura 8. Reacciones enzimáticas antioxidantes. Descomposición de hidroperóxidos.

El otro sistema endógeno, no enzimático, está conformado por compuestos tales como el glutatión reducido, ácido úrico, bilirrubina, albúmina y Coenzima Q.

▪ *Sistemas antioxidantes exógenos*

En una célula normal, existe un equilibrio apropiado entre los sistemas que generan radicales (o pro-oxidantes) y los antioxidantes endógenos (defensas de la célula). Sin embargo, este equilibrio puede declinarse a favor de las sustancias pro-oxidantes cuando aumenta la producción de radicales. Cuando se forma un exceso de radicales libres, ellos pueden sobrepasar a las defensas antioxidantes endógenas y por ello, suena razonable proponer que los antioxidantes exógenos pueden jugar un papel importante en la prevención del daño causado por estrés oxidativo. Dentro de los antioxidantes exógenos se encuentran las vitaminas E y C, las proteínas y péptidos, los compuestos fenólicos, y los carotenoides, entre otros (Andrade y Fasolo, 2014; Esfanjani y Jafari, 2017; Roleira y col., 2018).

Antioxidantes sintéticos

Dentro de este grupo se encuentran productos de amplio uso en el sector alimentario como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroquinona terciaria (TBHQ) y los ésteres derivados del ácido gálico, como el propil galato (PG) (Barreira y Ferreira, 2018). Estas sustancias son en general liposolubles, salvo el PG que es hidrosoluble (Pokorny y col., 2001). Son, en conjunto, efectivas a concentraciones muy bajas (ppm) y se suelen emplear combinadas ya que actúan de modo sinérgico en la conservación de aceites y grasas para freír, productos de aperitivo, cereales precocinados, sopas y caldos deshidratados, salsas, grasas, panadería, etc.

Los antioxidantes sintéticos han levantado sospechas de ser cancerígenos, lo que llevó a que las investigaciones se vuelquen al estudio de antioxidantes naturales, principalmente a los encontrados en plantas (Hwang y col., 2001; Singh y col., 2002; Kanatt y col., 2007; Abdelli y col., 2016; Abootalebian y col., 2016).

Tabla 4. Principales sistemas de defensa antioxidante del organismo.

SISTEMAS DE DEFENSA	FUNCIÓN
Enzimas	
-Superóxido dismutasa	-Eliminación de radical superóxido
-Catalasa	-Eliminación de hidroperóxidos
-Glutación peroxidasa (GPx)	-Eliminación de hidroperóxidos
-Glutación reductasa (GRed)	-Reducción de glutación oxidado
-Glutación-s-transferasa (GST)	-Eliminación de peróxidos lipídicos
-Metionina sulfóxido reductasa	-Reparación de residuos oxidados de metionina
-Peroxidasa	-Descomposición de peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos
Antioxidantes del plasma/suero	
-Ácido úrico	-Captador de oxígeno singulete y radicales libres
-Albúmina	-Actividad peroxidasa en presencia de glutación reducido
-Bilirrubina	-Captación de radicales peroxilo
-Glutación reducido (GSH)	-Sustrato para la acción de las enzimas GPx y GST y captador de radicales libres
-Ubiquinol (Coenzima Q)	-Captador de radicales libres
Antioxidantes exógenos	
Ácido ascórbico	-Reacción con superóxido, oxígeno singulete y radical peroxilo. Regeneración de tocoferoles
Tocoferoles	-Protección de membranas lipídicas. Bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación
Carotenoides	-Desactivación del oxígeno singulete. Bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación
Compuestos fenólicos	-Captación de radicales libres y actividad quelante de metales

Fuente: Gil-Hernández (2010).

Los compuestos fenólicos como antioxidantes naturales

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, desactivando especies reactivas de oxígeno tales como oxígeno singlete, radical hidroxilo, anión superóxido, etc. (Martínez-Flórez y col., 2002; Zampini y col., 2008, 2012; Morán Vieyra y col., 2009, Quiñones y col., 2012; Roleira y col., 2015; Esfanjani y Jafari, 2017, Bernstein y col., 2018). También se ha propuesto que pueden reaccionar con los radicales peroxilo cediendo un protón o un electrón, interrumpiendo la propagación de la reacción en cadena (Carocho y Ferreira, 2013; Andrade y Fasolo, 2014). Además, pueden actuar como inhibidores de enzimas prooxidativas, tales como lipooxigenasa, ciclooxigenasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos (López-Alarcón y Denicola, 2013; Torres Carro y col., 2015, 2017; Rivas-Morales y col., 2016; Spagnuolo y col., 2018). Sumado a esto, se ha visto que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A₂; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa (Escamilla Jiménez y col., 2009; Roleira y col., 2015; Esfanjani y Jafari, 2017).

Con respecto a la relación estructura-actividad, se demostró que los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B son más activos como antioxidantes y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4 (Carocho y Ferreyra 2013; Andrade y Fasolo, 2014).

Es importante destacar que algunos polifenoles pueden actuar como antioxidantes/prooxidantes dependiendo de la concentración y de la disponibilidad de estos en el organismo, así la exposición a altos niveles de flavonoides puede originar especies reactivas de oxígeno, tales como oxígeno singlete que puede provocar daño en el material genético (López-Alarcon y Denicola, 2013; Fernandes y col., 2018).

Por otro lado, se demostró que los hidroxicinamatos y sus derivados ejercen efectos beneficiosos para la salud, incluidas las actividades antidiabéticas, antioxidantes y antimelanogénicas (Kim y col., 2012), basadas principalmente en sus propiedades antioxidantes. Se sugirió que esta actividad está relacionada con su capacidad de donar hidrógeno o electrones y su capacidad para deslocalizar/ estabilizar el radical fenoxilo resultante dentro de su estructura (Teixeira y col., 2013). Se informó que la presencia de un grupo ortodihidroxifenilo (resto catecol) en el ácido hidroxicinámico es de

importancia significativa para la actividad antioxidante, mientras que la presencia de tres grupos hidroxilos no necesariamente mejora la actividad (Razzaghi-Asl y col., 2013).

En la actualidad se desarrollan numerosas investigaciones tendientes a la búsqueda de productos naturales que presenten capacidad antioxidante para proteger y mitigar los daños ocasionados por los radicales libres y las EROs (Ordoñez y col., 2006; Zampini y col., 2008; Mercado-Mercado y col., 2013; Roleira y col., 2015; Martins y col., 2016; Burri y col., 2017; Esfanjani y Jafari, 2017; Al-Rifai, 2018; Grzesik y col., 2018; Roleira y col., 2018).

Proceso inflamatorio

La actividad antiinflamatoria ha despertado en los últimos años un gran interés científico en el área farmacológica, principalmente en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. La inflamación se puede definir como una respuesta defensiva del organismo frente a un agente irritante y se caracteriza por el movimiento de células y fluidos desde la sangre hacia los tejidos extravasculares en el lugar en el que se ha iniciado el estímulo nocivo, bajo la influencia de factores quimiotácticos producidos localmente (Ferrero-Miliani y col., 2007).

El proceso inflamatorio involucra una serie de eventos inespecíficos que pueden ser provocados por numerosos estímulos o agresiones del medio (ej.: agentes biológicos, isquemia, interacciones antígeno-anticuerpo, traumatismos, lesiones térmicas o fisicoquímicas de otra índole, etc.). Cada tipo de estímulo provoca una respuesta característica, que a nivel macroscópico esta usualmente acompañada por conocidos signos clínicos como edema, rubor, calor, dolor espontáneo a la palpación y desorden de la función tisular (Martínez y Garrido, 2013).

Estos hechos pueden agruparse en tres procesos: necrosis, inflamación y reparación.

- **Necrosis:** se produce como resultado de la muerte de células o tejidos debido a un daño endógeno o exógeno.
- **Inflamación:** es la respuesta del organismo a este hecho, actúa como un mecanismo que sirve para aislar al agente causal del daño y al tejido, evitando de esa forma la expansión de la lesión, así como también para remover los desechos resultados de la necrosis y preparar el tejido para su reparación.

- **Reparación del tejido:** ya sea por regeneración del tejido original o por reemplazo de este con tejido conectivo (Granger y Senchenkova, 2010; Hart y Loeffler, 2012).

Enzimas del proceso inflamatorio

Cuando se produce un daño celular se inicia la producción de eicosanoides, cuya fuente principal es el ácido araquidónico (AA) (Kumar y col., 2008). Los eicosanoides derivan de ácidos grasos esenciales de 20 carbonos que contienen 3, 4 ó 5 uniones dobles. En el hombre, el AA es el precursor más abundante de eicosanoides y deriva del ácido linoleico de los alimentos o puede ser ingerido directamente como parte de la dieta.

El AA es un ácido graso poliinsaturado que se encuentra unido mediante enlaces éster a los fosfolípidos de la membrana celular. Su liberación se produce en respuesta a estímulos físicos, químicos, mecánicos, hormonales o inmunológicos por acción de la enzima Fosfolipasa A₂ (FLA₂), que se activa como resultado de un aumento de los niveles intracelulares de calcio y por acción de distintas quinasas intracelulares (Gálvez Lima, 2007; Lorenzo y col., 2008).

Una vez liberado, el AA es rápidamente oxidado y se obtienen eicosanoides mediante dos rutas alternativas (Figura 8): la vía de la Ciclooxygenasa (COX), cuyo producto final son las Prostaglandinas (PGs) y Tromboxanos (TXs); y la vía de la Lipoxigenasa (LOX), a partir de la cual derivan los leucotrienos (LTs) y lipoxinas (LX) (Das, 2018).

Fosfolipasa A₂ (FLA₂)

Esta enzima cataliza el primer paso en el metabolismo del ácido araquidónico. Está representada por un gran grupo de hidrolasas que atacan las uniones acilo de los fosfolípidos para liberar un ácido graso libre y un lisofosfolípido (García y García Cardona, 2009). Las fosfolipasas se pueden clasificar en dos grandes grupos, en relación con su sitio de acción sobre las moléculas de fosfolípidos: fosfolipasas de secreción (sFLA₂), de bajo peso molecular, y fosfolipasas intracelulares o citosólicas (cFLA₂), de elevado peso molecular. A su vez, estas enzimas pueden clasificarse de acuerdo con su dependencia del calcio en dependientes o independientes de calcio (Murakami y col., 2016).

Las fosfolipasas juegan un papel fundamental en el metabolismo de los fosfolípidos y participan en una gran variedad de funciones vitales del organismo, como la remodelación de la membrana plasmática, inducción de la contracción del músculo liso

en el sistema cardiovascular y pulmonar, inducción de la proliferación celular, entre otras (Valdés Rodríguez y col., 2002).

En el proceso inflamatorio, la FLA₂ ataca los fosfolípidos de la membrana plasmática, liberando ácido araquidónico, que luego será utilizado en las vías de la ciclooxigenasa y lipoxigenasa para producir mediadores de la inflamación, y un lisofosfolípido, el cual, a su vez, será utilizado en la síntesis del factor de activación plaquetaria (FAP), otro importante mediador de la inflamación.

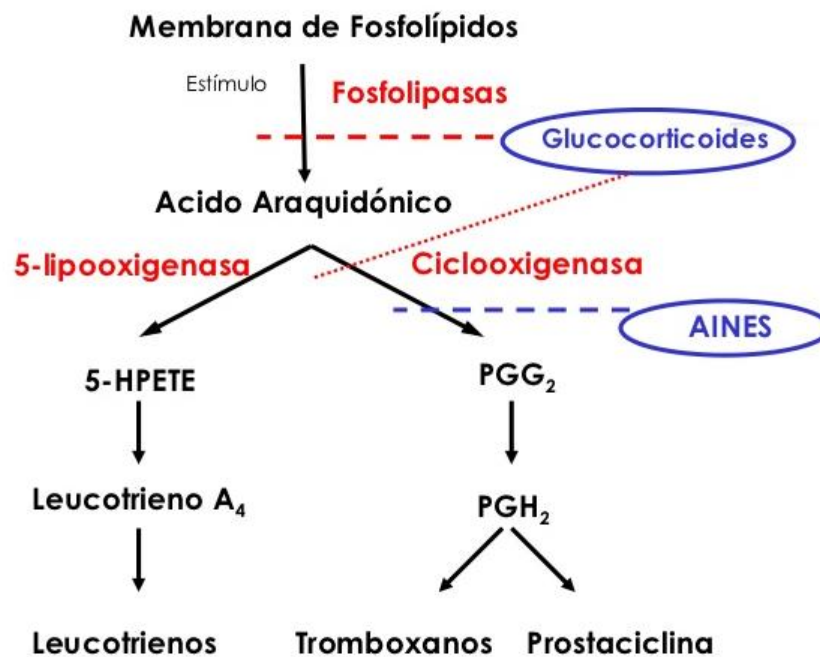


Figura 8. Metabolismo del ácido araquidónico. 5-HPETE: ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico; AINES: antiinflamatorios no esteroides; PGG₂: prostaglandina G₂; PGH₂: prostaglandina H₂.

Vía de la Ciclooxigenasa

La primera enzima de esta vía es la Ciclooxigenasa (COX), también conocida como Prostaglandina G/H Sintasa. Esta enzima se presenta en dos isoformas: una constitutiva, denominada COX-1, que se encuentra en casi todos los tipos celulares, aunque su producción se encuentra aumentada en la mucosa gástrica, plaquetas, endotelio vascular y riñón; y una isoforma inducible denominada COX-2, que se sintetiza rápidamente en la mayoría de los tejidos en respuesta a citoquinas, factores de crecimiento, endotoxinas y promotores tumorales (Devlin, 2006; Batlouni, 2010; Meirer y col., 2014).

La COX-2 actúa sobre el AA llevando a cabo dos procesos: primero lo oxida y cicla dando prostaglandina G₂ (PGG₂), y posteriormente produce la peroxidación de este producto para formar la prostaglandina H₂ (PGH₂), que, debido a su inestabilidad, es

rápidamente metabolizada por diferentes enzimas específicas para sintetizar las prostaglandinas PGD₂ y PGE₂, la prostaciclina PGI₂ y el tromboxano A₂ (TXA₂). Las actividades biológicas de los productos de la COX incluyen la generación de una vasodilatación localizada en respuesta a la inflamación aguda (PGD₂ y PGE₂), vasoconstricción (PGI₂ y TXA₂), aumento de la permeabilidad vascular (PGD₂), fiebre y cansancio (PGE₂), quimiotaxis de neutrófilos e inhibición de la agregación plaquetaria (PGD₂); siendo este último de gran importancia para el mantenimiento del equilibrio ante la agregación plaquetaria inducida por el TXA₂. El TXA₂ tiene, además, acción mitogénica y la PGE₂ induce el crecimiento celular (Batlouni, 2010; Smyth y FitzGerald, 2010).

Vía de la Lipoxigenasa

Las principales enzimas de esta vía son las LOXs; entre las que se destacan la 12-LOX, 5-LOX y 15-LOX, nombradas de esta manera por el número de carbono donde se produce la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. El ácido araquidónico en presencia de Ca²⁺ y por acción de la enzima LOX se transforma en ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETE), hidroxieicosatetraenoicos (HETE) y leucotrienos (LT), todos hidroperóxidos de lípidos. De las tres, la 5-LOX es la de mayor importancia, puesto que, además de sintetizar el correspondiente ácido 5-HPETE, produce leucotrienos (LT), importantes mediadores de la inflamación (Wisastra y Dekker, 2014). La actividad biológica de estos mediadores está asociada a una gran variedad de procesos fisiológicos, entre los que se destaca la desgranulación, agregación y quimiotaxis de neutrófilos, aumento de la permeabilidad vascular, relajación y contracción del músculo liso, amplificación del dolor, entre otros (García Barreno, 2008). La LOX 12 y 15 están presentes en múltiples sistemas y órganos del cuerpo, incluyendo islotes pancreáticos, tejidos adiposos, vascular y nervioso. De allí que estas enzimas y sus metabolitos son importantes en estados de enfermedad, como ser, diabetes, arterosclerosis, enfermedad renal, obesidad y varias enfermedades del sistema nervioso central y periférico (Li y col., 2018).

Limitaciones en el uso de antiinflamatorios comerciales

Existen dos grupos importantes de agentes antiinflamatorios:

1. Los antiinflamatorios esteroides o glucocorticoides, que son los más potentes antiinflamatorios, como el cortisol y la prednisona (Rhen y Cidlowski, 2005). Estos

estimulan la síntesis de lipocortinas, proteínas inhibitoras de la FLA₂, por lo que inhiben la síntesis de PG y LT. El inconveniente de los corticoides es que poseen importantes efectos secundarios (Bernstein y col., 2018), como complicaciones cardiovasculares, gastritis, efectos neuropsiquiátricos, defectos en los depósitos de calcio en los huesos, efectos cutáneos, cúmulos de grasa corporal, entre otros.

2. Los antiinflamatorios no esteroides (AINEs), son sustancias que ejercen sus efectos terapéuticos mediante la inhibición de la COX, lo que lleva a una disminución de los metabolitos proinflamatorios, como la PGE₂ (Meirer y col., 2014). La inhibición de COX-1 provoca la mayoría de las reacciones adversas gastrointestinales y complicaciones cardiovasculares, mientras que la inhibición de COX-2 produce los efectos antiinflamatorios. De este modo, la aparición de compuestos con acción preferencial sobre COX-2 proporciona importantes ventajas terapéuticas. La nimesulida representa una clase de AINE que se caracteriza por su acción selectiva sobre la COX-2. Un inconveniente del uso de inhibidores de la COX en el tratamiento de procesos inflamatorios es el incremento concomitante de LT, debido a la desviación del metabolismo del AA hacia la ruta de la 5-LOX. A pesar de que los inhibidores de la 5-LOX han mostrado efectos protectores, también presentan inconvenientes debido a biodisponibilidad limitada, falta de inhibidores específicos, alteraciones hepáticas y renales, mielosupresión, anormalidades gastrointestinales e incapacidad de ofrecer modelos de protección en inflamaciones crónicas (Shirumalla y col., 2006). Estos efectos secundarios complejos limitan el uso prolongado de inhibidores de COX y 5-LOX para el tratamiento extendido de procesos inflamatorios.

Recientemente, se están desarrollando tratamientos biológicos que utilizan principalmente anticuerpos monoclonales que se dirigen a la señalización de citocinas, sin los efectos secundarios de los AINEs (Rider y col., 2016). Sin embargo, si bien se ha demostrado cierto éxito en el tratamiento de varias enfermedades, se necesita más investigación para confirmar la eficacia y la seguridad de estos nuevos tratamientos.

Los compuestos fenólicos como antiinflamatorios

Las plantas medicinales y sus compuestos aislados se utilizan en todo el mundo en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas afecciones inflamatorias. El potencial terapéutico de las plantas utilizadas tradicionalmente y sus componentes es actualmente un objetivo de investigación en la búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios (Bernstein y col., 2018). Uno de los primeros ejemplos de un

medicamento de inspiración vegetal fue la aspirina, acetilsalicilato semisintético, basado en el ácido salicílico natural que se encuentra en la corteza de sauce y es utilizado tradicionalmente para tratar la fiebre y el dolor (Batlouni, 2010). Existen muchos trabajos sobre evaluación de la actividad antiinflamatoria, tanto en extractos como en metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales. Estos estudios se han realizado a través de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Bernstein y col., 2018).

Algunos estudios han demostrado que la inhibición de una única vía da lugar a la derivación del sustrato a la otra, lo que complica la intervención terapéutica. Esto ha dado lugar al interés en el desarrollo de inhibidores duales (Devi y col., 2017).

Hasta la fecha los fármacos son generalmente activos contra una única vía, dando lugar a efectos secundarios indeseables. Se sabe que los fitoquímicos inhiben múltiples objetivos simultáneamente, son capaces de interactuar con una amplia gama de macromoléculas biológicas y exhiben mejores propiedades farmacológicas en comparación con las moléculas sintéticas, por lo cual son excelentes fuentes para el diseño de fármacos multivectoriales contra la inflamación (Sivakumar y col., 2009; Williams y col., 2013; Devi y col., 2017; Bernstein y col., 2018).

En general se ha demostrado que los flavonoides polihidroxiados inhiben preferentemente a la 5-LOX y los menos hidroxiados inhiben a la COX. En cambio, *in vivo* pueden comportarse como inhibidores duales, probablemente debido a la biotransformación que sufren en el organismo. Hay estudios que indican que las flavonas inhiben preferentemente a la COX mientras que los flavonoles parecen inhibir preferentemente a la LOX (Verri y col., 2012; Kim y col., 2014). Se han reportado flavonoides que actúan sobre células que participan en el proceso inflamatorio como por ejemplo sobre la proliferación de linfocitos B y T o sobre la síntesis de mediadores proinflamatorios inducidos por LPS o citoquinas como TNF o la IL-1B en macrófagos (Nathiya y col., 2014). Los polifenoles inhiben la liberación de enzimas lisosomales, atenúan la expresión de genes proinflamatorios, inhiben la síntesis de óxido nítrico y la degranulación de células de mastocito (Catarino y col., 2016).

Hoy en día es evidente que el interés por las sustancias antiinflamatorias de origen vegetal va en aumento, porque ofrecen en algunos casos ventajas en relación con los antiinflamatorios clásicos, como es la baja incidencia de efectos secundarios. Bernstein y col. (2018) propusieron un listado de plantas con evidencia significativa de actividad antiinflamatoria, basados tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, describiendo su

distribución, partes de plantas usadas, constituyentes químicos conocidos y actividad farmacológica. Aunque se informaron docenas de especies de plantas en etnomedicina para el tratamiento de la inflamación, solo algunas fueron confirmadas en estudios antiinflamatorios.

Relación entre los procesos infecciosos, oxidantes e inflamatorios

Como se mencionó anteriormente, dentro de las fuentes endógenas de formación de radicales libres se encuentra la fagocitosis (Delgado Olivares y col., 2010). Las células fagocíticas destruyen microorganismos patógenos a través de mecanismos dependientes e independientes del oxígeno. Los primeros incluyen la participación de los radicales libres del oxígeno generados por el sistema de la NADPH-oxidasa al transformar al oxígeno molecular en anión superóxido (Rojas-Espinosa y Arce-Paredes, 2004). Asociado al proceso de la fagocitosis ocurre en las células el llamado “estallido respiratorio”, que consiste en el consumo incrementado de oxígeno y glucosa y en la producción de cantidades elevadas de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, además de otros cambios relacionados como la activación del sistema de la NADPH-oxidasa y del ciclo de las pentosas. El producto primario de la reducción del oxígeno por la NADPH oxidasa es el anión superóxido, el cual puede reducirse de manera espontánea, o por efecto de la superóxido dismutasa, hasta H_2O_2 , o puede reaccionar con el H_2O_2 ya formado, para producir radicales hidroxilo, los cuales son todavía más reactivos (Hernández-Rodríguez y col., 2014). Los mecanismos independientes del oxígeno incluyen a hidrolasas lisosomales y a péptidos y proteínas microbicidas. La actividad conjunta de las EROs y los componentes lisosomales es la causa de la muerte de los microorganismos fagocitados (Rojas-Espinosa y Arce-Paredes, 2004).

Durante la infección, los microorganismos provocan la liberación de ácido araquidónico de las células del huésped. Esta liberación es inducida por los componentes de la pared celular, así como por las fosfolipasas producidas por los patógenos. Esto conduce a una mayor producción de eicosanoides, especialmente prostaglandina E_2 (PGE_2), por parte del huésped (Fourie y col., 2017). La invasión epitelial provoca, de esta manera, la liberación de sustancias que inducen cambios inflamatorios a nivel local (Ferrer, 2000), con lo cual la infección está íntimamente asociada al proceso inflamatorio.

Por otra parte, las EROs son un importante contribuyente a muchas enfermedades, incluidas las relacionadas con la inflamación (Blaser y col., 2016). Las EROs promueven procesos inflamatorios mediante la activación de factores de transcripción,

como NF- κ B y proteína activadora (AP-1), que induce la producción de citoquinas como TNF- α (Redhu y col., 2011).

Existe un vínculo muy estrecho entre la capacidad antioxidante de los polifenoles y su actividad antiinflamatoria (Bernstein y col., 2018). La depuración de EROs por los componentes activos de las plantas atenúa la activación de ciertos mecanismos inflamatorios. Por otro lado, a los flavonoides se les atribuye la capacidad de inhibir la actividad de enzimas proinflamatorias (COX, LOX, FLA₂) o afectar la transcripción de enzimas prooxidantes (López Alarcon y Denicola, 2013).

Lo anteriormente expuesto, pone de manifiesto la relación entre la infección y los procesos oxidativos e inflamatorios. Por este motivo, es importante la búsqueda de productos naturales con múltiples efectos, antimicrobiano, antioxidante y antiinflamatorio.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los extractos etanólicos de plantas medicinales argentinas (*Zuccagnia punctata*, *Larrea divaricata*, *Larrea cuneifolia*, *Larrea nitida* y *Tetraglochin andina*) presentan actividad antimicrobiana contra levaduras del género *Candida*, y son potencialmente útiles para combatir casos de candidiasis vaginal.

Objetivo general

Avanzar en el diseño de productos fitoterapéuticos a partir de plantas medicinales argentinas para la prevención y/o terapia de infecciones vaginales.

Objetivos específicos

1. Recolectar el material vegetal, preparar extractos hidroalcohólicos y analizar el perfil fitoquímico.
2. Aislar e identificar especies de levaduras a partir de infecciones vaginales y analizar su perfil de sensibilidad a antifúngicos comerciales.
3. Evaluar el efecto de los extractos hidroalcohólicos en las especies de levaduras aisladas.
4. Determinar el efecto de los extractos hidroalcohólicos en bacterias lácticas vaginales benéficas.
5. Evaluar la actividad antifúngica de diferentes combinaciones de los extractos. Seleccionar las más activas y determinar su potencia antiinflamatoria y antioxidante para su posterior inclusión en productos fitoterápicos de liberación vaginal.
6. Diseñar formas farmacéuticas de liberación vaginal que contengan extractos de plantas medicinales argentinas y analizar su estabilidad.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Se recolectaron las siguientes especies vegetales: *Zuccagnia punctata*, *Larrea cuneifolia*, *Larrea divaricata*, *Larrea nitida* y *Tetraglochin andina*. Las tres primeras fueron recolectadas a 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm), en Amaicha del Valle, Tucumán, Argentina, durante el mes de abril del año 2013. *Larrea nitida* se recolectó en abril de 2015 en Vinchina, La Rioja, Argentina, a 3485 msnm, y *Tetraglochin andina* se recolectó durante el mes de febrero de 2011 en Huaca Huasi, Tucumán, Argentina (4300 msnm). Las especies fueron autenticadas por la Dra. Ana Soledad Cuello (INBIOFIV, CONICET). Una muestra de cada espécimen fue depositada en el Herbario del “Instituto Miguel Lillo”, Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina (*L. cuneifolia*: LIL 614829; *L. divaricata*: LIL 614299; *L. nitida*: LIL 615845; *Z. punctata* LIL 605935; *T. andina* LIL 610669).

La selección de las especies vegetales se realizó de acuerdo con las propiedades medicinales que les atribuyen los habitantes de la región (Tabla 1).

El material vegetal (partes aéreas) fue secado hasta peso constante, en estufa de aire forzado a 40°C y luego triturado en molinillo a hélice (Numak, F100).

Tabla 1. Características de las especies vegetales estudiadas

Nombre Científico	Familia	Distribución geográfica	Región de recolección	Nombre vulgar	Usos populares
<i>Zuccagnia punctata</i> Cav.	Fabaceae	Catamarca, La Rioja, Mendoza, Salta, San Juan, San Luis, Tucumán	Amaicha del Valle, Tucumán (2000 msnm)	Jarilla pispito, jarilla de la Puna, pus-pus	Antiséptico, antifúngico, tratamiento de asma, artritis, reumatismo y tumores
<i>Larrea cuneifolia</i> Cav.	Zygophyllaceae	Salta, Santiago del Estero, San Juan, San Luis, Tucumán	Amaicha del Valle, Tucumán (2000 msnm)	Jarilla, jarilla macho	Antiinflamatorio, antireumático, antifúngico, antitumoral, antiviral, balsámico, emanagogo
<i>Larrea divaricata</i> Cav.	Zygophyllaceae	Mendoza, Neuquén, Río Negro, Salta, Santiago del Estero, San Juan, San Luis, Tucumán	Amaicha del Valle, Tucumán (2000 msnm)	Jarilla, jarilla hembra	Antiinflamatorio, antifúngico, antireumático, antitumoral, antiviral, balsámico, emanagogo
<i>Larrea nitida</i> Cav.	Zygophyllaceae	Salta, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza, La Pampa, Buenos Aires, Neuquén, Río Negro, Chubut	La Rioja (2500 msnm)	Jarilla, jarilla de la montaña, crespa, pispita o pispita, jarilla fina	Rubefaciente, desodorante pédico, antiinflamatorio, antioxidante
<i>Tetraglochin andina</i> Ciald.	Rosacea	Catamarca, Jujuy, La Rioja, Salta, Tucumán	Huaca Huasi, Tucumán (4300 msnm)	Horizonte, canjia	Antiinflamatorio, antiséptico

2. Estudio microscópico de la morfología, estructura y anatomía de partes aéreas de las especies vegetales

2.1. Análisis micrográfico de las especies vegetales

Se utilizó material fresco y fijado en FAA (100 ml de formaldehído al 37%, 300 ml de etanol al 96%, 50% de ácido acético glacial al 100% y 35 ml de agua destilada). Los órganos vegetativos (tallo, pecíolo, raquis, folíolo) se montaron en soportes de cera dental y se seccionaron (intervalo de espesor 10-25 μm) con un micrótopo giratorio (Microm HM315). Los cortes se aclararon con una solución de NaClO al 50%, se lavaron con agua destilada, se colorearon en dos pasos sucesivos con safranina y azul de Astra, y luego se montaron con una solución de glicerol al 50%. Los tejidos epidérmicos se diafanizaron siguiendo la técnica Dizeo de Strittmatter (1973). Las hojas, folíolos y muestras de pecíolo-raquis se clarificaron con una solución de KOH al 10% y luego con una solución de NaClO al 50%. El material diafanizado se coloreó con una coloración metacromática al 1% de violeta de cresilo (Zarlavsky, 2014). La maceración de tallos y hojas se logró siguiendo el método de Jeffreys, de acuerdo con Zarlavsky, 2014. Todos los tejidos se visualizaron con un microscopio óptico Zeiss Axiolab equipado con una cámara digital Zeiss Axiocam ERc 5s. Las mediciones se realizaron con el software AxioVision versión 4.8.2 (Carl Zeiss Ltd, Herts, Reino Unido). El índice de empalizada se calculó como el número promedio de células empalizadas debajo de cada célula epidérmica. La densidad estomática se calculó como el número de estomas por unidad de área (mm^2), solo considerando el área de la cripta donde se ubican los estomas. Para microscopía electrónica de barrido (MEB) las muestras se fijaron en glutaraldehído fosfato al 5% tamponado con 0,1 M de cacodilato sódico a pH 7, y se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1,5% tamponado con 0,1 M de cacodilato sódico a pH 7,2. Los folíolos se deshidrataron en acetona, se secaron mediante el método de secado de punto crítico de CO_2 y se cubrieron con una capa fina de oro (200 Å). Las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM-ZEISS SUPRA-55 VP), en el Centro Integral de Microscopía Electrónica (CIME), CONICET, Tucumán, Argentina.

2.2. Análisis histoquímico

Se utilizó un método cualitativo para determinar la localización de flavonoides en tejidos vegetales. Los folíolos se incrustaron en agarosa al 3% (tipo II) antes del corte

para el examen histoquímico. Las secciones transversales (25 μm) se obtuvieron usando un micrótomo.

Las secciones se observaron como muestras frescas bajo el microscopio óptico y se tiñeron con métodos histológicos convencionales (Mercado y col., 2013). Se utilizó el reactivo de Neu (2-aminoetil-difenilborinato, Sigma) al 1% en metanol absoluto (Neu, 1957) y ácido vainillín-sulfúrico (Gaucher y col., 2013) para visualizar flavonoides. El reactivo de Nadi se usó para detectar terpenoides, aceites esenciales y resinas oleosas (David y Carde, 1964). Las secciones transversales se sumergieron (10 min) en el reactivo de Neu y luego se montaron en una solución de glicerol-agua (50:50; v/v). Algunas de las secciones se trataron con hipoclorito de sodio al 50% y se lavaron con agua destilada, antes de teñir con Sudán IV para la detección de lípidos (Zarlavsky, 2014; D'Ambrogio de Argüeso, 1986).

Las secciones teñidas con el reactivo de Neu se analizaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot) con luz UV (filtro UV-1A: filtro de excitación de 365 nm, filtro de barrera de 400 nm). Bajo estas condiciones, los flavonoides fueron detectados por una fluorescencia amarillenta (Mondolot-Cosson y col., 1997). Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Nikon Coolpix 4500.

Se examinaron folíolos frescos, 2',4'-dihidroxichalcona (DHC) y 2',4'-dihidroxi-3-metoxichalcona purificada (DHMC) con un microscopio electrónico de exploración de campo (FESEM-ZEISS SUPRA-55 VP) acoplado a un espectrómetro de dispersión de energía de rayos X (EDS) para la caracterización estructural.

3. Soluciones extractivas

A partir del material vegetal se prepararon soluciones extractivas (tinturas). La droga seca y finamente dividida (10 g) se maceró en 200 ml de etanol 60°, a temperatura ambiente, durante 1 h en agitador ultrasónico (Arcano®, PS-10A) (5 intervalos de 10 min cada uno).

Las tinturas se filtraron al vacío con papel de filtro. El residuo sólido obtenido se guardó y el filtrado se evaporó en un evaporador rotatorio (BÜCHI R-110), hasta obtener un pequeño volumen correspondiente a los metabolitos disueltos en agua (etanol 60°). Esta fracción se congeló a -20°C y posteriormente se liofilizó (liofilizador L-M10-A-E50-CRT, RIFICOR) para eliminar el contenido de agua, obteniéndose un residuo sólido. Se determinó el rendimiento en mg de peso seco (PS) de principio soluble por gramo de material vegetal. A partir de los residuos obtenidos se prepararon

las soluciones de trabajo (100 mg de PS/ml en etanol 60°), que se conservaron a -20°C hasta su utilización.

4. Determinación de fitoquímicos

4.1. Determinación cualitativa de fitoquímicos

Se realizó un tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de todas las especies para determinar la presencia de los principales grupos químicos, siguiendo procedimientos estandarizados (Harborne, 1973; Edeoga y col., 2005).

4.1.1. Determinación de alcaloides

Se llevaron a sequedad cada uno de los extractos, en una cantidad correspondiente a 100 mg PS. Luego se resuspendieron con 1,5 ml de HCl al 10%. La mezcla se calentó a 70°C durante 10 minutos, se enfrió y centrifugó. A partir del sobrenadante se llevaron a cabo dos reacciones:

-En un tubo de ensayo se colocaron 500 µl del mismo y se adicionaron 400 µl del reactivo de Mayer (HgCl/KI). La formación de un precipitado blanco indica presencia de alcaloides (Teke y col., 2010).

-En un segundo tubo, se añadieron también 500 µl del sobrenadante y se agregaron 500 µl del reactivo de Dragendorff (BiNO₄/KI). La formación de un precipitado o turbidez indica presencia de alcaloides (Adegboye y col., 2008).

4.1.2. Determinación de glucósidos cardiotónicos

A 100 mg de los extractos alcohólicos disueltos en 500 µl de etanol 80° se adicionaron 250 µl de una solución de acetato de plomo al 10% y 200 µl de agua destilada. La mezcla se calentó a baño María durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó y al sobrenadante obtenido se le adicionó 1 ml de cloroformo. Una vez agitada la mezcla y separadas las dos fases, se fraccionó la fase clorofórmica en 2 tubos que se llevaron a estufa de 37°C hasta sequedad. En cada tubo se realizó una reacción diferente con el objetivo de determinar la presencia de distintos grupos funcionales de glucósidos cardiotónicos (Harborne, 1973; Teke y col., 2010).

En el primer tubo se adicionaron 100 µl del reactivo de Baljet (Ácido pícrico en etanol/NaOH en agua, 1:1 v/v) y se agitó. La aparición de coloración roja, naranja rojiza o violeta indica la presencia de cardenólidos. En el segundo tubo se adicionaron 200 µl de ácido acético glacial, 10 µl de cloruro férrico al 5% (en metanol), una gota de ácido

sulfúrico concentrado y se agitó (reacción de Keller-Kiliani). Las coloraciones entre azul y verde indican la presencia de desoxiazúcares, característicos de cardiotónicos glicosilados (cardenólidos).

4.1.3. Determinación de cumarinas

En tubos de ensayo se colocaron extractos hidroalcohólicos, correspondientes a 100 mg PS, se taparon los tubos con papel de filtro impregnado con una solución de hidróxido de sodio al 5% y se llevaron a baño de 100°C durante 5 minutos.

Los papeles de filtro se removieron y se examinaron bajo luz ultravioleta, siendo la fluorescencia amarilla indicativa de la presencia de cumarinas (Teke y col., 2010).

4.1.4. Determinación de flavonoides

En cada tubo se colocó un volumen de 2 ml de cada extracto, correspondiente a 100 mg PS, se adicionaron algunos fragmentos de magnesio y se agregaron unas gotas de ácido clorhídrico al 10% por las paredes del tubo (Reacción de Shinoda). El cambio de coloración del extracto hacia tonos rojizos indica la presencia de flavonoides (Guillermo Navarro, 2002; Mojab y col., 2003).

4.1.5. Determinación de taninos

Cada extracto (100 mg PS) fue resuspendido con 3 ml de agua destilada. Para observar la presencia de taninos, a un 1 ml de esta disolución se le adicionaron unas gotas de cloruro férrico al 10%. Una coloración azul-negra indica presencia de taninos hidrolizables, y una coloración verde indica la presencia de taninos condensados (Adegboye y col., 2008).

4.1.6. Determinación de saponinas

Cada extracto (100 mg PS) fue resuspendido en 2 ml de agua hirviendo. La suspensión se agitó vigorosamente y se dejó reposar de 15 a 20 minutos. La formación de una espuma persistente indica la presencia de saponinas (Ayoola y col., 2008).

4.1.7. Determinación de derivados antracénicos libres

Cada extracto (100 mg PS) se adicionó con 2,5 ml de cloroformo. La mezcla se agitó y se dejó reposar durante 15 minutos. Se recogió la fase clorofórmica y se dividió en dos tubos para cada extracto.

En el primer tubo se llevó a cabo la reacción de Bronträger. Se adicionaron 500 µl de una solución de hidróxido de sodio al 10% en agua y se observó la aparición de coloraciones entre amarillo y rojizo en la fase acuosa (Onwukaeme y col., 2007). Al segundo tubo se le adicionaron 200 µl de una solución de acetato de magnesio al 0,5% en metanol. La aparición de coloraciones amarillentas a rojizas indica la presencia de antraquinonas libres.

4.1.8. Determinación de triterpenos y/o esteroides

Cada extracto (100 mg PS) fue resuspendido con 2 ml de cloroformo y se dejó decantar. Se transfirieron alícuotas de 500 µl a otros tubos, en los cuales se añadió ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un anillo marrón-rojizo en la interfase indica la presencia de triterpenos y/o esteroides (Reacción de Salkowski) (Adegboye y col., 2008).

4.2. Determinación cuantitativa de fitoquímicos

4.2.1. Determinación del contenido de compuestos fenólicos

Se determinó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Se emplearon 10 µl de diluciones etanólicas de cada una de las extracciones; se llevó a 1 ml con agua destilada, se adicionaron 0,1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) y luego de 2 minutos se agregaron 0,4 ml de carbonato de sodio (15,9%). La absorbancia se midió a 765 nm, luego de 20 minutos a temperatura ambiente, en espectrofotómetro Beckman DU 650. Se usó como estándar una solución alcohólica de ácido gálico (1 mg/ml). Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por g de peso seco (mg EAG/g PS).

4.2.2. Determinación del contenido de compuestos fenólicos no flavonoides (FNF)

Se mezcló 0,5 ml de cada extracto con 0,5 ml de HCl (1:3; v:v) y 0,25 ml de formaldehído (Zoecklein y col., 1990). Se dejó en reposo durante 24 hs, se centrifugó a 9000 g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante, al cual se le determinó el contenido de compuestos fenólicos de acuerdo con 4.2.1 (Singleton y col., 1999). Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por g de peso seco (mg EAG/g PS).

4.2.3. Determinación del contenido de compuestos fenólicos flavonoides (FF)

El contenido de fenólicos flavonoides se determinó calculando la diferencia entre el contenido de fenólicos totales (FT) y el contenido de fenólicos no flavonoides (FNF): (FF=FT-FNF). Los resultados fueron expresados como mg EAG/g PS.

4.2.4. Determinación de flavonas y flavonoles

El contenido de flavonas y flavonoles fue determinado según el método de Woisky y Salatino (1998). Se tomó 0,02 ml de las distintas diluciones, se agregó 2,43 ml de etanol 96° y 0,05 ml de AlCl₃ 5%. La mezcla se homogenizó por agitación y la absorbancia se registró a 425 nm, luego de incubar 30 min a temperatura ambiente. Se usó como estándar una solución alcohólica de quercetina (1 mg/ml). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de quercetina/g de peso seco (mg EQ/g PS).

4.2.5. Extracción y determinación del contenido de taninos condensados e hidrolizables

El extracto seco (2 g) fue extraído con 25 ml de acetona: agua (70:30, 1:10 v/v) y se determinó el contenido de taninos condensados según Prior y col. (2010), con algunas modificaciones. Un volumen de 0,1 ml de extracto acetónico se puso en contacto con 0,9 ml de solución de 4-dimetilaminocinamaldehído (0,1% en etanol acidificado). La absorbancia fue medida a 640 nm luego de incubar a 25°C durante 20 minutos. Los resultados se expresaron en mg de procianidina B2/g de peso seco (g EPB2/g PS).

Para la determinación de taninos hidrolizables o galotaninos se evaporó la acetona y la porción acuosa se separó en dos fracciones. Una de ellas (2 ml) se sometió a hidrólisis ácida con 4 ml de H₂SO₄ 2N a 100°C durante 26 horas y se determinó el contenido de ácido gálico liberado o total con el método de Inoue y Hagerman (1988), con algunas modificaciones. En la otra fracción, se cuantificó por el mismo método el contenido de ácido gálico libre. A 100 µl de cada una de las muestras se le añadieron 150 µl de rodanina (0,667% de metanol). Luego de 5 min, se añadieron 500 µl de hidróxido de potasio 0,5 N y 1,75 ml de agua destilada. Las mezclas se dejaron a temperatura ambiente durante 10 min y se determinó la absorbancia a 520 nm. Los resultados se expresaron en g de equivalentes de ácido gálico/ g de peso seco (mg EAG/g PS).

El contenido de taninos hidrolizables se calculó por diferencia entre ambos valores:

$$TH = GT - GL$$

donde TH: Taninos hidrolizables, GT: contenido de ácido gálico total; GL: contenido de ácido gálico libre.

4.3. Perfil cromatográfico

4.3.1. Cromatografía en capa fina

Se separaron alícuotas de las muestras (100-400 µg EAG) por cromatografía en capa fina (Kieselgel 60 F254 0,2 mm, Merck), usando como fase móvil una mezcla de tolueno/acetona/cloroformo (4,5:3,5:2,5; v/v/v). Los componentes separados se visualizaron bajo luz ultravioleta (254 y 365 nm, UV Lámpara UV Modelo 5L-58 Mineralight). Los compuestos fenólicos se detectaron con el reactivo NP/PEG (NP: ester aminoetilico del ácido difenilbórico al 1% en metanol, Sigma; PEG: polietilenglicol; Wagner y col., 1984). Se utilizaron soluciones de patrones auténticos en metanol (1: 1000, p/v) con fines comparativos.

4.3.2. HPLC-DAD

El sistema de HPLC usado para analizar los extractos, a partir de los cuales se llegaron a identificar distintos compuestos fenólicos, consiste en un equipo Waters 1525 con sistema de bomba binaria, válvula de inyección manual (loop de 20 µl), un compartimiento con termostato para columna, y detector de arreglos de diodo Waters 2998. El análisis se realizó a una temperatura de 40°C, utilizándose una columna XBridge™ C18 (5 µm) de 155 x 4,6 mm con un flujo de 0,8 ml/min (Waters Corporation, Milford, MA).

La fase móvil para la separación de compuestos a partir de los extractos se compone de un disolvente A (ácido acético al 0,1% en agua) y un disolvente B (ácido acético al 0,1% en metanol) (condiciones: 10-57% de B 0-45 min y se mantuvo a 100% de B de 45 a 60 min). El caudal se fijó en 0,5 ml/min. Se utilizaron soluciones de 1 mg PS/ml. La recolección de datos se llevó a cabo con el software Empower™ 2. La determinación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos se realizó por comparación de los tiempos de retención y los datos espectrales (220-600 nm) de cada pico con las de los estándares de Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.).

4.3.3. HPLC-ESI-MS/MS

Los extractos se analizaron mediante HPLC-ESI-MS/MS para identificar sus constituyentes. Los espectros de masas se registraron usando un sistema de

cromatografía líquida Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., CA, EE. UU.) conectado a través de un sistema de escisión Esquire 4000 Ion Trap LC/MS (n) (Bruker Daltoniks, Alemania). La ionización se realizó a 3000 V asistida por nitrógeno como gas de nebulización a 50 psi y como gas de secado a 365°C y un caudal de 10 l/min. Los iones negativos se detectaron mediante exploración completa (m/z 20-2200) y resolución normal (velocidad de exploración 10,300 m/z/s, pico con 0,6 FWHM/m/z). Los parámetros de la trampa se establecieron en el control de carga de iones (ICC) utilizando los parámetros predeterminados del fabricante y el tiempo máximo de acumulación de 200 ms. Las condiciones de espectrometría de masas para el análisis fueron: aguja de electrospray, 4000 V; compensación de la placa final, -500 V; skimmer 1, 56.0 V; skimmer 2, 6.0 V; offset de salida capilar, 84.6 V; salida capilar, 140.6 V. Los espectros de disociación inducida por colisión se obtuvieron con una amplitud de fragmentación de 1.00 V (MS/MS) utilizando helio como gas de colisión y se controlaron automáticamente a través de la opción SmartFrag. La mezcla se analizó usando una columna MultoHigh 100 RP 18-5 μ (250 x 4,6 mm) (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Alemania) mantenida a 25°C. Los análisis de HPLC-MS se realizaron usando un sistema de disolvente de gradiente lineal que consiste en 1% de ácido fórmico en agua (fase A) y acetonitrilo (fase B). El caudal fue de 0,5 ml / min y el volumen inyectado fue de 20 μ l. Los compuestos se controlaron a 254 nm.

5. Actividades biológicas

5.1. Evaluación de la actividad antifúngica

5.1.1. Microorganismos

Las cepas fueron provistas por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Los microorganismos utilizados fueron *Candida albicans* (144783; 134333; 2089); *C. glabrata* (031646; 042030; 031982); *C. tropicalis* (1841) y *Saccharomyces cerevisiae* (134528; 134544; 124263). Como cepas de referencia se utilizaron *C. parapsilopsis* ATCC 134410 y *C. krusei* ATCC 134409. Las mismas fueron ingresadas al cepario del Laboratorio de Productos Naturales (LIPRON) perteneciente al Instituto de Bioprospección y Fisiología Vegetal (INBIOFIV, CONICET-UNT).

5.1.2.Preparación del inóculo

Todos los organismos se mantuvieron en infusión de cerebro-corazón (medio BHI) que contiene 30% (v/v) de glicerol a -20°C. Antes del ensayo, las suspensiones de levaduras se sembraron en agar Sabouraud y se cultivaron aeróbicamente a 35°C durante 24 h. De estos cultivos se toman una o dos colonias con ansa estéril y se prepara una suspensión en 2 ml de solución fisiológica, ajustando el inóculo a la turbidez del estándar equivalente a 0,5 de la escala de Mc Farland (DO= 0,08 a 530 nm), correspondiente aproximadamente a $1-5 \times 10^6$ levaduras/ml (CLSI, 2008).

5.1.3.Ensayos bioautográficos

Se realizaron cromatografías en capa fina (CCF). Se sembraron entre 100-400 µg de compuestos fenólicos de cada una de las tinturas. Se utilizó como fase móvil tolueno/acetona/cloroformo (4,5:3,5:2,5; v/v/v). Se dispersó sobre la placa de silica gel 5 ml de medio Sabouraud conteniendo 0,6% de agar inoculado con 400 µl de una suspensión fúngica de 10^6 UFC/ml de *C. albicans* (preparada como indica el apartado 5.1.3). Se incubaron a 37°C durante 24 hs. Transcurrido este tiempo las placas se asperjaron con una solución de MTT, 2,5 mg de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium en 1 ml de PBS (10 mM tampón de fosfato de sodio, pH 7, conteniendo 0,15 M NaCl). Se evaluó la viabilidad celular mediante la reducción de la sal de tetrazolium en azul de formazán observándose áreas de inhibición del crecimiento bacteriano de color amarillo sobre un fondo azul (Nieva Moreno y col., 1999).

5.1.4. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

5.1.4.1. Método de macrodilución seriada en agar

Se realizaron diluciones de cada tintura (volumen final de 1 ml). Se agregaron 9 ml de medio agar Sabouraud llegando a una concentración final entre 12,5 a 1600 µg de compuestos fenólicos/ml. Se homogenizó la mezcla y se colocó en placas de Petri de 10 cm de diámetro. A partir de la suspensión descrita en el apartado 5.1.3. se transfirieron 0,1 ml de cada inóculo a tubos con 0,9 ml de solución fisiológica. Las placas fueron inoculadas con 2 µl de cada una de estas suspensiones ($0,5-2,5 \times 10^3$ UFC) e incubadas aeróbicamente durante 48 horas a 37°C. Se incluyó en cada tratamiento un control de crecimiento fúngico y control de solvente. Los ensayos se realizaron por triplicado (CLSI, 2008). La concentración inhibitoria mínima (CIM) se consideró como la mínima

concentración de tinturas en equivalente de compuestos fenólicos donde no hubo crecimiento visible después del período de incubación.

5.1.4.2. Método de microdilución en medio líquido

Por el método de microdilución en medio líquido se determinaron los valores de CIM y CFM de los extractos etanólicos de las plantas medicinales seleccionadas contra levaduras, siguiendo las recomendaciones del CLSI (M27-A3).

A partir de la suspensión obtenida en el apartado 4.2 se tomaron 10 μ l y se colocaron en tubos con 10 ml de medio sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Gibco, ICN, Oxoid, Sigma), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M (ICN, Sigma), ajustado a pH $7\pm 0,1$ y con 0,2% de glucosa. Los extractos fueron transferidos a pocillos de microplacas estériles de base redonda de 96 pocillos, de modo de obtener una dilución seriada al doble (25-1600 μ g de compuestos fenólicos/ml). Se dejó evaporar el solvente y se colocaron en cada uno de los pocillos 200 μ l de cada inóculo fúngico ($0,5-2,5 \times 10^3$ UFC) en medio RPMI. Se realizaron los correspondientes controles de extractos, medio de cultivo y de solvente.

Las policubetas se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 48 h. El crecimiento fúngico se indicó por la presencia de turbidez y un sedimento en el fondo del pocillo que se visualiza como un botón. Los valores de CIM se consideraron como la menor concentración necesaria para inhibir el crecimiento (ningún crecimiento visible macroscópicamente).

Para determinar los valores de CFM, se tomaron 10 μ l de cada pocillo de la microplaca sin crecimiento visible y se realizó siembra puntual en placas conteniendo 10 ml de medio agar Sabouraud. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C. Los valores de CFM se consideraron como la menor concentración del agente antimicrobiano necesarios para producir la muerte del 100% de las levaduras.

5.1.4.3. Evaluación del efecto de las combinaciones de extractos antimicrobianos

Se utilizó el método del tablero de ajedrez (Moody, 2007), evaluando diluciones múltiples de combinaciones de dos extractos antimicrobianos, en concentraciones iguales, por encima y por debajo de los valores de CIM (Figura 1).

Se utilizaron microplacas estériles de 96 pocillos. Cada una de las combinaciones de extractos fue transferida a un pocillo de la microplaca, donde cada pocillo representa a un casillero del tablero. Las concentraciones de extractos usadas en las combinaciones

estuvieron comprendidas entre 6,25 y 800 μg EAG/ml. Se dejó evaporar el solvente y en cada pocillo se adicionaron 200 μl del inóculo bacteriano conteniendo $1-5 \times 10^3$ UFC/ml, siguiendo el método de microdilución en caldo descrito anteriormente.

Se calcularon los índices de concentración fraccionaria inhibitoria (ICFI), que expresan la interacción de dos o más agentes antimicrobianos presentes en una mezcla (Moody, 2007).

Para este índice, inicialmente se obtienen las concentraciones fraccionarias inhibitorias (CFI) de cada componente, que se calcula dividiendo el valor de CIM del compuesto en la combinación por el valor de CIM del agente antimicrobiano solo.

$$\text{CFI}_A = \text{CIM}_A \text{ en presencia de B} / \text{CIM}_A$$

$$\text{CFI}_B = \text{CIM}_B \text{ en presencia de A} / \text{CIM}_B$$

El ICFI se calcula luego como la suma de las CFI de cada componente en la combinación y permite definir si una mezcla presenta efecto sinérgico ($\leq 0,5$), aditivo ($0,5-1$), indiferente ($1-4$) o antagónico (≥ 4) (Schelz y col., 2006).

$$\text{ICFI} = \text{CFI}_A + \text{CFI}_B$$

Extracto A ($\mu\text{g EAG/ml}$)

Conc.	0	6,25	12,5	25	50	100	200	400	800
0	X (C)								
6,25									
12,5									
25									
50									
100									
200									
400									
800									

X (C): control del inóculo

Figura 1. Modelo del tablero de ajedrez usado para la determinación de sinergismo entre dos extractos vegetales.

5.1.5. Pruebas de sensibilidad *in vitro*

5.1.5.1. Ensayo en medio líquido

Se utilizó el método de referencia E.Def 7.2 del EUCAST, 2012. Como medio de cultivo se utilizó RPMI 1640 con 2% de glucosa, tamponado a pH 7 con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) (Sigma, Argentina) 0,165 M.

Se ensayó la actividad *in vitro* de fluconazol (Pfizer, S. A., Argentina), itraconazol (Janssen, Argentina), anfotericina B (AMB), 5-fluorocitosina (5-FC), anidulafungina (Pfizer, S. A., Argentina), voriconazol, caspofungina, ketoconazol y posaconazol (Sigma, Argentina). Las soluciones stock de los antifúngicos se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, Argentina), a excepción de la solución de 5-

fluorocitosina, que fue preparada en agua destilada estéril. Los rangos de concentraciones probados fueron de 0,13 a 128 µg/ml para 5-fluorocitosina y fluconazol y de 0,015 a 16 µg/ml para el resto de los antifúngicos. La CIM se determinó en placas de 96 pocillos de fondo plano.

El inóculo se realizó a partir de un cultivo de 24 horas a 35°C en agar YM (extracto de malta 0,3%; extracto de levadura 0,3%; peptona 0,5%; glucosa 1%; agar 2%). Se preparó un inóculo de turbidez 0,5 McFarland en solución 0,15 M de cloruro de sodio estéril ($1-5 \times 10^6$ UFC/ml). Se sembraron las placas y se incubaron durante 24 y 48 horas. La lectura se realizó en un lector a 405 nm (Labsystems Multiskan Multisoft, Basingstoke, Reino Unido). Para calcular el 100% de crecimiento, se promedió la absorbancia de las celdas controles sin droga. Se consideró CIM de AMB a aquella concentración que provocó una disminución de la densidad óptica del 95% comparada con la del control de crecimiento, mientras que para los azoles y la 5-fluorocitosina se consideró una reducción del 50%. Los resultados se evaluaron de acuerdo con los puntos de corte publicados por EUCAST (E.Def 7.2).

5.1.5.2. Métodos de difusión en agar

Se ensayó la actividad *in vitro* de fluconazol (Discos Malbrán) y de nistatina, voriconazol, itraconazol, anfotericina B, posaconazol (tabletas Neo-Sensitabs).

Se preparó un inóculo de turbidez 0,5 de la escala de McFarland (DO= 0,08 a 530 nm) en solución de cloruro de sodio estéril a partir de un cultivo de 24 horas a 35°C en agar YM. Se utilizaron placas de Petri con medio Mueller Hinton, con el agregado de 2% de glucosa y azul de metileno, concentración final de 0,5 µg/ml (MHM). Las placas se sembraron por inundación, previa dilución 1/10 en 5 ml de solución de cloruro de sodio estéril a partir del inóculo inicial. Se inundó la placa de MHM con 5 ml del inóculo inicial diluido, se dejó en contacto 5 minutos y se extrajo el líquido excedente. Los discos/tabletas se colocaron sobre la superficie del agar de la placa previamente inoculada con la ayuda de una pinza estéril. Luego las placas se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 o 48 horas, hasta obtener halos claramente distinguibles. La lectura se realizó con la ayuda de una regla para medir el diámetro del halo externo de la zona de inhibición. Los resultados se interpretaron de acuerdo con los puntos de corte establecidos por EUCAST (E.Def 7.2).

5.1.6. Compatibilidad con lactobacilos

Los lactobacilos son los microorganismos predominantes del microbioma vaginal de mujeres sanas, y disminuyen en el caso de diferentes síndromes, tales como vaginosis bacteriana, candidiasis o vaginitis atrófica. Por ello, la evaluación del efecto de los extractos de plantas sobre bacterias lácticas vaginales es fundamental, a fin de que su administración no produzca un desequilibrio del microbioma vaginal, o que no permita el restablecimiento del equilibrio ecológico del tracto.

5.1.6.1. Microorganismos

Se utilizaron tres cepas de lactobacilos provistas por CERELA (Centro de Referencia de Lactobacilos, Tucumán, Argentina): *Lactobacillus casei* (CRL 1267), *L. paracasei* (CRL 1291), *L. johnsonii* (CRL 1292).

5.1.6.2. Activación de lactobacilos

Se partió de un cultivo stock conservado en medio LEL (leche-extracto de levadura) a -20°C. Para preparar el primer subcultivo, se inocularon tubos conteniendo 5 ml de medio de cultivo MRS con 30-50 µl del cultivo stock y se incubó durante 24 hs a 37°C, sin agitación. A partir del primer subcultivo, se realizaron dos subcultivos sucesivos (150 µl de cultivo en 5 ml de medio fresco MRS), a 37°C durante 12 hs, sin agitación.

A partir del tercer cultivo se tomó una alícuota de 1 ml y se centrifugó en centrifuga Eppendorf Bioamerican Modelo 724 D. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 ml de NaCl 0,9%. Se repitió dos veces el procedimiento. A partir de la suspensión obtenida se ajustó a una DO correspondiente a 0,5 en la escala Mc Farland. Este ajuste produce una suspensión que contiene entre $1-5 \times 10^8$ UFC/ml, la cual se diluye 1:10, produciendo una concentración celular entre $1-5 \times 10^7$ UFC/ml.

5.1.6.3. Ensayo de actividad antibacteriana

Se utilizaron cinco concentraciones de cada extracto, que se pusieron en contacto con 4,5 ml de medio MRS agar. Se homogenizó la mezcla y se vertió en placas de Petri de 5 cm de diámetro. Se dejó solidificar y se realizó siembra puntual con 2 µl de cada suspensión de lactobacilos.

Se ensayaron concentraciones menores y mayores a las correspondientes a la CIM de cada extracto para cepas del género *Candida*.

Se incubaron las placas durante 24 hs a 37°C. Se analizaron los resultados observando macroscópicamente la presencia o no de crecimiento bacteriano.

5.2. Actividad antiinflamatoria

5.2.1. Efecto de los extractos sobre la actividad de la enzima lipooxigenasa (LOX)

La actividad de la enzima lipooxigenasa (LOX) fue determinada usando un método espectrofotométrico, basado en la oxidación enzimática del ácido linoleico a los correspondientes hidroperóxidos (Torres Carro y col., 2017). La mezcla de reacción contiene 50 µM de ácido linoleico en tampón borato de sodio 0,2 M pH 9, 0,9 mM de 5-LOX de soja disuelta en tampón y diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico (en *Z. punctata* y *L. cuneifolia*: entre 12,5-25 µg EAG/ml; *L. divaricata*: 12,5-50 µg EAG/ml; *T. andina*: 12,5-70 µg EAG/ml). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La cantidad de hidroperóxidos lipídicos producidos a partir del ácido linoleico se determinó espectrofotométricamente a 234 nm (Espectrofotómetro UV/ Vis- JASCO V-630BIO) cada 30 segundos durante 5 minutos. Los resultados se expresan en concentración de los hidroperóxidos lipídicos producidos a partir del linoleato de sodio. Como control de 100% de actividad se utiliza enzima, sustrato y se reemplaza el efector por etanol 60°, y como control positivo de inhibición se utilizó naproxeno (antiinflamatorio comercial) (5-25 µg/ml).

Se calculan los porcentajes de inhibición de la enzima a diferentes concentraciones de extracto por comparación con el control de 100% de actividad.

La concentración de extracto/mezcla necesaria para inhibir a la enzima en un 50% (CI₅₀) se determina a partir de las curvas de porcentaje de inhibición versus las diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico utilizadas en el ensayo.

5.2.2. Efecto de los extractos sobre la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX-2)

La capacidad de los extractos para inhibir la actividad de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) se determinó usando el kit N° 560131 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), basado en la medición de prostaglandina (PG) mediante ELISA (D'Almeida y col., 2013). Se utilizó una enzima COX-2 recombinante humana y como sustrato ácido araquidónico. Los ensayos inhibitorios se desarrollaron en presencia de diferentes concentraciones de compuestos fenólicos (25-75 µg EAG/ml). Se utilizó DMSO como solvente control. Se realizó una preincubación de la enzima COX-2 con la muestra durante 10 min y una incubación de 2 min en presencia de ácido araquidónico a 37°C. Se usó un antiinflamatorio comercial (nimesulida) como referencia. El efecto de los

extractos fenólicos sobre la producción de mediadores proinflamatorios se evaluó calculando el porcentaje de inhibición de la producción de PGE₂.

5.2.3. Efecto de los extractos sobre la actividad de la enzima fosfolipasa A₂ (sFLA₂)

La actividad de la enzima fosfolipasa A₂ (sFLA₂) se determinó usando 1,2-diheptanoilto-glicerofosfo-colina (1,2dHGPC) y Triton X-100 como sustratos (D'Almeida y col., 2013). El tampón Tris-HCl (10 mM, pH 8) con CaCl₂ (10 mM), KCl (100 mM) y Triton X-100 (0,3 mM) (tampón de reacción) se usó para la reconstitución del sustrato para lograr una concentración final de 1,25 mM. La mezcla contenía 50 µl de tampón de reacción, 10 µl de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, 10 mM), 10 µl de enzima sFLA₂ (1 mg/ml) y el extracto hidroalcohólico disuelto en DMSO (25-75 µg EAG/ml) o fármaco antiinflamatorio comercial (naproxeno o indometacina). La acción se inició mediante la adición de 150 µl de 1,2dHGPC (1,66 mM) y se mantuvo durante 40 min a 25°C. La absorbancia se leyó a 414 nm en un lector de microplacas (BiotekELx 808™).

5.3. Actividad antioxidante

5.3.1. Capacidad de depuración de radicales libres por el método del radical catión 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina -6- ácido sulfónico) (ABTS^{•+})

5.3.1.1. Preparación del radical catión ABTS

El radical catión ABTS (ABTS^{•+}) es un radical estable, de color azul/verde que absorbe a 734 nm y al ser reducido por una especie radicalaria o por una molécula antioxidante se decolora (Figura 2). El grado de decoloración es proporcional a la actividad antioxidante de la muestra. El ABTS^{•+} se genera haciendo reaccionar una solución acuosa de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2,45 mM), se incubaba a temperatura ambiente (23°C) en oscuridad durante 16 horas. La solución de ABTS^{•+} es diluida con etanol 80° hasta obtener una absorbancia de 0,70±0,02 a 734 nm (Re y col., 1999).

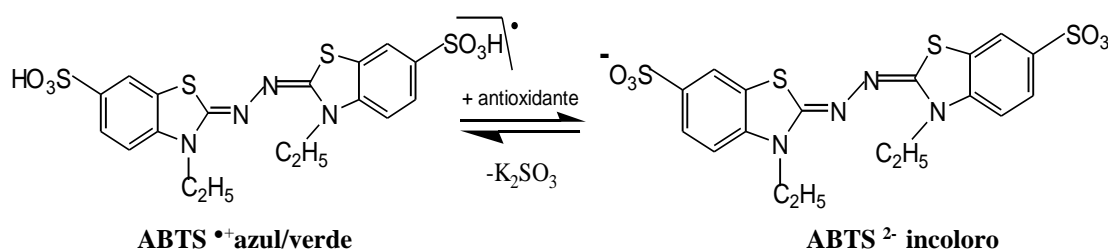


Figura 2. Reacción de reducción del radical catión ABTS frente a un agente antioxidante.

5.3.1.2. Método espectrofotométrico

A 0,1 ml de etanol 60° conteniendo diferentes cantidades de extractos en equivalentes de compuestos fenólicos se le adiciona 0,2 ml de la solución de ABTS^{•+}. Se mide la absorbancia a 734 nm al 1° minuto y a los 6 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Los resultados se expresan en términos de concentración depuradora del 50% de los radicales libres (CD₅₀), concentración en equivalentes de ácido gálico necesaria para depurar el 50% de los radicales libres ABTS.

5.3.2. Actividad depuradora de peróxido de hidrógeno

La mezcla de reacción contenía fenol (12 mM), 4-aminoantipirina (0,5 mM), H₂O₂ (0,7 mM), buffer fosfato de sodio a pH 7 (84 mM) y diferentes concentraciones de los extractos polifenólicos. Se mantuvo 20 min a 35°C, se agregó la peroxidasa de rábano picante (0,1 U/ml) y se incubó a 37°C, durante 30 min. La absorbancia se midió a 504 nm (Fernando y Soysa, 2015). Los resultados se expresaron como valores de CD₅₀ en µg EAG/ml. Se utilizó quercetina como compuesto de referencia (1-30 µg/ml).

5.3.3. Actividad depuradora de radical hidroxilo

La capacidad depuradora de [•]OH fue determinada según la metodología propuesta por Chovot (2010). Los extractos hidroalcohólicos fueron disueltos en un buffer KH₂PO₄/KOH (50 mM, pH 7,4) hasta obtener concentraciones variables entre 0,2-25 µg EAG/ml. A 250 µl de estas soluciones, se les adicionaron 50 µl de 2-desoxi-D-ribosa (10,4 mM en buffer) y 100 µl de una mezcla de 50 µl de FeCl₃ (50 µM en agua) y 50 µl de EDTA (52 µM en buffer). En otra serie, la solución de EDTA fue reemplazada por el mismo volumen de buffer. Para iniciar la reacción de Fenton se adicionaron 50 µl de H₂O₂ (10 mM en agua) y 50 µl de ácido ascórbico (1.0 mM en buffer). La mezcla se incubó a 37°C durante 60 minutos. Luego se adicionaron 10 µl de BHT (2%, p/v en etanol) para detener la reacción y 500 µl de ácido tiobarbitúrico (1%) disuelto en una solución de ácido tricloroacético (3%, p/v), para detectar el malondialdehído (MDA) producido a partir de la 2-desoxi-D-ribosa por el ataque de los radicales hidroxilos (Ohkawa y col., 1979). Los tubos se incubaron a 100°C durante 20 minutos. La reacción se detuvo transfiriendo los tubos a un baño de hielo. La absorbancia se determinó a 532 nm. El control positivo de reacción (100% MDA) se llevó a cabo reemplazando los extractos por el mismo volumen de buffer. El blanco de reacción se realizó con todos

los reactivos en ausencia de 2-deoxi-D-ribosa. Los resultados se expresaron como valores de CD_{50} en μg EAG/ml.

5.3.4. Actividad inhibitoria de la hemólisis oxidativa

5.3.4.1. Preparación de la suspensión de eritrocitos humanos

Se utilizó sangre humana (5-10 ml) obtenida de individuos adultos sanos. Se aislaron los eritrocitos a partir de sangre conteniendo citrato de sodio por centrifugación a 1100 rpm durante 10 min. Luego de la remoción del plasma (sobrenadante), los eritrocitos fueron lavados tres veces con buffer PBS (pH 7,4) y centrifugados nuevamente a 1100 rpm durante 10 min. Luego del lavado final los mismos fueron resuspendidos en buffer PBS con el fin de obtener una solución al 5% (nivel de hematocrito).

5.3.4.2. Ensayo de inhibición de la hemólisis oxidativa

Con el fin de inducir la cadena de oxidación por radicales libres en los eritrocitos, los radicales peroxilos fueron generados por descomposición térmica del AAPH (2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidroclorato) disuelto en PBS, de acuerdo con Mendes y col. (2011). Para observar los efectos protectores de los extractos hidroalcohólicos contra la hemólisis inducida por el AAPH, se colocó 700 μl de la solución de eritrocitos con las distintas concentraciones de extracto (0,05-0,23 μg EAG/ml). Luego, se agregó 700 μl de la solución de AAPH, y se incubó en shaker durante 1 h a 37°C. Luego de la incubación, la mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 3 min. El nivel de hemólisis se determinó espectrofotométricamente en el sobrenadante a 545 nm en espectrofotómetro (UV2400 PC), donde el porcentaje de hemólisis se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Hemólisis} = A/B \times 100$$

Donde A es la absorbancia del control con AAPH, conteniendo el solvente en el que se diluyen las muestras, y B es la absorbancia de la mezcla de reacción con las muestras. Los resultados se expresaron como valores de CI_{50} en μg EAG/ml.

5.4. Actividad mutagénica. Test de Ames

El ensayo de mutagenicidad se llevó a cabo de acuerdo con Maron y Ames (1983). Se utilizó el método de incorporación directa en placa, usando dos cepas de *Salmonella typhimurium*, TA98 y TA100. Estas cepas presentan mutaciones en los genes implicados en la síntesis de histidina, por lo que necesitan un suministro externo de la misma para su crecimiento. En el ensayo se pone a prueba la capacidad del mutágeno

para revertir esta situación y permitir el crecimiento en un medio pobre en histidina. La cepa TA 98 da información sobre mutaciones por dislocamiento del cuadro de lectura (*frameshift*), mientras que una respuesta positiva de la cepa TA 100 indica sustitución de pares de bases.

Las cepas bacterianas fueron cultivadas en caldo nutritivo Mueller Hinton a 37°C durante 12-14 hs, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. A 2 ml de agar blando, suplementado con 0,5 mM de L-histidina y 0,5 mM de D-biotina, se añadieron diferentes concentraciones de los extractos disueltos en DMSO (entre 125 y 500 µg EAG/placa) y 100 µl de suspensión bacteriana (en fase estacionaria). La mezcla fue luego vertida en la superficie de una placa conteniendo medio agar mínimo (sin histidina). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 hs y las colonias revertantes His⁺ fueron manualmente contadas. En los ensayos fueron incluidos los respectivos controles negativos y positivos. Se realizó un control negativo con DMSO (100 µl/placa) y como control positivo se utilizó el mutágeno directo 4-nitro-O-fenilendiamina, 4-NPD (10 µg/placa). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado en dos experiencias separadas.

Los resultados fueron expresados como N° de revertantes/placa o mediante la relación de mutagenicidad (RM), que es la razón entre el N° de revertantes de la placa de prueba (revertantes inducidos) y el N° de revertantes en la placa control (revertantes espontáneos):

$RM = \text{N}^\circ \text{ de revertantes muestra} / \text{N}^\circ \text{ de revertantes espontáneos}$

A través de esta relación, se puede determinar si los extractos poseen un efecto no mutagénico (índice menor a 1,5), ligeramente mutagénico (1,5-2) o mutagénico (índice mayor a 2).

6. Formulación de fitoterápicos

6.1. Diseño de formulaciones fitoterápicas

6.1.1. Microencapsulación de extractos por *electrospraying*

Se prepararon soluciones de quitosano al 5% (p/v) disolviendo el polisacárido en ácido acético al 80% (v/v) a temperatura ambiente, bajo agitación magnética. Se añadieron los extractos de plantas (10% p/p del contenido total de sólidos) a las soluciones de quitosano y se agitaron hasta disolución completa. Las soluciones finales fueron electropulverizadas siguiendo el procedimiento optimizado por Gómez-Mascaraque y col. (2016a), utilizando un equipo de electrospinning de fabricación casera, equipado

con una fuente de alimentación de 0-30 kV de voltaje variable, a un caudal constante de 0,15 ml/h, un voltaje aplicado de 17 kV y una distancia entre la punta y el colector de la jeringa de 10 cm. Las muestras procesadas se recogieron en una placa de acero inoxidable. El material en polvo seco obtenido se almacenó en un desecador hasta su uso.

6.1.2. Formulación de tabletas vaginales

Se prepararon tabletas exentas de extractos (placebos) y tabletas conteniendo extractos (tanto de los extractos individuales como de las mezclas más activas). La composición de cada tableta fue la siguiente: carbopol 934P (100 mg), hidroxipropilmetilcelulosa (100 mg), carboximetilcelulosa (50 mg), bicarbonato de sodio (15 mg) y ácido cítrico como agente efervescente (5 mg), estearato de magnesio como lubricante (2,5 mg), extracto seco (1,5-10 mg). Las tabletas se comprimieron en una máquina tableteadora de un solo punzón (Fareast, Shanghai, China) con una presión de 14,3 kN.

6.1.3. Formulación de óvulos vaginales

Se prepararon óvulos libres de extractos (placebos) y óvulos conteniendo extractos. Para la elaboración de los mismos, se fundió gelatina en agua a una temperatura de 60°C, y luego se incorporó glicerina (la proporción glicerina:gelatina:agua fue 60:10:30, v:v:v, respectivamente). Se enfrió hasta una temperatura aproximada de 40°C y se añadieron los extractos vegetales (concentración de 5 a 10 CIM por óvulo), homogeneizando suavemente para evitar la formación de burbujas. Se revistieron los moldes utilizados con vaselina y se vertió la preparación en los mismos. Se dejó enfriar en heladera.

6.2. Caracterización de formulados

6.2.1. Eficiencia de carga

Las microcápsulas y las tabletas se maceraron en etanol 60° durante 1 h con aplicación ultrasónica (10 minutos, cinco veces). Luego, cada extracto se centrifugó a 2950 xg durante 5 minutos. Los sobrenadantes fueron recolectados. Se tomaron alícuotas del sobrenadante para la determinación de compuestos fenólicos de acuerdo con Singleton y col. (1999). Los compuestos fenólicos se identificaron mediante HPLC-DAD. El sistema HPLC usado consiste en un sistema de bombas HPLC binarias Waters 1525 con un calentador de columna Serie 1500, una válvula de inyección manual con un bucle de 20 µL (Rheodyne Inc., Cotati, CA), un detector de matriz de fotodiodos Waters 2998 y

una columna Xbridge™ 135 C18 (4,6x150 mm, 5 µm; Waters Corporation, Milford, MA). El sistema de disolventes para la separación de componentes estaba compuesto por disolvente A (ácido acético al 0,1%) y disolvente B (metanol al 0,1%) (condiciones: 10-57% de B de 0 a 45 min y se mantuvo al 100% de B de 45 a 60 min). La velocidad de flujo se estableció en 0,5 ml/ min. Se usó una solución de 2 mg PS/ ml. La recolección de datos se llevó a cabo con el software Empower™ 2. La determinación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo comparando los tiempos de retención y los datos espectrales (220-600 nm) de cada pico con los de los estándares de Sigma-Aldrich (MO, EE. UU.) y Fluka Chemical Corp. (EE. UU.). Los experimentos se realizaron en experimentos independientes y por triplicados.

6.2.2. Evaluación de las propiedades físicas de las tabletas

6.2.2.1. Determinación de dureza

Se midieron el peso, el grosor, el diámetro y la dureza de 10 tabletas de cada formulación. La dureza o resistencia a la tracción (RT) de las tabletas se determinó usando un durómetro (VanKel 200, serie Benchsaver™), (Farmacopea Argentina, 7ma edición). RT se calculó como:

$$RT = 2F / \pi dg$$

donde F es la máxima fuerza de aplastamiento diametral, y d y g son el diámetro y el grosor de la tableta, respectivamente. El RT de cada formulación se midió por triplicado.

6.2.2.2. Tiempo de desintegración (TD)

Se depositó una tableta en cada uno de los 6 tubos de la canastilla de un desintegrador (Equipos Farmacéuticos®, Argentina). Se colocó un disco sobre cada comprimido y se sumergió la canastilla en agua a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Una vez puesto el equipo en funcionamiento, se registró el tiempo necesario para la completa desintegración de las tabletas (Farmacopea Argentina, 7ma edición). El TD se definió como el intervalo requerido para la desaparición completa de las tabletas o sus partículas de la red de la canastilla. La prueba se hizo por triplicado en cada condición de compresión.

6.2.2.3. Ensayo de friabilidad

Se tomó una muestra de 10 tabletas previamente pesadas (M1), y se colocó en el tambor de un friabilizador (Equipos Farmacéuticos®, Argentina), de acuerdo con las

especificaciones de la Farmacopea Argentina, 7ma edición. Se programó el equipo para rotar el tambor 100 veces a 25 rpm. Una vez que el friabilizador finalizó los ciclos, se observó la integridad de las tabletas y se procedió a pesarlas (M2). La prueba se realizó por triplicado en cada condición de compresión. La friabilidad fue determinada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Friabilidad (\%)} = (M1 - M2 / M1) \times 100.$$

6.2.3. Caracterización morfológica de los formulados

La caracterización morfológica de los formulados fitoterápicos se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (Microscopio Hitachi, S-4800). Las muestras fueron recubiertas por pulverización catódica con una mezcla de oro y paladio antes de su análisis. Las distribuciones de tamaño de partícula se obtuvieron a partir de las micrografías MEB de un mínimo de 200 mediciones por imagen en su aumento original utilizando el software FIJI.

6.2.4. Análisis infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR)

Las muestras (aproximadamente 1-2 mg) de los extractos de plantas, así como las microcápsulas y tabletas que contienen los extractos, se dispersaron en aproximadamente 130 mg de KBr de calidad espectroscópica. Luego se formó un sedimento comprimiendo las muestras a 150 MPa. Los espectros FT-IR se recogieron en el modo de transmisión utilizando un equipo FT-IR Tensor 37 de Bruker (Rheinstetten, Alemania). Los espectros se obtuvieron promediando 10 escaneos a una resolución de 1 cm^{-1} .

6.2.5. Evaluación de la capacidad de hinchamiento de los formulados

La capacidad de hinchamiento de los formulados se evaluó midiendo su capacidad de absorción de agua siguiendo el método adaptado de Bigucci y col. (2015). Se colocaron muestras (aproximadamente 25 mg) en trozos circulares de papel de filtro ($d = 50 \text{ mm}$) previamente empapado con el medio de hinchamiento y colocado en un disco de algodón dentro de una placa de Petri conteniendo 5 ml del mismo medio. El medio de hinchamiento estaba compuesto de PBS ajustado con ácido ortofosfórico a pH 4,5 para simular condiciones vaginales. A diferentes intervalos de tiempo, el papel de filtro más los formulados hinchados se pesaron y luego se devolvieron a la misma placa de Petri.

La captación de agua (CA) se calculó usando la ecuación:

$$CA (\%) = (M_t - M_0) / M_t \times 100$$

donde M_0 es la masa inicial de formulados y M_t es la masa de formulados hinchados en el tiempo t . Los experimentos se realizaron en triplicados independientes.

6.2.6. Liberación *in vitro* de extractos desde los formulados

La liberación *in vitro* de los diferentes extractos de plantas desde las micropartículas de quitosano se evaluó siguiendo un método adaptado de Gómez-Mascaraque y col. (2015). Los formulados (0,5 mg de extracto/ ml de medio de liberación) se suspendieron en el mismo tampón de fosfato utilizado para los ensayos de hinchamiento (pH 4,5) y se almacenaron a 37°C (temperatura fisiológica). En diferentes intervalos de tiempo, las dispersiones se centrifugaron a 2.950 xg y 37°C durante 5 minutos usando una centrífuga Eppendorf 5804 R (Hamburgo, Alemania). Se tomaron alícuotas (0,25 ml) del sobrenadante para el análisis de la muestra. El volumen de la alícuota se reemplazó por tampón de liberación reciente. Las alícuotas extraídas se analizaron mediante espectroscopía UV-Vis usando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) midiendo su absorbancia a 280 nm. Las curvas de calibración se obtuvieron previamente para los diferentes extractos en la solución tampón ($R^2L. divaricata = 0.9958$, $R^2L.cuneifolia = 0.9998$, $R^2L.nitida = 0.9996$, $R^2Z.punctata = 0.9997$, $R^2T.andina = 0.9999$). Como los extractos de plantas solo son parcialmente solubles en tampón acuoso, las curvas de calibración correlacionan la absorbancia a 280 nm con la concentración de la fracción soluble extraída de cada extracto de planta en el tampón. Los experimentos se realizaron en experimentos independientes por triplicados.

6.2.7. Liberación de compuestos fenólicos desde los formulados en fluido vaginal sintético

Se desarrolló un medio para simular el fluido producido en la vagina humana. La composición del fluido vaginal simulado (FVS) en g/l fue la siguiente: NaCl, 3,51; KOH, 1,40; $Ca(OH)_2$, 0,222; albúmina de suero bovino, 0,018; ácido láctico, 2,00; ácido acético, 1,00; glicerol, 0,16; urea, 0,4; glucosa, 5,0 (das Neves y col., 2008). La mezcla se ajustó a pH 4,2. Los formulados se mantuvieron a 37 ° C durante 24 h en 9 ml de FVS, ya que las secreciones vaginales diarias se estimaron en un intervalo de 1-11 ml. El contenido liberado de compuestos fenólicos totales se determinó de acuerdo con Singleton y col. (1999) en diferentes intervalos de tiempo. El porcentaje relativo se

calculó considerando como 100% el contenido de compuestos fenólicos de los extractos secos utilizados para el desarrollo de las formulaciones. Los compuestos fenólicos liberados fueron determinados por HPLC-DAD. Los experimentos se realizaron en triplicados independientes.

7. Análisis estadístico

Los resultados son la media de tres determinaciones \pm desviación estándar. Se utilizó el software InfoStat (Student Version, 2011) para determinar el nivel de significación ($p \leq 0.05$) mediante el análisis de la varianza (ANOVA) aplicando el post-test de Tukey con nivel de confianza del 95%.

CAPÍTULO III:

Zuccagnia punctata

1. Introducción

La familia *Fabaceae* tiene una enorme diversidad morfológica, debido al gran número de especies en el mundo que ascienden a más de 18.000 especies (Waterman, 1994). Es una de las tres familias de vegetación autóctona más representativas con taxa de uso medicinal en Argentina (*Asteraceae*, *Fabaceae* y *Solanaceae*). *Zuccagnia punctata* es una especie perteneciente a un género monotípico y endémico de Argentina de la familia Fabaceae.

1.1. *Zuccagnia punctata* Cav.

Sus nombres vulgares son jarilla macho, pus-pus, lata, jarilla pispito, jarilla de la puna (Argentina). Su nombre está dedicado al físico y botánico italiano Attilio Zuccagni (1754-1807). *Z. punctata* junto a especies de *Larrea* constituyen una estepa arbustiva conocida como “jarillal”, conformando matorrales de 1,5 a 2,5 m de altura (Alonso y Desmarchelier, 2005).

1.2. Descripción botánica de *Z. punctata*

Es un arbusto perenne inerme de 1 a 2,5 m de altura (Figura 1), glutinoso, aromático de ramas largas y abundantes, grises o negruzcas. Florece desde agosto a marzo presentando inflorescencias en racimos solitarios, erguidos, laxifloros (Figura 1). Las flores son amarillo-anaranjadas, bisexuales, subzigomorfas, pediceladas (Ulibarri, 2008). Los frutos son capsuliformes, ovoide-agudos, indehiscentes, coriáceos, oblicuos, comprimidos y estipitados. Sus semillas son ovoides, comprimidas, castañas. Esta especie fructifica de noviembre a abril (Mercado y col., 2013).

1.3. Distribución geográfica y hábitat de *Z. punctata*

Zuccagnia punctata es una especie característica de la flora xerófila de la Provincia Biogeográfica del Monte (Cabrera, 1976; Zuloaga y Morrone, 1999; Ulibarri, 2008), Figura 1. Esta especie está distribuida en regiones áridas y semiáridas de la zona occidental de Argentina (Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza y San Luis) desde los 700 a 2700 msnm. Esta especie se encuentra en la lista roja preliminar de plantas endémicas de la Argentina (Categoría 3), Norma RE-84-2010-SADS (PlanEAR).

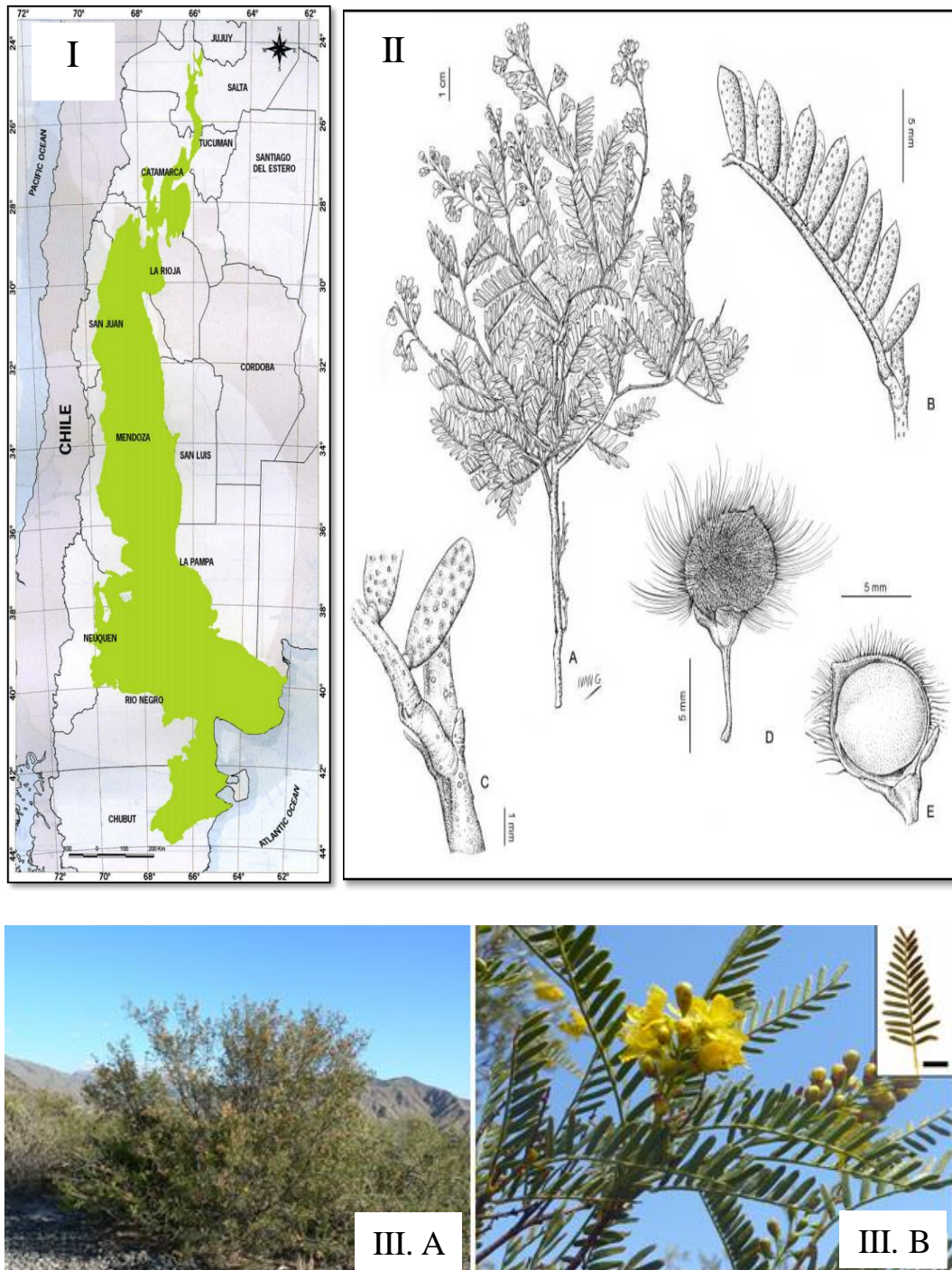


Figura 1. *Zuccagnia punctata*: **I.** Región de distribución. **II.** **A.** Rama en flor. **B.** Hoja. **C.** Detalle de base de la hoja. **D.** Fruto. **E.** Corte del fruto. Tomado de Ulibarri (1994). **III.** **A.** Fotografía tomada durante la recolección de la muestra en Amaicha del Valle, Tucumán. **B.** Detalle de partes aéreas. Barra de escala= 1 cm.

1.4. Usos populares

Las infusiones y decocciones, así como los extractos preparados por maceración en etanol de partes aéreas de *Z. punctata* (con o sin flores o frutos) se han utilizado ampliamente en medicina tradicional en Argentina como antiséptico para pies y rubefaciente y para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas, asma, artritis, reumatismo, inflamación y tumores (Ratera y Ratera, 1980; Toursarkissian, 1980; Ortega y col., 2000). Los tallos se utilizan para la construcción de techos de casas (Ulibarri, 2005), también se utilizan para teñir lana de tonos plomizos (Burkart, 1952; Ratera y Ratera, 1980; Toursarkissian, 1980; Del Vitto y col., 1997; Barboza y col., 2009). La resina de las hojas se utilizaba en el ritual de momificación y preservación de antepasados fallecidos (Instituto de Antropología, UNLaR).

1.5. Composición química y actividades biológicas

Los primeros estudios fitoquímicos se realizaron en extractos metanólicos de partes aéreas de *Z. punctata* (hojas y ramas), y resultaron en el aislamiento de dos chalconas, 2', 4'-dihidroxichalcona (DHC) y 2', 4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (DHMC) y dos flavanonas, 7-hidroxiflavanona (7HF) y 7-hidroxi-8-metoxiflavanona (3,7-DHF) (Pederiva y col., 1975; Pederiva y Giordano, 1984; Ortega y col., 2000; Zampini y col., 2005; Morán Vieyra y col., 2009; Agüero y col., 2010; Nuño y col., 2014). Posteriores estudios permitieron el aislamiento de flavanoles (izalpina, galangina, ramnocitrina), flavonas (3,7-dihydroxiflavona, 3,7-dihidroxi-8-metoxiflavona), flavanonas (pinocembrina, pinostrobinina) y ésteres de ácido cafeico (1-metil-3-(4'-hidroxifenil)-propil cafeato, 1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)-propil cafeato) (Pederiva y Giordano, 1984; Svetaz y col., 2004; Agüero y col., 2010). Jimenez y col. (2014), informaron el aislamiento de una nueva chalcona, 2,6-dihidroxi-4-metoxichalcona a partir de partes aéreas de la planta.

El extracto hidroetanólico de las partes aéreas de *Z. punctata* presentó actividad contra bacterias Gram-negativas multirresistentes a antibióticos aisladas de lesiones humanas, tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Zampini y col., 2005). 2',4'-dihidroxichalcona exhibió fuerte actividad antibacteriana frente a *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *M. morganii*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* (Zampini y col., 2005). El extracto de *Z. punctata* y tres compuestos principales aislados

de la misma (7-hidroxi-flavanona, 2',4'-dihidroxi-chalcona y 3,7-dihidroxi-flavona) también fueron activos contra bacterias Gram-positivas (Zampini y col., 2012).

Se reportó el efecto de *Z. punctata* frente a levaduras patógenas humanas (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Cryptococcus neoforms*) (Svetaz y col., 2007; Svetaz y col., 2010; Agüero y col., 2011). La actividad antifúngica se atribuyó a DHC (Svetaz y col., 2007; Agüero y col., 2011; Nuño y col., 2014, 2015). Butassi y col. (2015; 2018) han reportado el efecto sinérgico del extracto diclorometánico de *Z. punctata* y el extracto diclorometánico de *Larrea nitida* sobre el crecimiento de *C. albicans* y *C. glabrata*. Nuño y col. (2014) demostraron que los extractos diclorometánicos de *Z. punctata* y las chalconas aisladas a partir de los mismos son eficaces como inhibidores del crecimiento de *Candida* y de formación de biofilm. Se demostró además una actividad muy fuerte de los extractos polifenólicos de *Z. punctata* sobre hongos dermatófitos aislados comúnmente de infecciones cutáneas (*Microsporum gypseum*, *Tricophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*), lo cual se atribuyó a las chalconas DHC y DHMC (Svetaz y col., 2007; Agüero y col., 2010; Svetaz y col., 2010). Álvarez y col. (2012) han demostrado que los aceites esenciales obtenidos de *Z. punctata* también muestran actividad antifúngica frente a los dermatófitos *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

Varios autores han informado de la actividad del extracto de *Z. punctata* contra el crecimiento de hongos que destruyen la madera como *Lenzites elegans*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus* y *Ganoderma applanatum*, y hongos patógenos de plantas tales como *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Colleotrichum truncatum*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum* sensu stricto, *F. boothii*, *F. meridionale*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *Penicillium notatum* y *Phomopsis longicolla* (Quiroga y col., 2001; Svetaz y col., 2004; Agüero y col., 2010; Jimenez y col., 2014). Los principales compuestos con actividad en estos hongos fitopatógenos fueron identificados como chalconas (DHC y DHMC), 7-HF y 1-metil-3-(4-hidroxifenil)-propil cafeato (Svetaz y col., 2004; Agüero y col., 2010; Jimenez y col., 2014).

Se ha demostrado la capacidad antioxidante de los extractos hidroetanólicos e infusiones de *Z. punctata* (Nuño y col., 2015; Carabajal y col., 2017). Avila y col. (2001) y Morán Vieyra y col. (2009) informaron sobre las propiedades antioxidantes y mecanismos de tres flavonoides estructuralmente relacionados aislados de *Z. punctata*, 7-HF, DHC y 3,7-DHF.

Por otra parte, se demostró el efecto de chalconas aislados de las partes aéreas de *Z. punctata* sobre la enzima COX-2 (Alberto y col., 2007). Varias chalconas sintéticas demostraron ser activas hacia uno o más mediadores inflamatorios (Batovska y Todorova, 2010).

DHC aislada de *Z. punctata* mostró un efecto antihelmíntico y alteración de los procesos de incubación de huevos y larvas de *Caenorhabditis elegans* (D'Almeida y col., 2015).

Se demostró que los extractos hidroetanólicos de *Z. punctata*, 3,7-DHF y, en menor grado, DHC, fueron capaces de inhibir factores de resistencia a quimioterápicos tales como las bombas de eflujo (Chieli y col., 2012).

Otros autores demostraron que el extracto de *Z. punctata* no presenta efecto genotóxico sobre células de hepatoma humano (HepG2) y protege al ADN contra el daño inducido por la acción directa del compuesto genotóxico 4-nitroquinolina (4-NQO), y que esta capacidad protectora podría estar relacionada a la presencia de 2',4'-dihidroxichalcona en el extracto (Zampini y col., 2008).

Se analizaron los posibles efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos del extracto de *Z. punctata* en ratones con y sin infecciones estreptocócicas. Se demostró que la ingesta de una o dos veces al día de 1 mg de extracto de planta durante siete días no resulta tóxica (Zampini y col., 2012). Por otro lado, se estudió el efecto del extracto seco de *Z. punctata* y los flavonoides aislados del mismo sobre la reactividad vascular en aortas de conejos normales y sometidos a dietas hipercolesterolemica demostrando que puede mejorar la disfunción endotelial. Se demostró que el extracto seco de *Z. punctata*, así como sus flavonoides aislados, tienen efecto vasodilatador, respuesta a acetilcolina y son potentes inhibidores de la vasoconstricción inducida por la estimulación de los receptores de fenilefrina y angiotensina II en condiciones de hipercolesterolemia. Considerando sus propiedades como antagonista competitivo de la angiotensina II, podría utilizarse para bajar la presión arterial en pacientes con hipertensión leve, así como en los pacientes que tienen efectos secundarios adversos para antihipertensivo comerciales (Roco y col., 2017). La administración oral de *Z. punctata* mejora el perfil de lípidos, reduce el estrés oxidativo y normaliza la función vascular en conejos hipercolesterolémicos (Roco y col., 2018).

Objetivo general: El objetivo de esta investigación es evaluar el potencial uso de extractos hidroalcohólicos de *Zuccagnia punctata* en candidiasis vulvovaginal como antimicótico, antioxidante y antiinflamatorio.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar la materia prima (partes aéreas de *Z. punctata*) desde el punto de vista morfoanatómico.
2. Obtener un extracto hidroalcohólico a partir de partes aéreas de la especie y estandarizarlo desde el punto de vista químico.
3. Evaluar el efecto del extracto estandarizado sobre el crecimiento de especies de *Candida* aisladas de infecciones vaginales.
4. Evaluar el efecto del extracto estandarizado sobre el crecimiento de *Lactobacillus* spp. aislados de microbiota vaginal normal.
5. Evaluar la capacidad de extractos estandarizados de controlar los procesos oxidativos e inflamatorios asociados a la candidiasis vaginal.

2. Resultados y discusión

2.1. Caracterización morfoanatómica de *Z. punctata*

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud la descripción macroscópica y de los parámetros micrográficos cualitativos y cuantitativos de una especie vegetal es el primer paso para establecer la identidad botánica y el grado de pureza de una planta medicinal y debería ser llevado a cabo en etapas tempranas de la investigación sobre la misma.

Estos estudios permiten realizar el control de calidad de muestras simples y mezclas, pudiendo determinar la adulteración con otras especies. De allí que se analizaron los caracteres diagnósticos macroscópicos y microscópicos de las partes aéreas de *Z. punctata*, para su posterior uso en controles de calidad de la materia prima a utilizar en el desarrollo de productos fitoterápicos.

Caracteres macroscópicos

Z. punctata tiene hojas pseudo-paripinnadas (Figura 1) con folíolos subópticos, nanófilos con ápice acuminado, base redondeada y margen completo (Lersten y Curtis, 1996; Mercado y col., 2013).

Caracteres microscópicos

Ambas superficies epidérmicas de las valvas y los raquis presentan células epidérmicas con paredes anticlinales rectas, cutícula gruesa, estomas ciclocíticos, tricomas capitados

hundidos glandulares ubicados en criptas y tricomas unicelulares no glandulares dispuestos en los márgenes (Figuras 2A-F y 3A) (Lersten y Curtis, 1996; Álvarez y col., 2012; Mercado y col., 2013). En el corte, los folíolos son isolaterales y anfistomáticos (Figuras 2E y 3A). La vena media presenta un haz vascular colateral con capas esclerenquimatosas en el floema (Figura 3A). Los idioblastos que contienen drusas en el mesófilo son abundantes (Figura 3A).

2.2. Caracterización fitoquímica de un extracto hidroalcohólico de *Z. punctata*

2.2.1. Determinación cualitativa de fitoquímicos

A partir del extracto hidroalcohólico de *Z. punctata* preparado de acuerdo con lo que se describe en Materiales y Métodos se obtuvo un rendimiento de extracto seco de $38,5 \pm 2,1$ (% g ES/100 g material vegetal seco).

Debido a la gran variedad de sustancias bioactivas presentes en las plantas, el extracto hidroalcohólico se sometió a un tamizaje fitoquímico a fin de tener un panorama general de la composición química del mismo. El análisis del perfil fitoquímico cualitativo del extracto de *Z. punctata* permitió la detección de taninos, flavonoides, triterpenos y/o esteroides, para los cuales se evidenciaron reacciones de reconocimiento fuertemente positivas. Se obtuvieron resultados negativos para saponinas, alcaloides, glucósidos cardiotónicos, cumarinas y derivados antracénicos libres.

2.2.2. Determinación cuantitativa de fitoquímicos

El extracto presentó un alto contenido de compuestos fenólicos totales ($354,70 \pm 2,7$ mg EAG/g PS) superior al reportado para extractos etánolicos de *Z. punctata* por Zampini y col. (2012) (54 mg EAG/g PS) y para extractos diclorometánicos por Nuño y col. (2015) (170 mg EAG/g PS). Los niveles de fenólicos no flavonoides ($128,91 \pm 12,6$ mg EAG/g PS) fueron similares a los informados por Nuño y col. (2015) (145 mg EAG/g PS). Se calculó el contenido de compuestos fenólicos flavonoides por diferencia entre los anteriores y se encontró que los niveles de fenólicos flavonoides son superiores ($225,79 \pm 15,3$ mg EAG/g PS) a los no flavonoides, indicando la riqueza del extracto analizado en flavonoides. Los niveles de taninos condensados ($135,24 \pm 7,0$ mg EPB2/g PS) y taninos hidrolizables ($6,61 \pm 0,6$ mg EAG/g PS) revelan que esta especie está enriquecida en este tipo de compuestos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición fitoquímica de los extractos hidroalcohólicos de *Z. punctata*

Contenido de fitoquímicos	<i>Z. punctata</i>
Fenólicos totales libres (mg EAG/g PS)	354,70±2,70
Fenólicos no flavonoides (mg EAG/g PS)	128,91±12,60
Fenólicos flavonoides (mg EAG/g PS)	225,79±15,30
Flavonas y flavanonas (mg EQ/g PS)	74,93±4,23
Taninos condensados (mg EPB2/g PS)	135,24±7,00
Taninos hidrolizables (mg EAG/g PS)	6,61±0,60
Rendimiento (% g ES /100 g material vegetal seco)	38,50±2,10

EAG: equivalentes de ácido gálico, EQ: equivalentes de quercetina, EPB2: equivalentes de procianidina B2, PS: peso del extracto seco, ES: extracto seco. Los valores se reportan como media ± desviación estándar de triplicados.

2.2.3. Perfil cromatográfico

2.2.3.1. Cromatografía en capa fina

Los análisis cromatográficos en placas de sílica gel (Figura 4), revelaron la presencia de diferentes tipos de compuestos fenólicos, compuestos flavonoides (bandas verde-anaranjadas), chalconas (bandas negras) y ácidos fenólicos y/o cumarinas (bandas azules), que fueron activas al UV. No se detectó la presencia de alcaloides.

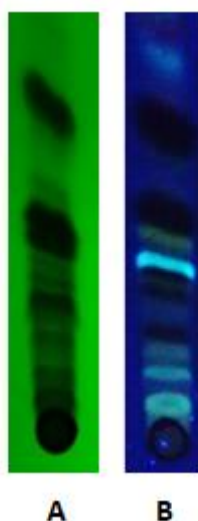


Figura 4. Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de *Z. punctata*. **A.** Placa visualizada a la luz ultravioleta de 254 nm. **B.** Placa revelada con NP y visualizada a la luz ultravioleta de 365 nm.

2.2.3.2. HPLC-ESI-MS/MS

El análisis de HPLC-ESI-MS/MS del extracto de *Z. punctata* (Figura 5) permitió la identificación de 23 compuestos, incluyendo cinco taninos condensados (catequina; dos

dímeros de catequina; trímero de catequina; dímero de galato de catequina), siete glucósidos flavonoides (quercetin rutinósido; galato de quercetin rutinósido; quercetin hexósido; galato de quercetin hexósido; derivado de quercetina; naringenina rutinósido; galangina di-ramnósido), un flavonoide (pinocembrina), siete derivados de ácido fenólico (ácido quínico; ácido galoilquínico; ácido digaloilquínico; 1-metil-3-(3', 4'-dihidroxifenil)-propil-cafeato; 1-metil-3-(4'-hidroxifenil)-propil-cafeato; 1-metil-3-(3', 4'-dihidroxifenil)-propil-cumarato y 1-metil-3-fenil propil cafeato) y tres chalconas (hexósido de trihidroxi dihidrochalcona; 2', 4'-dihidroxi dihidrochalcona; 2', 4'-dihidroxi chalcona) (Figura 5, Tabla 2). Otros autores demostraron la presencia de 2', 4'-dihidroxi chalcona y 2', 4'-dihidroxi-3'-metoxi chalcona, así como la presencia de dihidrochalconas, tales como la 2', 4'-dihidroxi dihidrochalcona, y 4'-hidroxi-2'-metoxidihidrochalcona (Solorzano y col., 2017). Se encontraron dos dihidro chalconas, una que ya fue reportada en *Z. punctata* (Solorzano y col., 2017), y la otra, el hexósido de trihidroxi dihidrochalcona, que se reporta por primera vez para la especie en este trabajo de Tesis. En la familia Fabaceae se han identificado numerosas dihidrochalconas simples hidroxiladas y metoxiladas así como O y C glicósidos de dihidrochalconas (Riviere, 2016). Se han demostrado numerosas bioactividades para estos compuestos, tales como antioxidante, antiinflamatoria, inhibidora de glicosidasa, hepatoprotectora, entre otras (Riviere, 2016). La floridzina, un glicósido de dihidrochalcona ampliamente distribuido en el reino vegetal, actúa como un potente hipoglucemiante y como un fitoestrógeno (Riviere, 2016). La naringenin dihidrochalcona y la neohesperidin chalcona son potentes endulzantes con una potencia 20 veces superior a la sacarina en la misma concentración (Eichenberger y col., 2017). Por otro lado, si bien se informaron en trabajos previos la presencia de chalconas, dihidrochalconas, flavonas, flavanonas y derivados del ácido cafeico esta es la primera vez que se informa la presencia de taninos condensados, derivados galoil quínicos y glicósidos de quercetina en extractos hidroalcohólicos de *Z. punctata*. Es relevante señalar que el ácido quínico y sus derivados poseen actividades de radioprotección, anti-neuroinflamatoria, antiinflamatoria, y antimicrobiana (Ozçelik y col., 2011; Jang y col., 2017) y que las catequinas poseen fuerte actividad antioxidante, antimutagénica, antidiabética, antibacteriana, antiviral, antienviejecimiento y antiinflamatoria (Aree y Jongrungruangchok, 2016; Grzesik y col., 2018).

En la Figura 6 se muestra la estructura química de algunos compuestos identificados en el extracto de *Z. punctata*.

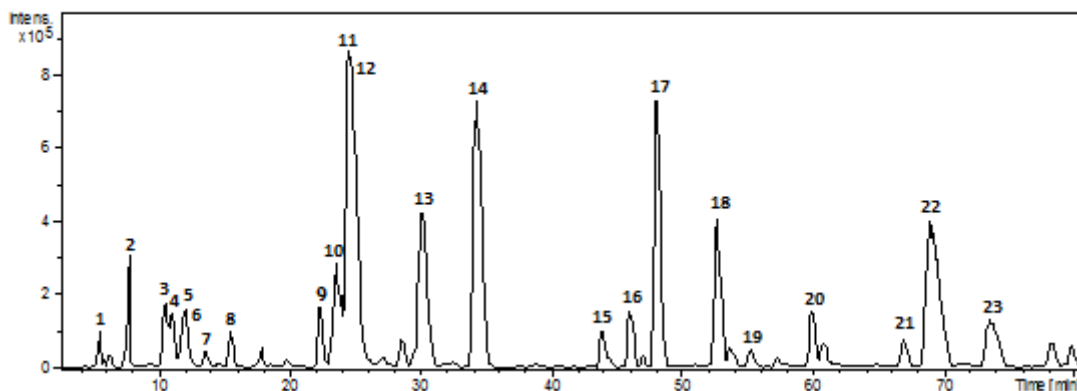


Figura 5. Cromatograma de HPLC-MS de *Z. punctata*. Identificación de compuestos. 1: ácido quínico; 2: ácido galoilquínico; 3: dímero de catequina; 4: ácido digaloilquínico; 5: dímero de catequina; 6: trímero de catequina; 7: catequina; 8: catequina dímero galato; 9: Q-rutinósido; 10: galactato de rutinósido Q; 11: Q-hexósido; 12: galato de Q-hexósido; 13: derivado de Q; 14: hexósido de trihidroxi dihidrochalcona; 15: naringenina rutinósido; 16: galangina diramnósido; 17: 1-metil-3-(3', 4'-dihidroxifenil)-propil cafeato; 18: 1-metil-3-(4'-hidroxifenil)-propil cafeato; 19: pinocembrina; 20: 1-metil-3-(3', 4'-dihidroxifenil)-propil cumarato; 21: 2', 4'- dihidroxidihidrochalcona; 22: 2', 4'-dihidroxichalcona; 23: 1-metil-3-(fenil)-propil cafeato. Q: quercetina.

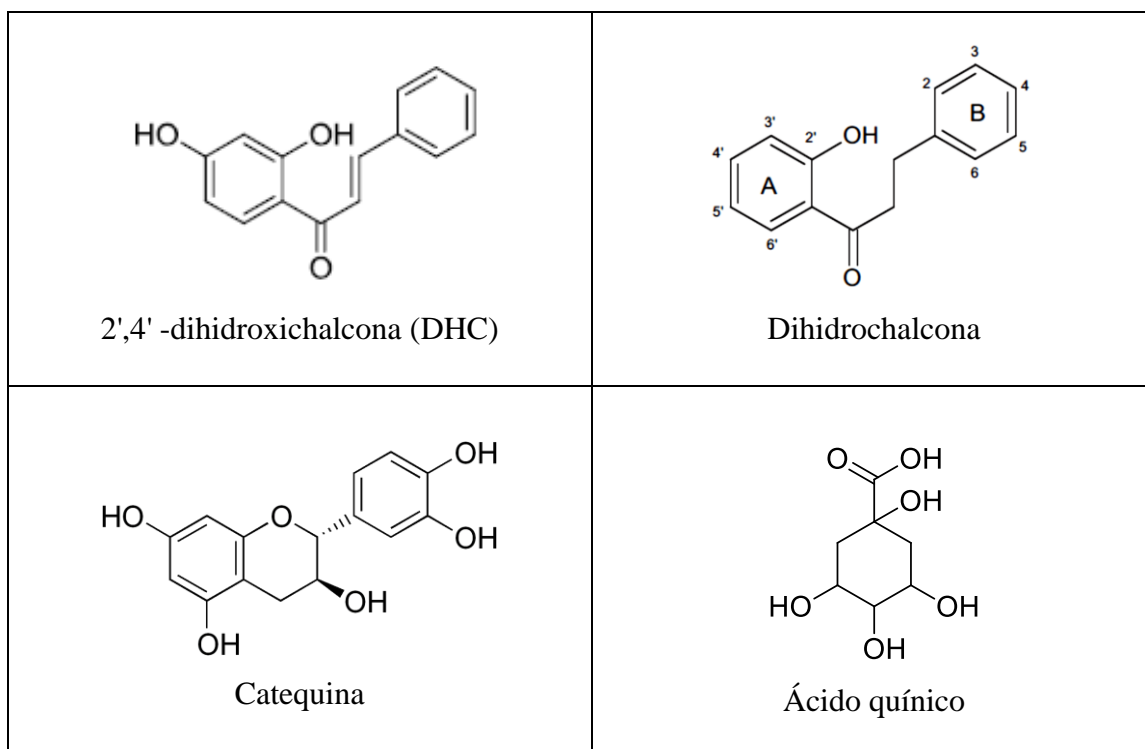


Figura 6. Estructura química de algunos de los compuestos identificados en el extracto de *Z. punctata*.

Tabla 2. Identificación de compuestos del extracto de *Z. punctata* por HPLC-ESI-MS/MS en el modo de ion negativo.

Compuesto	Tr(min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Identificación
1	5,7	191	172(80), 126(100), 110(44), 92(86), 84(92)	Ácido quínico
2	7,9	343	191(100)	Ácido galoilquínico
3	10,6	577	559(24), 451(73), 425(100), 407(19), 289(16)	Dímero de catequina
4	11,2	495	343(100), 191(6)	Ácido digaloilquínico
5	12,0	577	559(19), 451(70), 425(100), 407(14), 289(8)	Dímero de catequina
6	12,3	865	739(26), 713(26), 695(68), 577(100)	Trímero de catequina
7	13,8	289	245(100)	Catequina
8	15,5-15,8	729	577(100)	Dímero de galato de catequina
9	22,4	609	301(100)	Quercetina rutinósido
10	23,7	761	609(18), 459(18), 301(100)	Quercetina rutinósido galato
11	23,9	463	301(100)	Quercetina hexósido
12	24,5-25,7	615	301(100)	Quercetina hexósido galato
13	30,0-31,1	585	301	Derivado de quercetina
14	34,0-35,0	419	257(31), 239(66), 213(100)	Trihidroxi dihidrochalcona hexósido
15	44,0	579	271(100)	Naringenina rutinósido
16	46,0-46,4	561	269 (100), 213	Galangina diramnósido
17	47,9-48,5	343	179(100)	1-Metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)-propil cafeato
18	52,6-53,2	327	179(100), 135(14)	1-Metil-3-(4'-hidroxifenil)-propil cafeato
19	55,3	255	227(23), 213 (29), 211(31)	Pinocembrina
20	59,8	311	163(100)	1-Metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)-propil cumarato
21	66,8	241	197(42), 149(48), 109(33)	2',4'-Dihidroxi dihidrochalcona
22	68,5-70,2	239	197(92), 153(10), 135(26)	2',4'-Dihidroxi chalcona
23	73,0-73,9	311	179(100), 135(4)	1-Metil-3-(fenil)-propil cafeato

2.2.4. Análisis fitoquímico del lavado foliar

El área foliar de *Z. punctata* fue $9,01 \pm 0,1 \text{ cm}^2$ / hoja y el contenido de ceras cuticulares fue $88 \mu\text{g/cm}^2$. En la cera foliar de *Z. punctata*, los principales constituyentes alcanos fueron n-heptacosano (C27), n-nonacosano (C29) y n-hentriacosano (C31). El contenido de compuestos polifenólicos totales en la superficie foliar fue de $177 \pm 13 \mu\text{g EAG/cm}^2$. El análisis del lavado foliar por cromatografía en capa fina mostró un patrón flavonoide significativo; reveló la presencia de dos bandas principales con valores de R_f coincidentes con los estándares comerciales de chalconas (DHC). Se confirmó la presencia de ácido cinámico (C1) y DHC (C2) mediante HPLC-DAD, coinyección de compuestos de referencia y $^1\text{H RMN}$ (datos no mostrados). El contenido de DHC fue de $99,25 \mu\text{g DHC/cm}^2$.

2.3. Localización histoquímica de chalconas en tejidos de *Z. punctata*

Sobre la base de los resultados previos (Mercado y col., 2013), los preparados frescos de *Z. punctata* se sometieron a estudios de histolocalización de compuestos polifenólicos (flavonoides y chalconas). El reactivo de Neu, un reactivo estándar para fenoles, forma complejos con compuestos fenólicos que luego emiten una fluorescencia específica. Durante la inmersión de las secciones transversales, este reactivo que contiene metanol disuelve la clorofila y elimina casi por completo su fluorescencia roja, lo que permite una mejor localización *in situ* de flavonoides por la fluorescencia amarillenta específica que emiten bajo luz ultravioleta.

En los folíolos de *Z. punctata*, se observó fluorescencia amarillenta intensa en la cutícula indicando una alta concentración de flavonoides y baja fluorescencia en células del parénquima en empalizada, tricomas glandulares, paredes de los vasos xilemáticos y en las paredes de la cubierta de células esclerenquimáticas (Fig. 3C y D). El espectro obtenido por espectrometría por dispersión de energía de rayos X de la superficie de la hoja fresca mostró la presencia de 70% C y 20% O y se encontró una proporción similar en la chalcona comercial, sugiriendo la naturaleza química de los productos depositados en la superficie de la hoja (Fig. 2G-H).

En nuestras condiciones de ensayo, después del lavado foliar con cloroformo, en la capa epidérmica se observaron disminuciones de la fluorescencia bajo luz UV y del espesor de la capa de la cutícula, mientras que la fluorescencia amarillenta permaneció en los tricomas glandulares (Fig. 3D-F). Esta observación indica que un alto nivel de chalconas se acumula en la superficie foliar de *Z. punctata*.

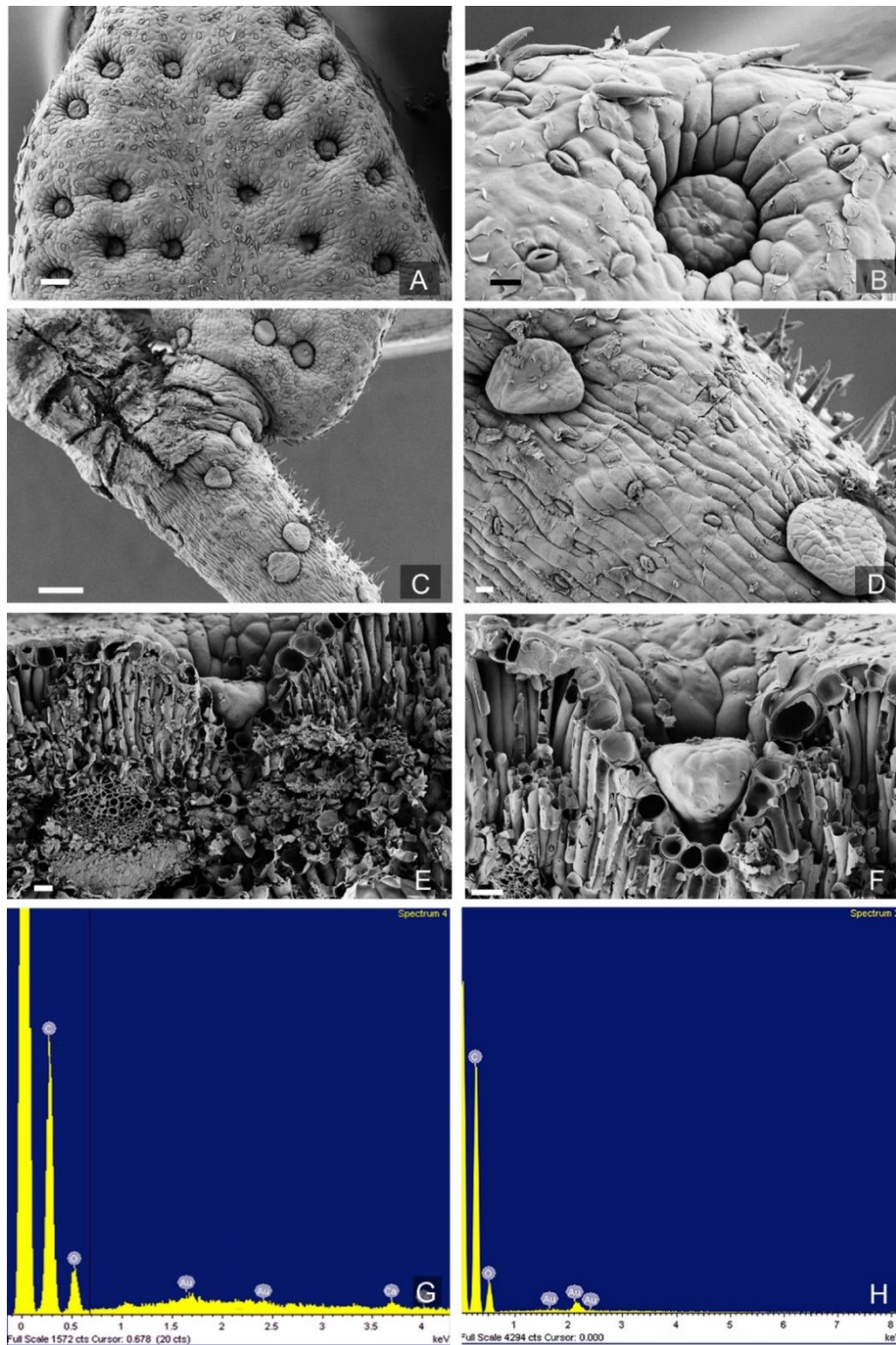


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido de *Z. punctata*. **A y B.** Superficie del folíolo con estomas cicloclíticos, tricomas glandulares capitados hundidos y tricomas unicelulares no glandulares dispuestos en los márgenes. **C y D.** Superficie del raquis mostrando estomas, tricomas no glandulares y tricomas glandulares capitados. **E.** Corte transversal del folíolo. **F.** Detalles del corte transversal de la hoja, tricoma glandular capitado hundido y cutícula gruesa. Barras de escala A=100 μ m; B, D-F=20 μ m y C=200 μ m. **G.** Espectros de dispersión de energía de rayos X de la superficie del folíolo. **H.** Espectros de dispersión de energía de rayos X de polvo puro de 2',4'-dihidroxichalcona.

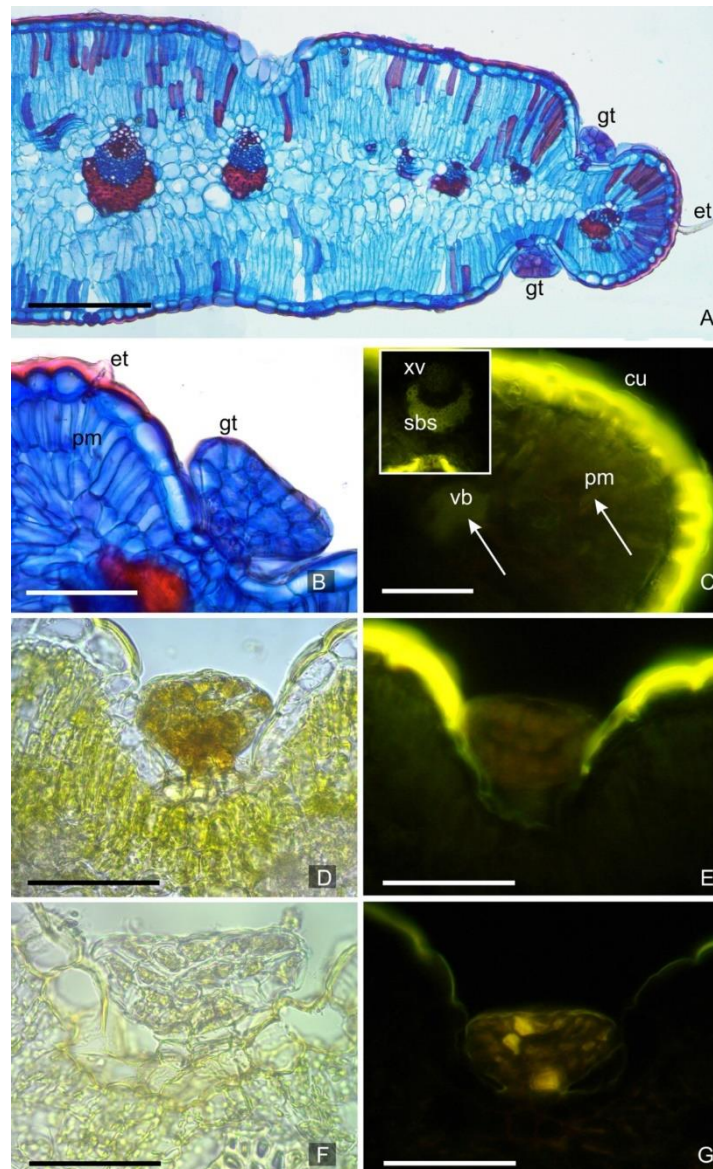


Figura 3. Localización histoquímica de flavonoides de folíolos de *Z. punctata*. **A.** Aspecto general del transcorte de folíolo mostrando tricomas glandulares (gt) y eglandulares (et) y el mesófilo en empalizada (pm) mediante técnicas de anatomía convencionales con azul-safranina. **B, C y D.** Folíolos antes de lavados foliares. **B.** Tejidos de folíolos tratados con el reactivo de Neu y observados bajo luz UV; nótese la fluorescencia intensa en la cutícula (cu) y la fluorescencia débil en el mesófilo en empalizada (flecha, pm) y los haces vasculares (flecha, vb). El recuadro muestra detalles del haz vascular; la fluorescencia amarillenta brillante de las paredes de la cubierta de células esclerenquimáticas (sbs) y las paredes del vaso del xilema (xv) es atribuible a los flavonoides unidos a las paredes celulares. **C.** material fresco; tricoma glandular observado bajo microscopio de luz. **D.** Tejidos teñidos con el reactivo de Neu observado bajo luz ultravioleta; nótese que la fluorescencia del tricoma glandular es secundaria, enmascarada por el brillo de la cutícula. **E y F.** Folíolo después de lavados foliares: **E.** Tricoma glandular fresco observado bajo microscopía de luz. **F.** Tejidos del folíolo tratados con el reactivo de Neu y observados con luz ultravioleta, nótese la fluorescencia en las células del tricoma glandular y la disminución evidente en la fluorescencia. Barras de escala=100 μ m. Filtro UV-1A: filtro de excitación de 365 nm, filtro de barrera de 400 nm.

2.4. Actividades biológicas del extracto de *Z. punctata*

2.4.1. Actividad antifúngica

Trabajos previos indican que extractos de *Z. punctata* de mayor graduación alcohólica que el estudiado en este trabajo y extractos diclorometánicos son activos frente a levaduras patógenas humanas (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Cryptococcus neoforms*) (Svetaz y col., 2007, 2010; Agüero y col., 2011; Nuño y col., 2014), sobre hongos dermatofitos aislados comúnmente de infecciones cutáneas (*Microsporium gypseum*, *Tricophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*) (Svetaz y col., 2007; Agüero y col., 2010; Svetaz y col., 2010), sobre hongos que destruyen la madera como *Lenzites elegans*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus* y *Ganoderma applanatum*, y sobre hongos patógenos de plantas tales como *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Colleotrichum truncatum*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum* sensu stricto, *F. boothii*, *F. meridionale*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *Penicillium notatum* y *Phomopsis longicolla* (Quiroga y col., 2001; Svetaz y col., 2004; Agüero y col., 2010; Jimenez y col., 2014). En vista del objetivo planteado en esta Tesis Doctoral de bioprospectar especies vegetales que sean potencialmente útiles para controlar infecciones vaginales, y dado los antecedentes de actividad antifúngica de *Z. punctata*, decidimos ensayar el efecto del extracto hidroalcohólico estandarizado químicamente frente a aislamientos clínicos de *Candida* obtenidos a partir de infecciones vaginales.

2.4.1.1. Determinación cualitativa. Ensayo bioautográfico en cromatografía en capa fina

La actividad del extracto de *Z. punctata* frente a *C. albicans* se reveló mediante un análisis bioautográfico. Se observó que el extracto en siembra puntual de 100 µg EAG (sin desarrollar en un sistema cromatográfico) inhibe el crecimiento de *Candida*, lo que demuestra la actividad antifúngica del fitocomplejo (Figura 7). El análisis bioautográfico del extracto desarrollado en cromatografía de capa fina reveló la presencia de más de un compuesto con actividad antifúngica (Figura 7). Las bandas de inhibición del crecimiento presentaron valores de Rf coincidentes con los valores de Rf de los compuestos determinados en el perfil cromatográfico por HPLC-DAD, 2', 4'-dihidroxichalcona y otros compuestos fenólicos no identificados en la cromatografía en capa fina.

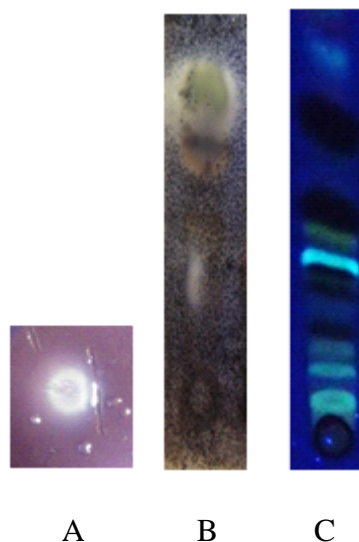


Figura 7. Ensayo bioautográfico del extracto de *Z. punctata* frente a *C. albicans*: **A.** Siembra puntual de 100 µg EAG en placas de sílica gel F254. **B.** Extracto de *Z. punctata* desarrollado en un sistema cromatográfico en placas de sílica gel F254 utilizando tolueno/acetona/cloroformo (4,5:3,5:2,5; v/v/v). En ambos casos las placas fueron inoculadas con *C. albicans*, incubadas a 37°C y reveladas con una sal de tetrazolium (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium) para determinar la viabilidad celular. **C.** Extracto etanólico desarrollado igual que en (B), revelado con NP y visualizado con luz ultravioleta de 365 nm.

2.4.1.2. Determinación cuantitativa de la actividad antifúngica

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos bioautográficos se decidió cuantificar el efecto del extracto sobre un mayor número de cepas. La actividad antifúngica del extracto se evaluó siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo II, apartado 5.1. Se realizaron ensayos *in vitro* utilizando 10 cepas obtenidas a partir de exudados vaginales de pacientes con infección vaginal causada por levaduras. Se incluyeron tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, tres cepas de *C. albicans*, tres de *C. glabrata* y una cepa de *C. tropicalis*. Algunas cepas de *S. cerevisiae* y *C. albicans* y no *albicans* resultaron susceptibles a azoles como el fluconazol, voriconazol, itraconazol (85%) y otras resultaron resistentes (R) (15%). Las especies de *Candida* y *S. cerevisiae* también fueron susceptibles a la nistatina y a la anfotericina B (Tabla 3).

En los ensayos de microdilución, el extracto de *Z. punctata* demostró ser eficaz contra las especies de levaduras ensayadas. Los valores de CIM₅₀ se encontraron alrededor de 12,5 µg EAG/ml en todos los casos, excepto para *C. krusei*, que presentó un valor de 25 µg EAG/ml. Los valores de CIM₉₀ se encontraron en un rango de concentraciones de 25 a 100 µg EAG/ml (Tabla 3). La actividad del extracto se examinó en términos de concentración fungicida mínima (CFM), para determinar si los resultados de

susceptibilidad antifúngica se correlacionaban con su capacidad de matar al 99,9% de los microorganismos. Para todos los aislamientos, los valores de CFM fueron superiores a los valores de CIM₉₀ (Tabla 3). Los valores de CIM y CFM obtenidos fueron inferiores a los reportados por Nuño y col. (2014) para un extracto diclorometánico de *Z. punctata*, donde se informaron valores de CIM correspondientes a 400 µg/ml y valores de CFM entre 400 y 1200 µg/ml frente a cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parasilopsis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. albicans* ATCC 10231. Svetaz y col. (2007) informaron valores de CIM de 62,5 µg/ml frente a *C. albicans* y *S. cerevisiae*, obtenidos al utilizar un extracto diclorometánico de *Z. punctata*.

Por otro lado, al realizar los ensayos de macrodilución frente a lactobacilos, el extracto de *Z. punctata* demostró inhibición del crecimiento de *L. casei* CRL1267, *L. paracasei* CRL1291 y *L. johnsonii* CRL1292, con valores de CIM superiores a los obtenidos frente a las cepas de *Candida* y *S. cerevisiae* (>100 µg EAG/ml), con lo cual, en principio el extracto de *Z. punctata* no afectaría la viabilidad de la microbiota bacteriana en el rango de concentraciones necesarias para inhibir a las levaduras.

El extracto de *Z. punctata* mostró una potencia similar o mayor en comparación con extractos acuosos e hidroalcohólicos de la misma y otras especies de plantas xerófitas recolectadas en ambientes áridos del noroeste de Argentina contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Zampini y col., 2005, 2009, 2012).

La actividad antifúngica del extracto se podría atribuir principalmente a la presencia de 2', 4'-dihidroxichalcona (Quiroga y col., 2001; Svetaz y col., 2007; Svetaz y col., 2010; Agüero y col., 2011). La actividad antifúngica de la chalcona se ha atribuido en gran parte a la fracción de enona reactiva. Como receptor de la reacción de Michael, la unidad de enona se une a los grupos tiol de ciertas proteínas. Probablemente de esa manera, la mayoría de los chalconas inhiben la biosíntesis de la pared celular de la levadura y así despliegan su potencial antifúngico (Lahtchev y col., 2008). Nuño y col. (2014), mostraron que el extracto diclorometánico de *Z. punctata* y las chalconas aisladas del mismo son efectivos no solo como inhibidores del crecimiento de *Candida*, sino también como inhibidores de la formación de biopelículas, de biofilm preformado de *Candida* y del tubo germinativo, en dosis inferiores a los valores de CIM. Además, son capaces de inhibir las exoenzimas (fosfolipasa y hemolisina) responsables de los mecanismos de invasión de las cepas de *Candida*. Todos estos efectos podrían moderar la colonización, suprimiendo así el potencial invasivo del patógeno.

Se informó además la actividad inhibitoria del ácido quínico frente a *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (Ozçelik y col., 2011) y de pinocembrina frente a *C. albicans* (Lu y col., 2017). Estos compuestos presentes en *Z. punctata* también podrían contribuir a la actividad antifúngica del extracto.

Tangarife-Castaño y col. (2011) sugirieron un sistema de clasificación para la actividad antifúngica de derivados de plantas basados en valores de CIM, como inhibidores potentes (valores de CIM <500 µg/ml), inhibidores moderados (valores de CIM de 600-1500 µg/ml) e inhibidores débiles (MIC valores de >1600 µg/ml). De acuerdo con esta clasificación, el extracto hidroalcohólico de *Z. punctata* podría considerarse un agente antifúngico fuerte.

Tabla 3. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Zuccagnia punctata* en diferentes aislados clínicos de levaduras de infecciones vaginales en seres humanos.

Cepa	Número de colección	Fenotipo de aislados clínicos	E-Zp (µg EAG/ml)	
			CIM 90/50*	CFM
<i>C. albicans</i>	144783	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	50/12,5	200
	134333	Flu ^R ,Am ^S ,Ny ^S	100/12,5	400
	2089	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	50/12,5	200
<i>C. glabrata</i>	031646	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	25/12,5	400
	042030	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	50/12,5	200
	031982	Flu ^R ,Am ^S ,Ny ^S	25/12,5	200
<i>C. tropicalis</i>	1841	Flu ^S ,Am ^S Ny ^S	100/12,5	100
<i>S. cerevisiae</i>	134528	Flu ^S ,Am ^S Ny ^S	25/12,5	100
	134544	Flu ^R ,Am ^S Ny ^S	50/12,5	100
	124263	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	25/12,5	100
<i>C. parapsilosis</i>	134410	Flu ^S ,Am ^S Ny ^S	25/12,5	100
<i>C. krusei</i>	134409	Flu ^R ,Am ^S Ny ^S	100/25	100

*Los valores de CIM representan el 90 y 50% de la inhibición del crecimiento en comparación con el control de crecimiento. E-Zp: Extracto de *Z. punctata*; Flu: Fluconazol; Am: Anfotericina B; Ny: Nistatina; R: Resistente; S: Sensible.

2.4.2. Actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante del extracto estandarizado realizando el ensayo de depuración del radical catión ABTS (ABTS^{•+}) y el ensayo de inhibición de la hemólisis oxidativa (AAPH); así como también ensayos sobre especies reactivas de oxígeno, radicalarias y no radicalarias ([•]OH y H₂O₂).

El extracto hidroalcohólico de *Z. punctata* demostró poseer actividad antioxidante por todos los métodos empleados. En el ensayo del ABTS^{•+} se obtuvo un valor de CD₅₀ de

9,1±0,5 µg PS/ml, inferior a los obtenidos con el antioxidante sintético butil hidroxitolueno y el antioxidante natural quercetina (Tabla 4). Esta potencia fue mayor a la informada para un extracto acuoso (CD₅₀ 17,1±0,1 µg/ml; Carabajal y col., 2017) y para un extracto en diclorometano de *Z. punctata* (20,1±0,5 µg/ml; Nuño y col., 2015). En el ensayo de la inhibición de la hemólisis oxidativa, el extracto de *Z. punctata* exhibió un fuerte efecto protector sobre la lipoperoxidación de glóbulos rojos, con valores de CI₅₀ de 0,14 µg PS/ml, siendo entre 6 y 8 veces más potente que los antioxidantes quercetina y BHT usados como referencia (Tabla 4). El extracto fue treinta veces más potente sobre el •OH que el antioxidante natural quercetina, mientras que su potencia antioxidante frente al H₂O₂ fue considerablemente menor que frente al •OH. Es importante resaltar que los lactobacilos presentes en la microbiota vaginal producen H₂O₂ para dificultar la germinación de los micelios e inhibir la proliferación de microorganismos patógenos (Ferrer, 2000, Petrova y col., 2013; Vizcaíno y col., 2016), por lo cual, el extracto de *Z. punctata* al tener una baja potencia como depurador de peróxido de hidrógeno no afectaría este mecanismo de defensa de la microbiota normal.

La actividad antioxidante del extracto se podría atribuir a la presencia de 2',4'-dihidroxichalcona (Morán Vieyra y col., 2009; Nuño y col., 2015), dihidrochalconas (Riviere, 2016), pinocembrina (Vargas-Sánchez et.al, 2015), catequinas (Aree y Jongrungruangchok, 2016; Grzesik y col., 2018), derivados de quercetina (D'Andrea, 2015; Wang y col., 2016) y derivados del ácido cafeico y cinámico (Anantharaju y col., 2016; Taofiq y col., 2017; Shahidi y Yeo, 2018) compuestos con conocida potencia antioxidante presentes en el extracto hidroalcohólico.

Tabla 4. Actividad antioxidante del extracto de *Zuccagnia punctata*.

Muestra	ABTS• ⁺	AAPH	•OH	H ₂ O ₂
	CD ₅₀ (µg PS/ml)	CI ₅₀ (µg PS/ml)	CD ₅₀ (µg PS/ml)	CD ₅₀ (µg PS/ml)
E- <i>Zp</i>	9,13±0,50 ^c	0,14±0,01 ^a	0,98±0,05 ^a	184,84±15,20 ^b
BHT	3,50±0,20 ^b	1,20±0,10 ^c	-	-
Quercetina	1,40±0,10 ^a	0,90±0,08 ^b	30,0±2,00 ^b	38±3,20 ^a

E-*Zp*: extracto de *Z. punctata*; BHT: butil hidroxitolueno. Los valores se reportan como media ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna indicaron diferencias significativas en la actividad antioxidante de acuerdo con la prueba de Tukey (p ≤ 0,05).

2.4.3. Actividad antiinflamatoria

El enfoque terapéutico tradicional hacia las enfermedades inflamatorias se centra en seleccionar pasos específicos de vías particulares. En este sentido, la composición compleja del extracto de plantas o mezclas de extractos de plantas sería útil para inhibir diferentes vías o una vía en diferentes niveles para lograr un tratamiento más eficiente de enfermedades complejas como vulvovaginitis, proceso infeccioso asociado a una patología inflamatoria (Meirer y col., 2014). La vía del ácido araquidónico (AA) es uno de los procesos más importantes implicados en la respuesta inflamatoria, con enzimas como fosfolipasa A2 (sFLA₂) que hidroliza este ácido el que es metabolizado por las enzimas ciclooxigenasas (COX) y lipoxigenasas (LOX) para producir prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (D'Almeida y col., 2013). El mejor enfoque para tratar la inflamación sería inhibir la vía de AA a diferentes niveles, de una manera que suprimiría la respuesta inflamatoria, pero al mismo tiempo mantendría los niveles fisiológicos de los mediadores (Hwang y col., 2013). El extracto de *Z. punctata* mostró capacidad inhibitoria sobre las tres enzimas proinflamatorias: COX-2, sFLA₂ y LOX (Tabla 5). A una concentración de 50 µg de EAG/ml, mostró un efecto inhibitorio de 71% y 95%, respectivamente, sobre las enzimas COX-2 y LOX. Aunque la capacidad inhibitoria de sFLA₂ fue menor que la de las otras enzimas, el efecto fue mayor al obtenido con antiinflamatorios comerciales, tales como naproxeno e indometacina (Tabla 5). Este efecto múltiple sobre diferentes vías metabólicas del proceso inflamatorio convierte al extracto de *Z. punctata* en un fitoterápico muy interesante. El efecto global logrado en un extracto complejo como el de *Z. punctata* es el resultado de una interacción compleja entre los diferentes componentes químicos del fitocomplejo que actúan de diferente manera sobre cada enzima.

El extracto de *Z. punctata* fue más activo sobre LOX (CI₅₀ de 20,53±1,93 µg EAG/ml) que el extracto hidroalcohólico de flores de *Z. punctata* (CI₅₀ de 49,64±2,52 µg EAG/ml; Moreno y col., 2015) y que los de otras especies de plantas que crecen en regiones áridas de Argentina (*Junellia* sp., *Parastrephia* sp. y *Baccharis* sp., Torres Carro y col., 2015). El efecto inhibitorio de esta enzima proinflamatoria puede ser explicado al menos en parte por los compuestos fenólicos identificados en el extracto. Según Schurink (2007), el mecanismo de inhibición de los compuestos fenólicos sobre la enzima LOX se produce por una combinación entre la actividad antioxidante propia de los polifenoles y la unión al sitio activo de la enzima y/o la interacción con el sustrato que es un ácido graso hidrofóbico. La enzima 5-lipoxigenasa es muy sensible a

los compuestos antioxidantes debido a su átomo de hierro no-hemo en su sitio de acción. Muchos inhibidores de la 5-LOX simplemente actúan como antioxidantes no selectivos por reducción de Fe^{+3} en el sitio activo o quelando el Fe^{+2} con lo que se interrumpe el ciclo catalítico. Por ello, los compuestos fenólicos con mayor poder reductor poseen los mayores efectos sobre la enzima LOX. Este efecto fue demostrado por Torres Carro y col. (2015, 2017).

El extracto de *Z. punctata* mostró menor actividad sobre sFLA₂ que la reportada por Nuño y col. (2016), donde se observó que 10 µg PS/ml de un extracto diclorometánico de *Z. punctata* inhibía un $40,47 \pm 2,00\%$ de la actividad de dicha enzima mientras que, en nuestras condiciones de trabajo, el extracto de *Z. punctata* con 50 µg PS/ml inhibió aproximadamente un 28%. Por otro lado, entre los factores de virulencia de *Candida* spp. se encuentra la capacidad de producir enzimas proteolíticas como las fosfolipasas (Dadar y col., 2018), lo cual destaca la importancia de la inhibición de esta enzima por el extracto de *Z. punctata*.

Estudios sobre la actividad de flavonoides relacionados estructuralmente demostraron que varios derivados de flavonas como la apigenina actúan como inhibidores de la COX, mientras que derivados de flavonoles como la quercetina actúan preferentemente como inhibidores de la LOX (Kim y col., 2004). Las características estructurales químicas óptimas para estos efectos son el doble enlace entre C2-C3 del anillo C, los grupos hidroxilos en C5 y C7 del anillo A y en C4' o C3'-C4'- del anillo B. Por otro lado, sobre la sFLA₂ las flavanonas muestran menor inhibición mientras que los flavonoles mostraron una inhibición considerable, lo cual manifiesta la importancia del doble enlace C2-C3 en el anillo C (Kim y col., 2004). Las características estructurales de los flavonoides que favorecen la actividad inhibitoria de enzimas proinflamatorias son similares a las características necesarias para la actividad antioxidante (Kim y col., 2004; Batovska y Todorova, 2010; Zhang y Lokeshwara, 2012; Nuño et.al., 2016). Se informó que la actividad inhibidora de las chalconas resulta mayor a las de las flavanonas, lo cual se atribuye a la ausencia del doble enlace entre C2-C3 en el anillo B de estos últimos (Kim y col., 2004; Ribeiro y col., 2014).

Tabla 5. Efecto inhibitorio de 50 µg EAG/ml de extracto de *Zuccagnia punctata* y de compuestos antiinflamatorios de referencia sobre las enzimas LOX, COX-2 y FLA₂.

Muestra	% Inhibición de enzimas proinflamatorias		
	LOX	COX-2	FLA ₂
E-Zp	95,25±4,20 ^a	71,96±2,80 ^a	28,57±0,50 ^c
Naproxeno	95,00±2,80 ^a	-	12,00±0,60 ^a
Indometacina	-	-	16,00±0,80 ^b
Nimesulida	-	100,00±5,00 ^b	-

E-Zp: extracto de *Z. punctata*. LOX: lipoxigenasa; COX-2: ciclooxigenasa-2; sFLA₂: fosfolipasa A₂. Los valores se presentan como media ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna para cada especie de la planta indicaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

2.4.4. Actividad mutagénica. Test de Ames

El test de Ames (test de mutación reversa en *Salmonella typhimurium*) tiene un efecto altamente predictivo de carcinogenicidad (alrededor del 80%) a través de mecanismos como mutaciones puntuales, sustituciones en pares de bases o mutaciones génicas por desplazamiento del marco de lectura (*frameshift*), resultando una herramienta útil para la identificación de compuestos que puedan llegar a ser un riesgo a la salud humana, ya que las mutaciones que alteran la expresión génica se consideran como un rasgo común de todos los cánceres.

La evaluación de la mutagenicidad del extracto de *Z. punctata* mediante ensayos de mutagenicidad utilizando cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 indicó que, hasta una concentración de 500 µg/placa, el extracto no induce un incremento del número de revertantes de TA98 y TA100 respecto al número de revertantes espontáneos, presentando en todos los casos una relación de mutagenicidad <1,5 (Tabla 6). A la concentración de 500 µg/placa no se pudo determinar el efecto sobre TA100, dado que en esa concentración se ve afectada la viabilidad bacteriana, debido a la actividad antimicrobiana del extracto.

El número de revertantes espontáneas obtenido en el ensayo fue 34±2 para la cepa TA98 y 110±16 para TA100, lo cual se corresponde con lo informado por Maron y Ames (1983) (30 a 50 revertantes espontáneos para TA98 y 120-200 para TA100) y por Mortelmans y Zeiger (2000) (20-50 para TA98 y 75-200 para TA100).

Los resultados obtenidos indican que se trataría de un material no genotóxico; esto coincide con lo informado por Nuño y col. (2016) y por Carabajal y col. (2017).

Zampini y col. (2008) no encontraron genotoxicidad en el extracto hidroalcohólico de *Z. punctata* y DHC usando la prueba de ensayo de cometa *in vitro* en células procedentes de líneas de hepatoma humano, HepG2.

Tabla 6. Número de revertantes/placa y relación de mutagenicidad (RM) en *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 con distintas dosis de extracto hidroalcohólico de *Zuccagnia punctata*.

Muestra	µg EAG/ placa	TA 98 (-) S9	TA 100 (-) S9	RM TA98	RM TA100
<i>Zuccagnia punctata</i>	500	40±1 ^a	ND	1,17	ND
	250	36±6 ^a	103±14 ^a	1,05	0,93
	125	40±4 ^a	117±21 ^a	1,17	1,06
Control positivo ¹		1222±109 ^b	723±171 ^b		
Control negativo ²		34±2 ^a	110±16 ^a		

Los datos corresponden a la media ± desviación estándar de tres placas. ND: Afecta viabilidad de la cepa.¹Control positivo: 4-nitro-fenilendiamina (10 µg/placa). ²Control negativo: DMSO (100 µl/placa).

CAPÍTULO IV:

Especies de Larrea

1. Introducción

La familia Zygophyllaceae está representada por aproximadamente 280 especies restringidas a áreas tropicales y subtropicales. En Argentina, la familia está representada por 7 géneros (*Bulnesia* Gay, *Kallstroemia* Scop., *Larrea* Cav., *Plectrocarpa* Gill. ex Hook. y Arn., *Porlieria* Ruiz y Pav., *Tribulus* L. y *Zygophyllum* L.), y a menudo son dominantes en las ecorregiones de las regiones de Chaco y Monte (Cabrera y Willink, 1973; Cabrera, 1976; Zuloaga y Morrone, 1999; Flora Argentina, 2018). En Brasil está representado por tres géneros (*Kallstroemia* Scop., *Larrea* Cav. y *Tribulus* L.) (Engler, 1827).

1.1. Género *Larrea*

El género *Larrea* (Zygophyllaceae) se compone de arbustos perennifolios y leñosos de amplia distribución geográfica en regiones áridas de América del Sur (Argentina, Chile, Bolivia, Perú y Brasil) y América del Norte (México y el suroeste de los Estados Unidos) (Engler, 1827; Hunziker y col., 1972, 1977; Flora Argentina, 2018). Comprende cinco especies: cuatro en América del Sur, *L. ameghinoi* Speg., *L. nitida* Cav., *L. divaricata* Cav., y *L. cuneifolia* Cav. (jarillas), y una en América del Norte, *L. tridentata* Coville (gobernadora) (Lia y col., 2001).

L. divaricata (nombres comunes: jarilla, jarilla hembra, chamanilla, jarilla del cerro, yarilla), *L. cuneifolia* (nombres comunes: jarilla, jarilla macho, jarilla crespa, jarilla norte-sur, jarilla del campo) y *L. nitida* (nombres comunes: jarilla, jarilla de la montaña, crespa, pispá o pispita, jarilla fina) son especies que se encuentran asociadas a *Zuccagnia punctata* formando el “jarillal” (Figura 1).

1.2. Descripción botánica

Las especies de *Larrea* son arbustos erectos de 1-4 m, xerófilos, con hojas opuestas, pubescentes, subsésiles y estipuladas que muestran una apariencia resinosa de color amarillento. La principal diferencia botánica entre las especies de *Larrea* reside en su morfología, patrones fenológicos y sistemas de apareamiento (Barbour y col., 1977, Simpson y col., 1977, Ezcurra y col., 1991).

1.3. Distribución geográfica y hábitat de *Larrea*

Las especies de *Larrea* están ampliamente distribuidas en la ecorregión del Monte, que

se extiende desde 24°35'S en Salta hasta 44° 20'S en Chubut, y desde 62° 54'W en la Costa Atlántica a 69° 50'W en la región preandina (Morello, 1958), Figura 2. También se encuentra en las provincias fitogeográficas de Chaco y Patagonia (Ezcurra y col., 1991). Además, hay poblaciones aisladas de *L. nitida* y *L. divaricata* en áreas áridas y semiáridas de Chile, Bolivia y Perú (Hunziker y col., 1972). En los desiertos de Monte Mojave y Sonora, las especies de *Larrea* son un elemento importante de la comunidad. Debido a esta similitud, se postuló la existencia de una conexión entre estos desiertos y, por lo tanto, un origen común para su biota (Johnson, 1940; Roig y Rossi, 2001). Lia y col. (2001) han demostrado que *L. tridentata* DC., la única especie de América del Norte, es la especie hermana de *L. divaricata* Cav. y que ambos componen un grupo con las restantes especies de *Larrea*. Estos autores concluyen que el género *Larrea* se originó en América del Sur y que la dispersión a larga distancia a América del Norte de *L. tridentata* fue posterior.

L. cuneifolia se encuentra en la lista roja preliminar de plantas endémicas de la Argentina (Categoría 1), Norma RE-84-2010-SADS (PlanEAR) mientras que *L. divarivata* y *L. nitida* no se encuentran citadas en dicha lista.

1.4. Usos populares

Larrea divaricata, *L. cuneifolia* y *L. nitida* se usan en la medicina tradicional argentina como antiinflamatorios, antirreumáticos, hipotensivos, rubefacientes, diaforéticos, febrífugos, oxitócicos, emenagogo, odontálgicos, antitusivos y para tratar infecciones fúngicas y bacterianas (Alonso y Desmarchelier, 2005; Alonso, 2007; Barboza y col., 2009).

1.5. Composición química y actividades biológicas

Una amplia gama de actividades farmacológicas se describió previamente para estas especies, lo que indica su posible uso como medicina alternativa o complementaria. Los extractos acuosos y alcohólicos de *L. divaricata* mostraron actividad antibacteriana (Stege y col., 2006; Zampini y col., 2007), antifúngica (Davicino y col., 2007), antitumoral (Anesini y col., 1996a, 2001; Davicino y col., 2010, 2011; Martino y col., 2016), antiinflamatoria (Pedernera y col., 2006), antioxidante (Carabajal y col., 2017; Álvarez Echazú y col., 2018) e inmunomoduladora (Anesini y col., 1996b; Davicino y col., 2007). Los extractos en disolventes orgánicos fueron activos contra hongos fitopatógenos (Quiroga y col., 2001; Svetaz y col., 2010; Vogt y col., 2013).

L. cuneifolia mostró actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas multirresistentes (Zampini y col., 2007), actividad antifúngica frente a hongos filamentosos fitopatógenos y levaduras (Quiroga y col., 2001; Svetaz y col., 2010), actividad como larvicida (Batallán y col., 2013) y antioxidante (Torres y col., 2003; Carabajal y col., 2017).

El extracto de exudados foliares en diclorometano de *L. nitida* mostró actividad antifúngica y se reportó la presencia de ácido 3'-metil nordihidroguayarático (AMNDG), ácido nordihidroguayarático (ANDG) y dos epoxilignanos (Agüero y col., 2011). Las propiedades antioxidantes (Torres y col., 2003) y el efecto antimicótico sinérgico de *L. nitida* y *Zuccagnia punctata* Cav. (Butassi y col., 2015; 2018) también fue informado previamente.

Se informó la presencia de ANDG, aceites esenciales y flavonoides como componentes principales en algunas especies de *Larrea* (Blecha y col., 2007; Agüero y col., 2011; Martino y col., 2016; Carabajal y col., 2017). Se identificaron además varios flavonoides que incluyen derivados de quercetina, apigenina y kaempferol en extractos orgánicos de *L. cuneifolia* (Valesi y col., 1972).



Figura 1. El “jarillal”. Imagen tomada durante la recolección personal de las muestras en Amaicha del Valle, Tucumán.

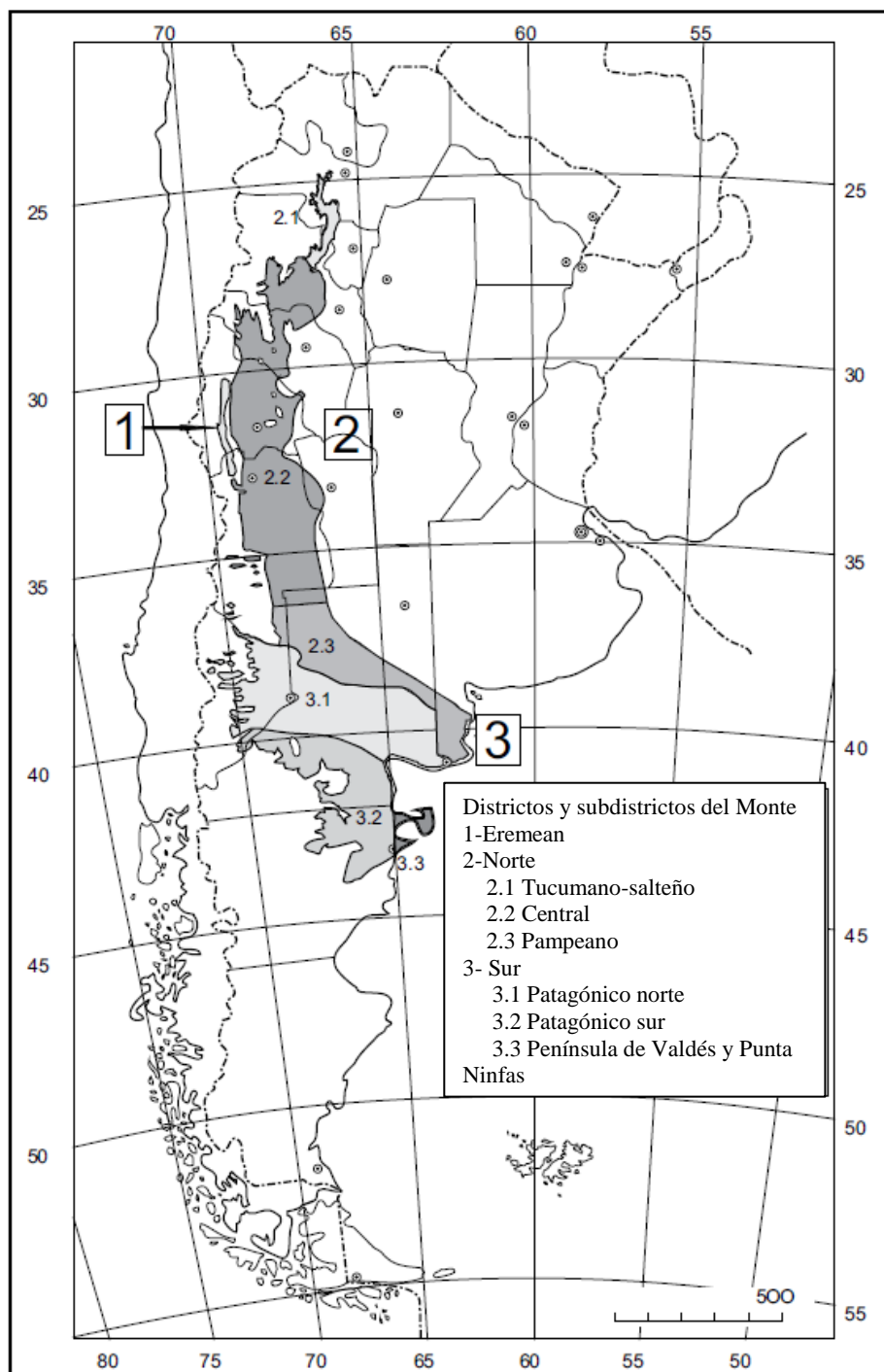


Figura 2. Ecorregión del Monte. Imagen tomada de Roig y col. (2009).

Objetivo general: El objetivo de esta investigación es evaluar el potencial uso de extractos hidroalcohólicos de especies de *Larrea* en candidiasis vulvovaginal como antimicótico, antioxidante y antiinflamatorio.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar la materia prima (partes aéreas de *L. divaricata*, *L. cuneifolia*, *L. nitida*) desde el punto de vista morfoanatómico.

2. Obtener extractos hidroalcohólicos a partir de partes aéreas de la especie y estandarizarlos desde el punto de vista químico.
3. Evaluar el efecto de los extractos estandarizados sobre el crecimiento de especies de *Candida* aisladas de infecciones vaginales.
4. Evaluar el efecto de los extractos estandarizados sobre el crecimiento de *Lactobacillus* spp. aislados de microbiota vaginal normal.
5. Evaluar la capacidad de los extractos estandarizados de controlar los procesos oxidativos e inflamatorios asociados a la candidiasis vaginal.

2. Resultados y discusión

2.1. Caracterización morfoanatómica de especies de *Larrea*

Como se explicó en el Capítulo 3 la descripción macroscópica y microscópica de una especie vegetal es fundamental para encontrar caracteres de valor diagnósticos que permitan efectuar el control de calidad de la materia prima con la que se trabaja para la preparación de un fitoproducto. De allí que se analizaron los caracteres macroscópicos y microscópicos de las partes aéreas de las tres especies estudiadas en este capítulo, ya que hasta la fecha no existían publicaciones para estas especies en este tema.

Caracteres macroscópicos

La diferenciación morfoanatómica de las especies se puede evidenciar en la Figura 3. *L. cuneifolia* presenta hojas (4,5-13,2 x 2,5-16,0 mm) formadas por dos folíolos oblicuos ovales asimétricos agudos (2-4 x 1-2 mm) unidos a lo largo de dos tercios de su borde interno que culmina en un ápice reflejo mucronado, filiforme y vascularizado (0,3-0,5 mm) (Fig. 3A y D). Dos estípulas (escamosas, subtriangulares, rojizas) (1,2-3,1 mm) se insertan en la base de las hojas (Fig. 3A). *L. divaricata* muestra hojas divaricadas (7,3-17,8 x 2,5-4,5 mm) formadas por dos folíolos divergentes oblongos agudos unidos en la base en un tercio de su longitud total (Fig. 3B), ápice reflejo mucronado, corto y vascularizado (0,3-0,4 mm). Las estípulas son obtusas y redondeadas, similares a las descritas previamente para *L. cuneifolia* (Fig. 3F y H). *L. nitida* presenta hojas impares pinnadas (7,2-13,1 x 3,5-5,0 mm) (Fig. 3C), con 11-17 folíolos oblongos subsiderados, sésiles con ápice redondeado a convexo (3,7-7,5 x 1,4-3,5 mm); el folíolo terminal es a veces más grande con ápice acuminado a emarginado (Fig. 3K). Se observaron raquis pubescentes (Fig. 3L y M) y estípulas acuminadas (1-3 mm).

Caracteres microscópicos

Las tres especies presentaron hojas anfiestomáticas, con una cutícula gruesa resinosa levemente estriada (Fig. 3G), células epidérmicas poligonales con paredes anticlinales rectas, y estomas cicloclíticos (Fig. 3H), braquioparacíticos (Fig. 3G) y paracíticos (Fig. 3I). Se observaron tricomas unicelulares no glandulares, adpreso-antrorsos con pared gruesa, ornamentación estriada, ápice redondeado agudo ($241,31 \pm 56,84 \mu\text{m}$) y rodeados por 4-6 células en su base (Fig. 3G). Los tricomas parecían bi-refringentes bajo luz polarizada. *L. nitida* apareció menos pubescente que las otras dos especies.

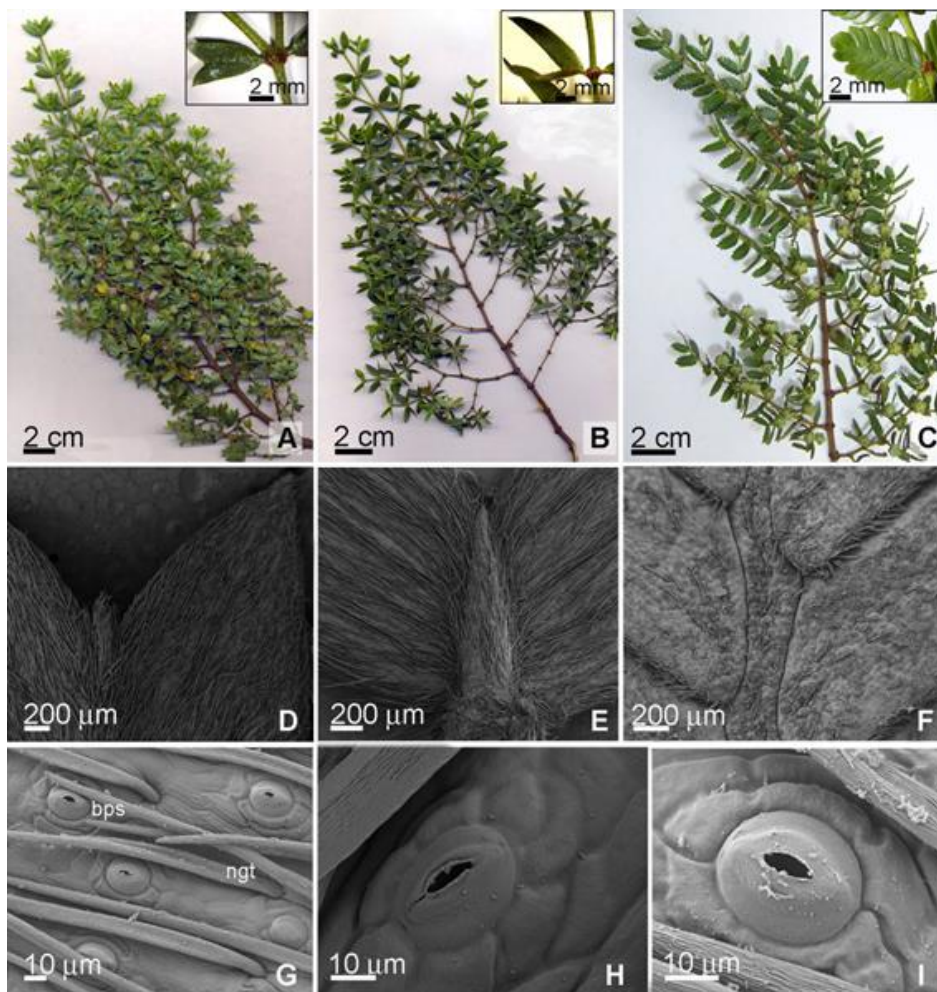


Figura 3. Diferenciación morfológica de especies de *Larrea*. **A.** *L. cuneifolia*. Detalle de la hoja que muestra folíolos unidos a lo largo de dos tercios de su borde interno. **B.** *L. divaricata*. Detalle de hoja divaricada. **C.** *L. nitida*. Detalle hoja pinnada. **D.** Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie adaxial de *L. cuneifolia*. Noté el vértice reflejo con mucron. **E.** MEB de la superficie de la hoja abaxial de *L. divaricata*. Vértice con mucron corto. **F.** MEB de la superficie adaxial del raquis de *L. nitida*, inserción de folíolos sésiles. **G.** MEB de la superficie adaxial de *L. cuneifolia* con cutícula ligeramente estriada, tricomas unicelulares no glandulares (ngt) y estomas braquio-paracíticos (bps). **H.** Estoma cicloclítico. **I.** Estomas paracíticos.

El mesófilo es isolateral, con 3-4 capas de células en empalizadas adaxiales apretadas; 1-2 capas de células abaxiales en empalizada más cortas y una zona central estrecha de mesófilo esponjoso interrumpido por haces vasculares colaterales. En los haces vasculares más grandes del floema se observaron cubiertas de parénquima y esclerenquima (Figuras 4A-C). Las vainas esclerenquimáticas de los haces vasculares se desarrollaron extensamente en *L. cuneifolia* (Fig. 4A) y *L. divaricata* (Fig. 4B) y estuvieron menos desarrolladas o ausentes en *L. nitida* (Fig. 4C). En el mesófilo de todas las especies estudiadas se observaron numerosas drusas de oxalato de calcio, refractivos bajo luz polarizada.

En la vena media de *L. cuneifolia* y *L. divaricata* en la región donde se fusionan los folíolos cerca del pecíolo y en el raquis de *L. nitida* se observó un haz vascular abaxial colateral y otro adaxial invertido más pequeño, con una médula parenquimática entre ellos, a veces acompañada de uno o dos pequeños haces colaterales latero-adaxiales (Fig. 4C). Los haces vasculares de las venas del orden mayor (primario y secundario) presentan vasos de esclerenquima en los polos del floema (Figuras 4A, B y C).

La epidermis uniestratificada adaxial o interna presenta células cilíndricas alargadas, mientras que la epidermis uniestratificada abaxial o externa está formada por más células poliédricas isodiamétricas. En ambas, la epidermis y los idioblastos del mesófilo se evidencian por su contenido ámbar. El mesófilo presentó 1-2 capas adaxiales, 1 capa abaxial de células en empalizada cortas y un parénquima central redondeado compacto homogéneo con paredes gruesas y abundantes drusas, interrumpidas por haces vasculares colaterales (Figuras 4D-F).

El contorno del pecíolo de las tres especies es oval a circular, ocasionalmente truncado adaxialmente (Fig. 4G-I). La transección mostró una epidermis uniestratificada, 3 capas adaxiales y 7 capas abaxiales de parénquima formado por células elípticas a redondas con abundantes drusas de oxalato cálcico, que a veces forman un anillo alrededor de los tejidos vasculares. El haz vascular se asemeja a una sifonostela ectofloica, acompañada en *L. cuneifolia* y *L. divarivata* por dos pequeños haces latero-adaxiales. *L. cuneifolia* presentó una fuerte capa adaxial de fibras y algunos grupos abaxiales de células lignificadas (Fig. 4G); *L. divaricata* mostró una cubierta adaxial de fibras menos desarrollada y grupos abaxiales aislados de fibras o esclereidas en algunos casos no lignificados (Fig. 4H); finalmente *L. nitida* no presentó tejido lignificado y sí mostró algunas fibras abaxiales aisladas o esclereidas (Fig. 4I).

La sección transversal del tallo primario de las tres especies mostró un contorno elíptico, a veces con nervios prominentes en *L. divaricata*, cutícula gruesa y la epidermis uniseriada formada por células cuadrangulares con paredes gruesas. Se observaron tricomas no glandulares. Estomas elevados sobre la superficie epidérmica. Corteza con 1-2 capas de células clorenquimatosas tangencialmente alargadas y 10-14 capas de células parenquimatosas redondeadas con drusas y cristales rómbicos. Se observó un anillo completo o incompleto de fibras. En ocasiones se asocia con grupos de braquiesclereidas, internamente un anillo formado por 4-5 capas de células parenquimáticas redondeadas rodea el cilindro vascular. El sistema vascular es un cilindro continuo de floema, seguido de cámbium y xilema y una médula en forma de cruz formada por células parenquimatosas isodiamétricas con drusas (Figuras 4J-L).

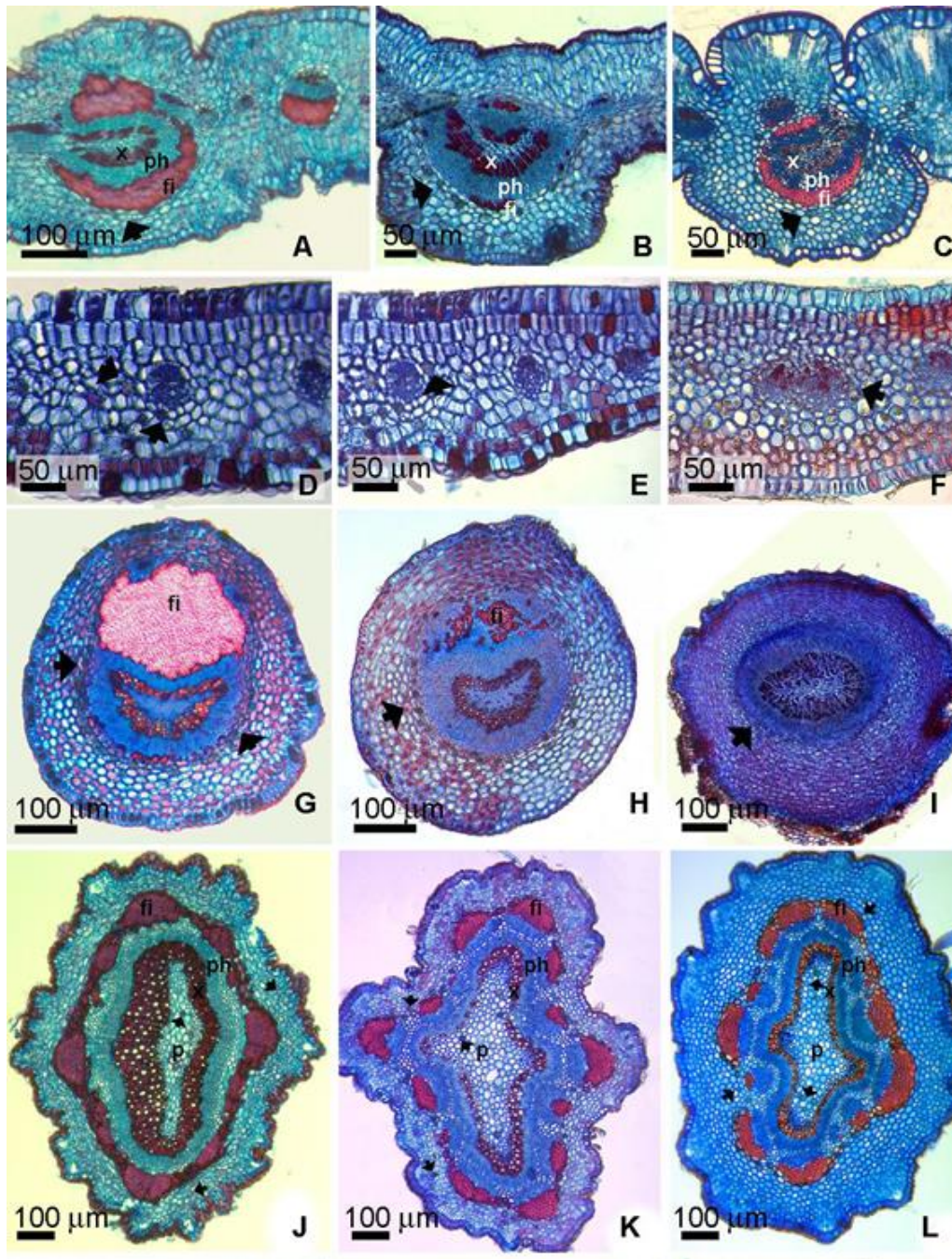


Figura 4. Micrografía de especies argentinas de *Larrea*. Sección transversal de folíolos en el nivel del raquis: **A.** *L. cuneifolia*; **B.** región proximal de *L. divaricata* donde los folíolos están fusionados, cerca del pecíolo; **C.** *L. nitida* en el nivel de raquis. Transección de las estípulas: **D.** *L. cuneifolia*; **E.** *L. divaricata*; **F.** *L. nitida*. Sección transversal del pecíolo: **G.** *L. cuneifolia*; **H.** *L. divaricata*; **I.** *L. nitida*. Sección transversal del tallo en la etapa temprana del crecimiento secundario: **J.** *L. cuneifolia*; **K.** *L. divaricata*; **L.** *L. nitida*. Referencias: fi, fibras; ph, floema; p, médula; x, xilema. Las flechas indican drusas.

Los caracteres morfológicos observados en este trabajo de Tesis Doctoral coinciden con los citados en la flora de Brasil, Chile, Argentina y América del Norte para el género y las especies en particular (Engler, 1827; Reiche, 1896; Flora Argentina, 2018). *L.*

divarivata presenta caracteres morfológicos similares a los de la especie de América del Norte *L. tridentata* Sessk y Moc. ex DC. (Yang y col., 1977; Laport y Ramsey, 2015). Se mostró mucha controversia sobre si la especie norteamericana es una especie separada de la diploide sudamericana *L. divaricata*, y en algunos documentos se ha denominado *L. divaricata* subsp. *tridentata*. Sin embargo, estudios citogenéticos, isoenzimáticos y moleculares confirman que son especies estrechamente relacionadas, pero separadas (Lia y col., 2001; Laport y Ramsey, 2015). *L. ameghinoi* Speg. y *L. nitida* son similares en su morfología de hojas compuestas, la anatomía de las flores y la textura y el tamaño del mesocarpio (Hunziker y col., 1977, Simpson y col., 1977) pero con marcadas diferencias en su hábito de crecimiento (Ezcurra y col., 1991). Barbour y Díaz (1973), Barbour y col. (1974, 1977) y Ezcurra y col. (1991) analizaron el comportamiento fisiológico y la arquitectura del arbusto de las especies de *Larrea* de América del Norte y del Sur y afirmaron que las principales diferencias entre las especies podrían ser la arquitectura del arbusto en lugar de la fisiología de este o la anatomía de la hoja. En el presente trabajo, encontramos que las principales diferencias botánicas entre las especies de *Larrea* del noroeste de Argentina radican en la morfología de sus hojas, forma de hojas, folíolos y estípulas; presencia o ausencia de mucrón y raquis, y porcentaje de coalescencia de los folíolos. Caracteres anatómicos como tricomas no glandulares, tipos de estoma, cutícula estriada gruesa con depósitos resinosos, tipo de mesófilo isolateral, la presencia de vainas de parénquima grandes en los haces vasculares menores y cristales de oxalato de calcio son características comunes a las tres especies y otras especies de *Larrea* como *L. tridentata* (Ragonese, 1960; Pyykko, 1966; Metcalfe y Chalk, 1972; Meyer y Meola, 1978).

De acuerdo con Ragonese (1960), la posición y la abundancia del tejido esclerénquimático en la sección media de la vena y el pecíolo permite la diferenciación de estas tres especies que coexisten. *L. cuneifolia* presenta fibras asociadas a los haces vasculares, mientras que *L. divaricata* y *L. nitida* presentan poco o ningún desarrollo de tejidos esclerificados.

2.2. Caracterización fitoquímica de los extractos de *Larrea*

2.2.1. Determinación cualitativa de fitoquímicos

A partir de los extractos hidroalcohólicos se obtuvo un rendimiento de $29,4 \pm 2,8\%$ para *L. cuneifolia*, de $32,4 \pm 2,1\%$ en *L. divaricata* y de $31,2 \pm 2,9\%$ en *L. nitida* (% g ES/100 g

material vegetal seco) (Tabla 1). Basados en estos resultados podemos decir que el rendimiento en principios solubles fue semejante para los tres extractos.

El análisis mediante técnicas cualitativas del perfil fitoquímico indica que las tres especies de *Larrea* evaluadas presentan taninos, flavonoides y triterpenos y/o esteroides. Además, en *L. divaricata* se evidenció la presencia de cumarinas.

2.2.2. Determinación cuantitativa de fitoquímicos

Los extractos hidroalcohólicos se caracterizaron químicamente por métodos espectrofotométricos para determinar de manera cuantitativa los fitoquímicos presentes. Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales, compuestos fenólicos no flavonoides y flavonoides, flavonas y flavanonas, y taninos condensados e hidrolizables (Tabla 1).

El 37-39% del peso del principio soluble obtenido en los extractos corresponde a polifenoles totales. Dentro de los polifenoles, los extractos fueron más ricos en compuestos del tipo flavonoides, siendo su contenido entre 55-60% del total de compuestos fenólicos. Se detectaron taninos condensados con valores entre 25,06 y 39,52 mg EAG/g PS (6-10% del total de polifenoles). No se detectaron taninos hidrolizables en ningunas de las muestras analizadas. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición fitoquímica de los extractos hidroalcohólicos de *Larrea*

Contenido de fitoquímicos	<i>L. cuneifolia</i>	<i>L. divaricata</i>	<i>L. nitida</i>
Fenólicos totales libres (mg EAG/g PS)	397,90±2,70 ^b	397,40±3,10 ^b	370,60±1,50 ^a
Fenólicos no flavonoides (mg EAG/g PS)	157,48±5,00 ^a	162,58±6,79 ^a	169,00±10,20 ^a
Fenólicos flavonoides (mg EAG/g PS)	240,42±7,70 ^b	234,82±9,79 ^b	201,60±11,70 ^a
Flavonas y flavanonas (mg EQ/g PS)	28,52±1,69 ^a	27,96±2,70 ^a	23,50±1,90 ^a
Taninos condensados (mg EPB2/g PS)	39,52±2,01 ^c	25,06±0,90 ^a	33,10±0,40 ^b
Taninos hidrolizables (mg EAG/g PS)	ND	ND	ND
Rendimiento (% , g PS/100 g material vegetal seco)	29,40±0,20	32,40±0,10	31,20±0,10

EAG: equivalentes de ácido gálico; EQ: equivalentes de quercetina; EPB2: equivalentes de procianidina B2; PS: peso seco del extracto. Los valores se reportan como media ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma línea indicaron diferencias significativas en el contenido de los componentes fitoquímicos según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

2.2.3. Perfil cromatográfico

2.2.3.1. Cromatografía en capa fina

El análisis fitoquímico de los extractos mediante cromatografía en capa fina, con visualización bajo luz UV de 365 y 234 nm y revelado con NP (Figura 5), mostró la presencia de diferentes tipos de compuestos fenólicos, compuestos flavonoides (bandas verde-anaranjadas), y ácidos fenólicos y/o cumarinas (bandas azules). Los perfiles de las tres especies de *Larrea* presentaron patrones similares con algunas diferencias y sustancias que absorben al UV.

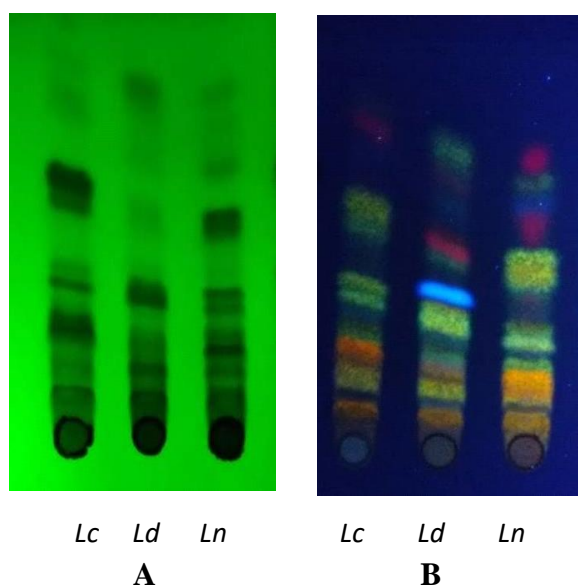


Figura 5. Cromatografía en placas de sílica gel de extractos hidroalcohólicos de especies de *Larrea*. 100 µg de compuestos fenólicos de cada extracto fueron separados por CCF (Merck Kieselgel 60 F254), utilizando como sistema de solventes tolueno/acetona/cloroforno (4,5:3,5:2,5; v/v/v). **A.** Placa visualizada por UV a 254 nm. **B.** Placa revelada con NP y visualizada a 365 nm.

2.2.3.2. HPLC-ESI-MS/MS

El análisis por HPLC-ESI-MS/MS de las muestras (Figura 6) permitió la identificación de 12 compuestos, incluyendo 2 flavonoides y 10 lignanos. Los compuestos **1** y **2** con el ion $[M-H]^-$ a una m/z 463 y 477 uma, mostraron la pérdida neutra de 162 uma, llevando al pico base a m/z 301 y 315 uma, respectivamente, lo que está de acuerdo con la presencia de quercetina (Q) y éter metílico de quercetina. Los compuestos se asignaron como Q-hexósido (**1**) y Q-metiléter hexósido (**2**).

El compuesto principal con el ion $[M-H]^-$ a m/z 301 fue identificado como ANDG (**7**) por los fragmentos característicos a 177, 122 y 109 uma, de acuerdo con los datos reportados por Agüero y col. (2011), así como por comparación con una muestra de referencia del compuesto (Agüero y col., 2011). El compuesto **10** con el ion $[M-H]^-$ a

m/z 285 difiere de **7** por 16 uma, indicando la presencia de tres funciones hidroxilo en los anillos aromáticos. El compuesto se identificó como 4- [4- (4 - hidroxil - fenil) - 2,3-dimetil-butil]-benceno-1,2-diol, de acuerdo con Agüero y col. (2011). Los compuestos **11** y **12** difieren del compuesto **7** en 14 uma, soportando la presencia de un grupo metoxi en las moléculas (Agüero y col., 2011). Los compuestos **11** y **12** se asignaron como isómeros de ácido metil nordihidroguayarático, de acuerdo con los datos reportados por Agüero y col. (2011). Durante los pasados 100 años se ha investigado extensamente este compuesto y se han sintetizado análogos que son potencialmente útiles para tratar enfermedades como diabetes, cáncer, virosis, infecciones bacterianas e inflamación. Un derivado tretra o-metilo del ANDG, terameprocol, se encuentra en ensayos clínicos de fase I/II como agente anticáncer (Chen, 2009).

Los compuestos **3** y **4** difieren del compuesto **7** en 14 uma, presentando fragmentos que soportan oxígeno adicional y una insaturación (ciclo), como se requiere para los epoxilignanos. Los espectros de masas concuerdan con el 3,4,3', 4'-tetrahidroxi-7,7'-epoxilignano y su isómero, como describe Agüero y col. (2011) para propóleos de *Larrea nitida*. Se demostró actividad inhibitoria del crecimiento de *Candida* spp. y *Cryptococcus neoforms* (Agüero y col., 2011). El espectro de masas del compuesto **5** con ión $[M-H]^-$ a una m/z 329 uma, sugiere la presencia de una función metileter. El compuesto **5** se identificó tentativamente como 3,3', 4'-trihidroxi-4-metoxi-7,7'-epoxilignano (Agüero y col., 2011). El compuesto **9** difiere del compuesto **5** en 16 uma y se asignó como dihidroxi-metoxi-epoxilignano. El patrón de fragmentación coincide con la estructura propuesta.

Los compuestos **6** y **8** se identificaron tentativamente como tetrahidroxi- y trihidroxi 6,7'-ciclolignano, respectivamente. La identificación de los constituyentes de los extractos de *Larrea* se resume en la Tabla 2 y en las estructuras químicas de la Figura 7. Trihidroxi-6,7'-ciclolignano fue encontrado solamente en *L. divaricata* y dihidroxi-metoxiepoxilignano en *L. cuneifolia* y *L. nitida*. El ANDG fue encontrado en las tres especies.

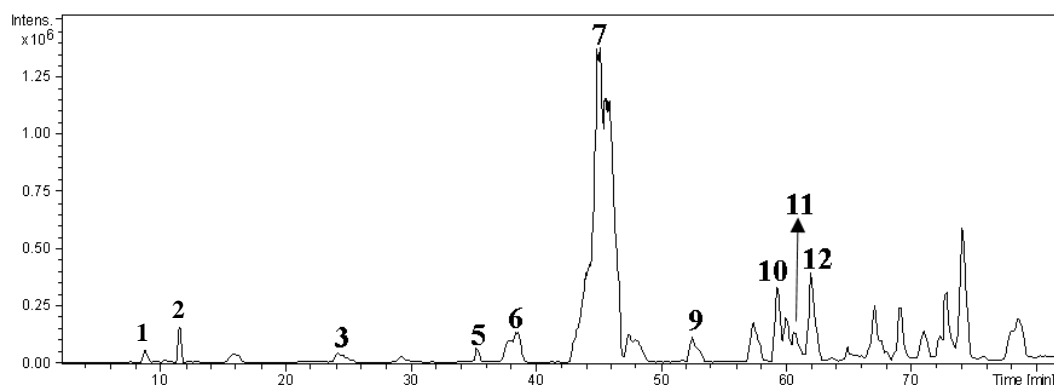
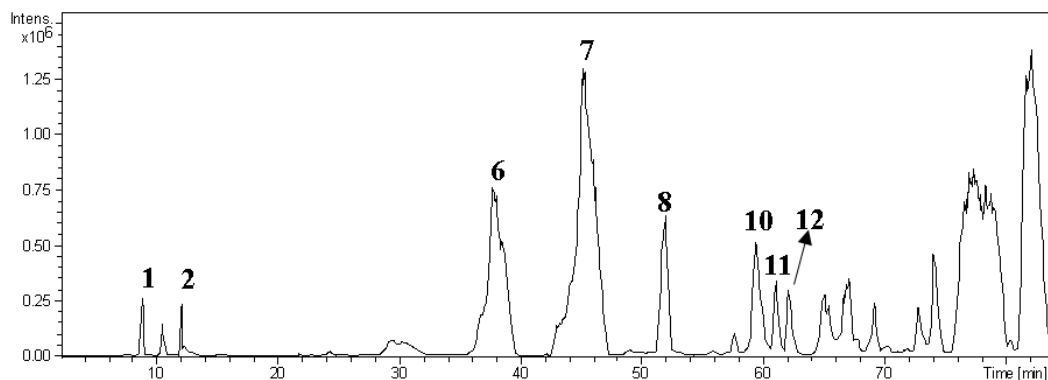
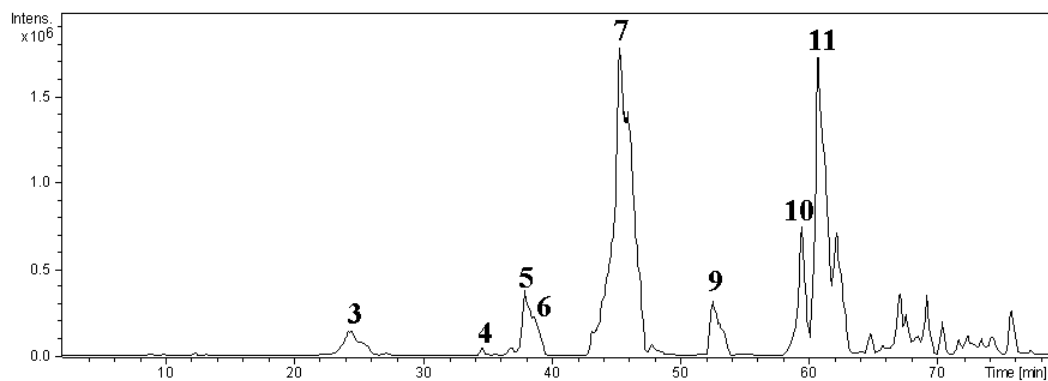
A**B****C**

Figura 6. Cromatogramas de HPLC-MS de especies de *Larrea*. Detección de todos los MS, modo de iones negativos. **A.** *Larrea cuneifolia* Cav.; **B.** *Larrea divaricata* Cav.; **C.** *Larrea nitida* Cav. Identificación de compuestos. **1:** Q-hexósido; **2:** Q-metileterhexósido; **3:** 3,4,3', 4'-tetrahidroxi-7,7'-epoxilignano; **4:** isómero 3,4,3', 4'-tetrahidroxi-7,7'-epoxilignano; **5:** 3,3',4'-trihidroxi-4-metoxi-7,7'-epoxilignano; **6:** 3,4,3',4'-tetrahidroxi-6,7'-ciclolignano; **7:** ácido nordihidroguayarático; **8:** Trihidroxi-6,7'-ciclolignano; **9:** 3,3'-dihidroxi-4-metoxi-7,7'-epoxilignano; **10:** 4-[4-(4-hidroxifenil)-2,3-dimetilbutil]-benceno-1,2-diol; **11:** ácido metil nordihidroguayarático; **12:** isómero de ácido metil nordihidroguayarático. Q: quercetina.

Tabla 2. Identificación de componentes de los extractos de *Larrea* por HPLC-MS-MS en el modo de ion negativo.

Compuesto	Tr (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Identificación
1	9,0	463	301	Quercetina hexósido
2	12,2	477	315(100)	Quercetina metileterhexósido
3	23,5-26,1	315	301(50), 137(19)	3,4,3',4'-tetrahidroxi-7,7'-epoxilignano ¹
4	34,6	315	300(100)	Isómero 3,4,3',4'-tetrahidroxi-7,7'-epoxilignano ¹
5	37,6-39,3	329	314(100)	3,3',4'-trihidroxi-4-metoxi-7,7'-epoxilignano ¹
6	37,6-39,3	299	299(100), 243(10), 109(27)	3,4,3',4'-tetrahidroxi-6,7'-ciclolignano
7	43,1-47,0	301	273(19), 177(9), 122(25), 109(13)	Ácido nordihidroguayarático ¹
8	51,4-52,2	283	227(36), 209(25), 189(21), 173(6), 92(9)	Trihidroxi-6,7'-ciclolignano
9	52,1-53,9	313	298(100), 109(5)	3,3'-dihidroxi-4-metoxi-7,7'-epoxilignano
10	58,2-59,9	285	122	4-[4-(4-hidroxi-fenil)-2,3-dimetil-butyl]-benceno-1,2-diol ¹
11	60,2-62,8	315	300(100), 149(40)	Ácido metil nordihidroguayarático ¹
12	61,8-62,4	315	300(100), 149(35)	Isómero ácido metil nordihidroguayarático ¹

¹De acuerdo con Agüero y col. (2011).

2.3. Localización histoquímica de los principales grupos químicos identificados en especies de *Larrea*

Los flavonoides se detectaron con vainillin-ácido sulfúrico (teñido de color amarillo brillante a naranja) en los depósitos de resina en las cutículas y gotas en las células en empalizada y del mesófilo de los folíolos y las estípulas (Figuras 8A y B). Estos resultados también se confirmaron para los depósitos de resina de los folíolos teñidos con el reactivo de Neu que, bajo luz UV, indujo una fluorescencia amarilla brillante (Fig. 8C). El reactivo de Nadi para terpenoides produce una ligera tinción violeta de las gotitas del mesófilo del folíolo (Fig. 8D) y no reaccionó en las estípulas. Las gotas del mesófilo y la cutícula se tiñeron positivamente (rojo) para las sustancias lipofílicas con Sudán IV (Fig. 8E y F). Ragonese (1960) sugirió que las estípulas eran las responsables de la secreción de la resina depositada en tallos y hojas, sin embargo, en este trabajo demostramos la presencia de compuestos fenólicos y otros constituyentes químicos en la epidermis y la cutícula de las estípulas y en la epidermis y las células en empalizada

del mesófilo de los folíolos. Todas estas células pueden actuar como estructuras glandulares donde la resina se sintetiza y posteriormente se excreta a la superficie.

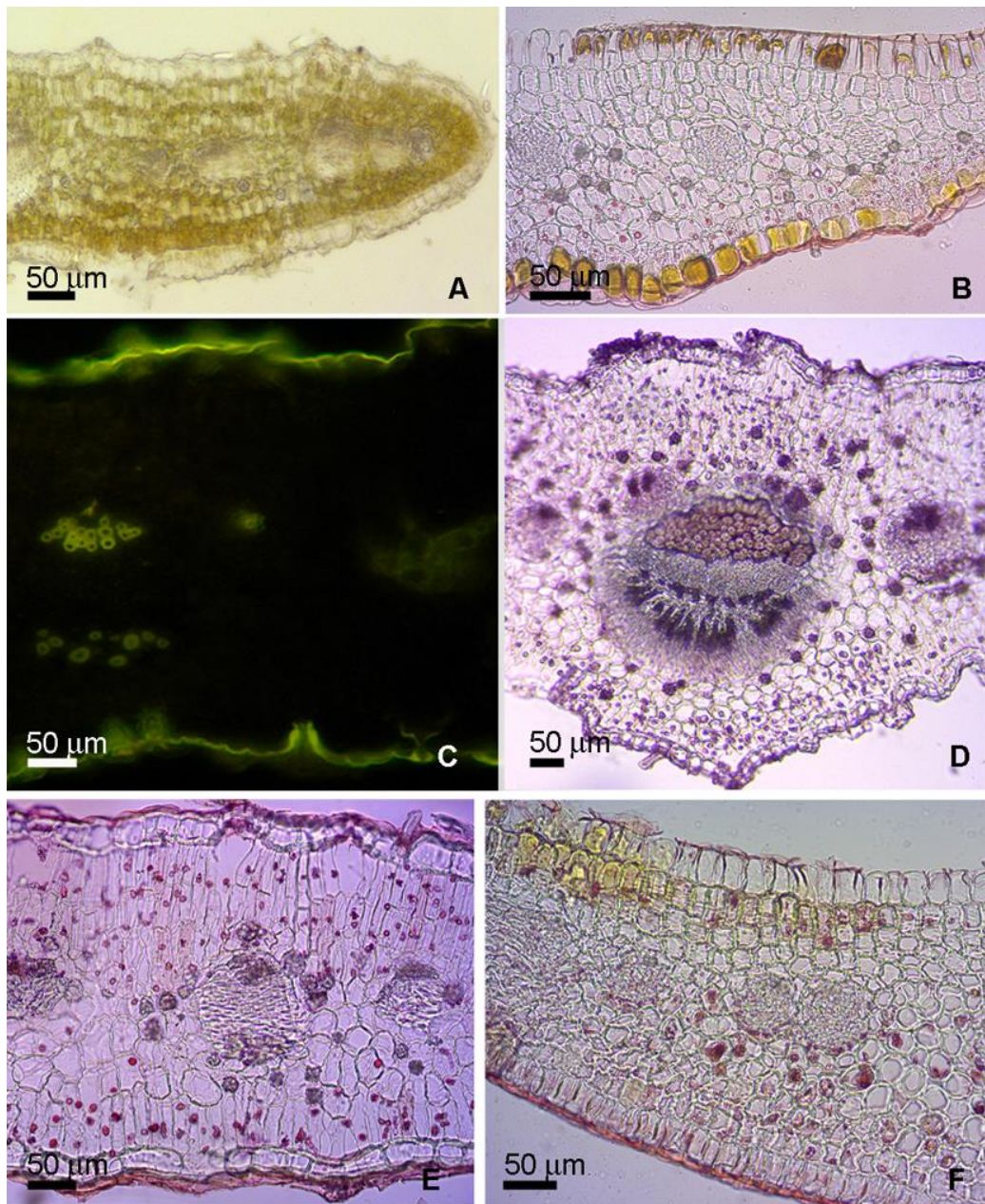


Figura 8. Caracterización histoquímica de hojas y estípulas de especies de *Larrea*. **A y B.** Depósitos de resina en las cutículas y gotitas en las células en empalizada y del mesófilo de folíolos y estípulas, teñidas de color amarillo brillante a naranja con ácido vainillin-sufúrico, lo que indica la presencia de flavonoides. **C.** Los depósitos de resina y la cutícula se tiñen positivamente para que los flavonoides muestren un color amarillo brillante bajo fluorescencia con el reactivo de Neu. **D.** La reacción de Nadi para los terpenoides dio como resultado una ligera coloración violácea de las gotitas del mesófilo del folíolo. **E y F.** Las gotas refringentes del mesófilo y las cutículas se tiñeron positivamente por presencia de sustancias lipofílicas que se tiñeron de rojo con Sudán IV en el folíolo y las estípulas, respectivamente.

2.4. Actividades biológicas de los extractos de *Larrea*

2.4.1. Actividad antifúngica

Se estima que la candidiasis vulvovaginal (CVV) es la segunda causa más común de vaginitis después de la vaginosis bacteriana. Alrededor del 5-8% de las mujeres adultas sufren candidiasis vulvovaginal recurrente (das Neves y col., 2008). En este sentido, es importante encontrar productos para los que las especies de *Candida* no desarrollen resistencia. Los extractos vegetales pueden ser considerados como una terapia alternativa, ya que son drogas con múltiples componentes que pueden actuar por varios mecanismos de acción sobre diferentes blancos (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009), evitando de este modo que los microorganismos desarrollen mecanismos de resistencia. Las especies de *Larrea* son usadas en medicina tradicional para tratar infecciones bacterianas y fúngicas, como antiinflamatorios y febrífugo (Barboza y col., 2009). Por ello, se decidió evaluar la potencia de extractos de *Larrea* sobre especies de *Candida* aisladas de infecciones vaginales y sobre *Lactobacillus* presentes en la microbiota vaginal normal regulando y manteniendo el pH vaginal.

2.4.1.1. Determinación cualitativa. Ensayo bioautográfico

Se evaluó el efecto de los extractos de *Larrea* sobre el crecimiento de *C. albicans* por bioautografía en siembra puntual de 400 µg EAG/ml (sin desarrollar con el sistema de solventes), demostrándose que los fitocomplejos de las tres especies presentan actividad antifúngica (Figura 9A). Con el propósito de evaluar si los compuestos aislados mantienen la actividad inhibitoria del crecimiento de *Candida* observada para los fitocomplejos se realizó una bioautografía sobre los compuestos separados por cromatografía en capa fina en sílica gel. Se observaron para los tres extractos dos bandas de inhibición con valores de Rf de 0,32 y 0,5, que indican que los extractos presentarían más de un compuesto con actividad antimicrobiana (Figura 9A).

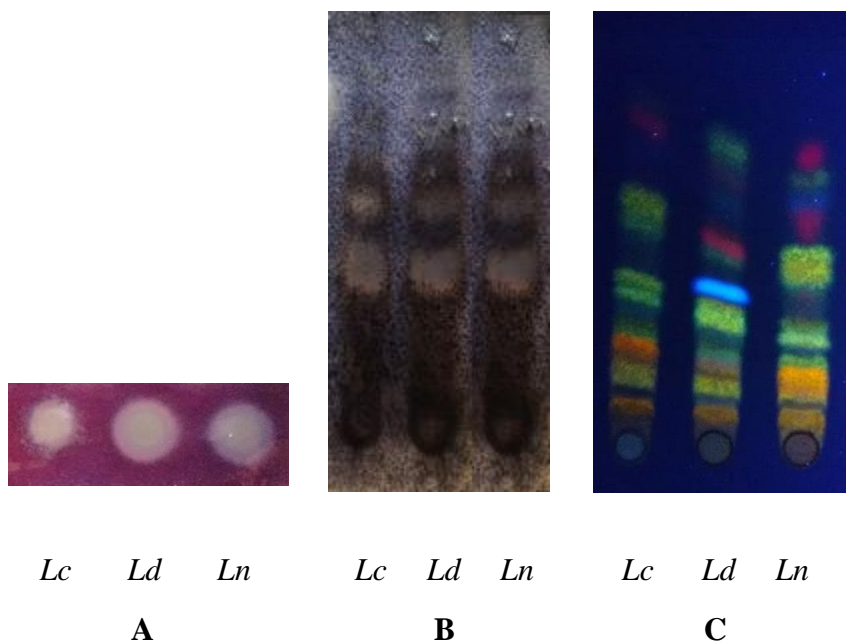


Figura 9. Ensayo bioautográfico de extractos de *Larrea* spp. frente a *C. albicans*. **A.** Siembra puntual de 400 µg EAG en placas de sílica gel F254. **B.** Extractos desarrollados en un sistema cromatográfico en placas de sílica gel F254 utilizando tolueno/acetona/cloroformo (4,5:3,5:2,5; v/v/v). En ambos casos las placas fueron inoculadas con *C. albicans*, incubadas a 37°C y reveladas con una sal de tetrazolium (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium) para determinar la viabilidad celular. **C.** Extracto etanólico desarrollado igual que en **B.**, revelado con NP y visualizado con luz ultravioleta de 365 nm. *Lc*: *Larrea cuneifolia*; *Ld*: *Larrea divaricata*; *Ln*: *Larrea nitida*.

2.4.1.2. Determinación cuantitativa de la actividad antifúngica

Se realizaron ensayos *in vitro* utilizando 10 cepas de levadura obtenidas de exudados vaginales de pacientes con infección vaginal causada por levaduras. Tal como se indicó en el Capítulo 2 y 3, se incluyeron tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, tres de *C. albicans*, tres de *C. glabrata* y una cepa de *C. tropicalis*. Algunas cepas de *S. cerevisiae* y *C. albicans* y no *albicans* son susceptibles a azoles como el fluconazol, voriconazol, itraconazol (85%) y resistentes (R) (15%). Las especies de *Candida* y *Saccharomyces* también fueron susceptibles a la nistatina y a la anfotericina B (Tabla 3).

Los ensayos de microdilución en medio líquido demostraron que los extractos de *Larrea* son eficaces contra las especies de levaduras ensayadas. Los valores de CIM₅₀ se encontraron alrededor de 25 µg EAG/ml en todos los casos, mientras que los valores de CIM₉₀ (de 25 a 100 µg EAG/ml) evidencian que los extractos de *L. divaricata* y *L. nitida* resultaron más activos que el extracto de *L. cuneifolia* (Tabla 3). Los valores de CIM obtenidos fueron similares a los reportados por Svetaz y col. (2010), para un extracto etanólico de *L. cuneifolia*, e inferiores a los reportados para un extracto

etanólico de *L. divaricata* (ambos extractos presentaron una CIM de 500 µg/ml frente a *C. albicans* y *S. cerevisiae* aislados de otras fuentes), demostrando una mayor potencia para los extractos ensayados en este trabajo de Tesis Doctoral sobre cepas levaduriformes aisladas de candidiasis vaginal.

La actividad de los extractos se evaluó adicionalmente en términos de concentración fungicida mínima (CFM), para determinar si los resultados de susceptibilidad antifúngica se correlacionaban con su capacidad de inhibir de manera irreversible el desarrollo de las levaduras. Para todos los aislamientos, los valores de CFM de los extractos fueron de dos a cuatro veces superiores a los valores de CIM₉₀ (Tabla 3).

Por otro lado, los ensayos frente a lactobacilos mostraron que si bien todos los extractos de *Larrea* spp. actuaron como inhibidores del crecimiento de *L. casei* CRL1267, *L. paracasei* CRL1291 y *L. johnsonii* CRL1292 aislados de vagina humana, los valores de CIM resultaron superiores a los valores de CIM obtenidos frente a cepas de *Candida* (> 400 µg/ml). Estos resultados indicarían que los extractos ensayados no afectarían la viabilidad de la microbiota bacteriana en el rango de concentraciones necesarias para inhibir a las levaduras, por lo que podrían utilizarse para el desarrollo de fitoterápicos de uso vaginal. De acuerdo con el sistema de clasificación propuesto por Tangarife-Castaño y col. (2011), podríamos considerar a los extractos de *L. nitida* y *L. divaricata* como agentes antifúngicos fuertes y al extracto de *L. cuneifolia* como inhibidor fuerte o moderado dependiendo de la especie de levadura evaluada.

La actividad antifúngica de los extractos de *Larrea* podría atribuirse a la presencia de lignanos tales como ANDG y epoxilignanos. Otros autores han demostrado la actividad antifúngica para ANDG y compuestos derivados, incluso se ha descrito para estos compuestos un efecto de hormesis, es decir, una estimulación del crecimiento de *Saccharomyces pombe* a bajas concentraciones e inhibición a altas concentraciones de lignanos (Lu y col., 2010; Li y col., 2013; Hernández-Damian y col., 2014). El compuesto 3,4,3', 4'-tetrahidroxi-7,7'-epoxilignano identificado en los extractos de las especies de *Larrea* fue descrito previamente en propóleos y se demostró actividad inhibitoria del crecimiento de *Candida* spp. y *Cryptococcus neoforms* (Agüero y col., 2011).

Fourie y col. (2017) demostraron la capacidad del ANDG de inhibir la formación de biofilm por *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que no influyó en la formación de biopelículas de *C. albicans* (excepto en la producción de exopolisacáridos).

Tabla 3. Efecto de extractos de *Larrea* spp. sobre cepas de *Candida* spp. y *S. cereviceae* aisladas de infecciones vaginales.

Cepa	N° de colección	Fenotipo de aislados clínicos	<i>L. cuneifolia</i> (µg EAG/ml)		<i>L. divaricata</i> (µg EAG/ml)		<i>L. nitida</i> (µg EAG/ml)	
			CIM 90/50*	CFM	CIM 90/50*	CFM	CIM 90/50*	CFM
<i>C. albicans</i>	144783	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	400/25	>800	100/25	400	100/25	400
	134333	Flu ^R ,Am ^S ,Ny ^S	400/25	>800	100/25	400	100/25	400
	2089	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	400/25	>800	100/25	200	100/25	200
<i>C. glabrata</i>	031646	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	400/25	>800	100/25	200	50/25	100
	042030	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	400/25	>800	50/25	100	50/25	100
	031982	Flu ^R ,Am ^S ,Ny ^S	400/25	>800	50/25	200	50/25	100
<i>C. tropicalis</i>	1841	Flu ^S ,Am ^S Ny ^S	400/25	800	100/25	100	100/25	200
<i>S. cerevisiae</i>	134528	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	50/25	100	50/25	100	50/12,5	100
	134544	Flu ^R ,Am ^S ,Ny ^S	100/25	800	50/25	100	50/25	100
	124263	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	50/25	400	25/25	100	50/12,5	100
<i>C. parapsilosis</i>	134410	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	400/50	800	100/25	200	100/12,5	100
<i>C. krusei</i>	134409	Flu ^R ,Am ^S ,Ny ^S	100/12,5	200	50/12,5	200	50/12,5	100

*Los valores de CIM representan el 90 y 50% de inhibición del crecimiento en comparación con el crecimiento de control. Flu: Fluconazol; Am: Anfotericina B; Ny: Nistatina; R: Resistente; S: Sensible.

2.4.2. Actividad antioxidante

La candidiasis vulvovaginal está asociada con señales que siguen a las interacciones entre *Candida* y el epitelio vaginal que promueven la liberación de radicales libres con la consiguiente respuesta inflamatoria que resulta del daño de la mucosa (Fisher, 2012). El extracto de *L. divaricata* fue más activo en el ensayo del ABTS^{•+} que los extractos de *L. cuneifolia* y *L. nitida*, con valores CD₅₀ de 6,72; 10,29 y 12,14 µg PS/ml, respectivamente (Tabla 4). La potencia fue superior a la reportada por Carabajal y col. (2017) para extractos acuosos de jarillas (71,2±3,3 en *L. cuneifolia* y 19,7±0,2 en *L. divaricata*) y similar a la obtenida con un extracto hidroalcohólico de flores de *Zuccagnia punctata* (CD₅₀ de 10,86 µg PS/ml) (Moreno y col., 2015).

En el ensayo de la inhibición de la hemólisis oxidativa, todos los extractos de *Larrea* exhibieron un fuerte efecto protector sobre la lipoperoxidación de los glóbulos rojos, con valores de CI₅₀ de 0,30 a 0,56 µg PS/ml (Tabla 4), superior al efecto del BHT, un antioxidante sintético, y a la quercetina, un antioxidante natural.

Por otro lado, los extractos depuraron el radical hidroxilo con una potencia superior a la quercetina, un conocido antioxidante depurador de especies reactivas de oxígeno. Los

extractos no fueron tan eficientes en remover el H₂O₂ como lo fueron frente al radical hidroxilo, la potencia fue 100 veces inferior a la que tienen frente al radical hidroxilo. La capacidad antioxidante de los extractos (depuración de radical catión ABTS, inhibición de la lipoperoxidación de glóbulos rojos y depuración de radical hidroxilo) se podría atribuir en parte a la presencia del lignano ANDG, compuesto con conocida potencia antioxidante presente en las especies estudiadas (Lee y col., 2003; Anesini y col., 2004; Guzmán-Beltrán y col., 2008; Fourie y col., 2017).

Tabla 4. Actividad antioxidante de extractos de tres especies de *Larrea* y drogas comerciales usadas como referencia.

Muestra	ABTS ^{•+}	AAPH	•OH	H ₂ O ₂
	CD ₅₀ (µg PS/ml)	CI ₅₀ (µg PS/ml)	CD ₅₀ (µg PS/ml)	CD ₅₀ (µg PS/ml)
<i>L. cuneifolia</i>	10,29±0,50 ^d	0,30±0,01 ^a	1,73±0,04 ^a	191,81±5,20 ^d
<i>L. divaricata</i>	6,72±0,20 ^c	0,55±0,02 ^b	1,18±0,04 ^a	175,02±5,80 ^c
<i>L. nitida</i>	12,14±0,60 ^e	0,56 ±0,01 ^b	1,11±0,03 ^a	192,12±5,21 ^d
BHT	3,50±0,20 ^b	1,20±0,10 ^d	-	-
Quercetina	1,40±0,10 ^a	0,90±0,08 ^c	30,0±2,00 ^b	38,00±3,20 ^a
ANDG	2,60±0,20 ^b	1,12±0,05 ^d	36,0±2,90 ^c	52,00±4,50 ^b

E: extracto; BHT: butil hidroxitolueno; ANDG: ácido nordihidroguayarático. Los valores se reportan como media ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna para cada especie vegetal indicaron diferencias significativas en la actividad antioxidante de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

2.4.3. Actividad antiinflamatoria

Como se indicó en el punto 2.4.1. los procesos infecciosos vaginales están asociados a procesos inflamatorios locales, de allí la importancia que el extracto a usar para el tratamiento de la candidiasis vaginal no solo tenga actividad inhibidora del crecimiento de *Candida* sino que sea capaz de reducir los eventos inflamatorios, es decir, un extracto multipropósito. Todos los extractos de *Larrea* mostraron capacidad inhibidora de las enzimas proinflamatorias COX-2, sFLA₂ y LOX. A la concentración de 50 µg EAG/ml, los extractos mostraron un efecto inhibidor del 50% o más sobre la actividad de las enzimas LOX y COX-2 (Tabla 5). Aunque el potencial inhibidor de sFLA₂ fue menor que para las otras enzimas proinflamatorias, su efecto fue más alto que los antiinflamatorios comerciales, tales como naproxeno e indometacina. Estos resultados

indican que los fitocomplejos son una buena alternativa para el control de los procesos inflamatorios. El extracto de *Larrea divaricata* fue el más activo inhibiendo las tres enzimas proinflamatorias, con valores de CI_{50} de $19,7 \pm 0,3$ μg EAG/ml para LOX, $41,7 \pm 1,5$ μg EAG/ml para COX-2 y $63,6 \pm 1,5$ μg EAG/ml para sFLA₂. Los extractos de *Larrea* fueron más activos como agentes antiinflamatorios que los de otras plantas de regiones áridas de Argentina (*Junellia* spp., *Parastrephia* spp. y *Baccharis* spp.) (Torres Carro y col., 2015).

La actividad antiinflamatoria de los extractos de *Larrea* podría atribuirse a la presencia de quercetina y sus derivados (Zhang y Lokeshwara, 2012) y de lignanos, como se informó previamente para *L. tridentata* (Schmidt y col., 2012). Fourie y col. (2017) informaron la capacidad del lignano ANDG de inhibir enzimas proinflamatorias, y producir una disminución de los eicosanoides PGE₂, PGF₂ α y 15-HETE, producidos por biofilms de *Candida*.

Tabla 5. Efecto del extracto seco de *Larrea* spp. (50 μg EAG/ml) y de compuestos antiinflamatorios comerciales (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre las enzimas del metabolismo del ácido araquidónico.

Muestra	Inhibición de enzima (%)		
	LOX	COX-2	sFLA ₂
<i>L. cuneifolia</i>	53,37 \pm 2,70 ^a	57,92 \pm 2,01 ^b	17,06 \pm 0,80 ^b
<i>L. divaricata</i>	94,41 \pm 3,40 ^b	59,94 \pm 1,50 ^b	39,28 \pm 1,50 ^c
<i>L. nitida</i>	94,17 \pm 3,20 ^b	49,39 \pm 1,50 ^a	30,16 \pm 1,40 ^c
Naproxeno	95,00 \pm 2,80 ^b	-	12,00 \pm 0,60 ^a
Indometacina	-	-	16,00 \pm 0,80 ^b
Nimesulida	-	100,0 \pm 5,0 ^c	-

LOX: lipoxigenasa; COX-2: ciclooxigenasa-2; sFLA₂: fosfolipasa A₂. Los valores se presentan como media \pm desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna para cada especie de la planta indicaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

2.4.4. Actividad mutagénica. Test de Ames

Teniendo en cuenta que el número de revertantes/placa inducido por las distintas concentraciones de los extractos fue semejante al observado en el control negativo (revertantes espontáneos), y que la Relación de Mutagenicidad en todos los casos resultó menor a 1,5 (Tabla 6), se puede decir que no existen en los extractos compuestos

que causan mutaciones del tipo “frameshift” (TA98), o sustitución de bases (TA100). La ausencia de una respuesta mutagénica por parte de los extractos a través del test de Ames es un avance positivo en la determinación del uso seguro de estas especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional.

Carabajal y col. (2017) demostraron ausencia de mutagenicidad en extractos acuosos de *L. cuneifolia* y *L. divaricata*. Además, se informó que el lignano ANDG, presente en las tres especies de *Larrea*, posee varias propiedades benéficas y está implicado en la prevención del cáncer (Hwu y col., 2011; Mundhe y col., 2015), por tener actividades antimutagénicas y antitumorales (Wang y col., 1991).

Los extractos acuosos de las hojas de *L. divaricata* demostraron actividad antimutagénica sobre una línea celular linfoide BW 5147 (Anesini y col., 1996a; 1996b; Davicino, 2011a; 2011b). Se estudió también la actividad antitumoral *in vivo* en carcinomas inducidos espontánea o químicamente. En principio la actividad antineoplásica estaría dada por la presencia de terpenos y flavonoides en las hojas (Anesini, 1996b). Finalmente, Bongiovanni y col. (2008) demostraron que los extractos metanólicos y diclorometánicos de *L. divaricata* exhiben un pronunciado efecto citotóxico al afectar la viabilidad de la línea celular MCF-7 (un adenocarcinoma de mama humano), mientras que se observó un leve efecto citotóxico por parte del extracto acuoso.

Tabla 6. Número de revertantes/placa y relación de mutagenicidad en *S. typhimurium* TA98 y TA100 con distintas dosis de los extractos hidroalcohólicos de *Larrea*.

Muestra	µg EAG/placa	TA 98 (-) S9	TA 100 (-) S9	RM TA98	RM TA100
<i>Larrea cuneifolia</i>	500	41±8 ^a	ND	1,20	ND
	250	36±2 ^a	130±2 ^a	1,05	1,18
	125	41±5 ^a	120±2 ^a	1,20	1,09
<i>Larrea divaricata</i>	500	36±1 ^a	ND	1,05	ND
	250	38±3 ^a	111±16 ^a	1,11	1,01
	125	43±4 ^a	124±11 ^a	1,26	1,12
<i>Larrea nitida</i>	500	ND	ND	ND	ND
	250	38±1 ^a	122±21 ^a	1,11	1,10
	125	36±1 ^a	117±9 ^a	1,05	1,06
Control positivo ¹		1222±109 ^b	723±171 ^b		
Control negativo ²		34±2 ^a	110±16 ^a		

Los valores se presentan como media ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna indicaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). ND: Afecta viabilidad de la cepa. ¹Control positivo: 4-nitrofenilendiamina (10 µg/placa). ²Control negativo: DMSO (100 µl/placa).

CAPÍTULO V:

Tetraglochin andina

1. Introducción

La familia Rosaceae es una familia de plantas arbustivas, arbóreas o herbáceas, con o sin presencia de espinas, bajo la cual se encuentran listadas cerca de 2000 especies que se desarrollan en regiones cálidas y templadas de todo el mundo (Milan, 1978).

1.1. *Tetraglochin andina*

Tetraglochin Poepp. es un pequeño género de Sud América que comprende 6 especies, *Tetraglochin acanthocarpa*, *T. caespitosa*, *T. inermis*, *T. andina*, *T. ameghinoi* y *T. alata*, distribuidas entre los Andes desde Perú al sur de Argentina y Chile central llegando a altitudes de hasta 5000 msnm en Bolivia y norte de Argentina (Acosta y col., 2016), Figura 1. Recientes estudios morfológicos y filogenéticos han permitido renombrar a la especie *Tetraglochin cristatum* (Britton) Rothm como *Tetraglochin andina* Ciald (Acosta y col., 2016; Cialdella y Pometti, 2017), cuyos nombres comunes son horizonte, canguia, rancha-rancho, kailla, ñahuaya.

1.2. Descripción botánica

Es una planta arbustiva perenne de hasta 1,5 m de altura, con ramas erectas con macro y braquiblastos, hojas imparipinnadas con 2-3 pares de folíolos opuestos o subopuestos. Las flores son solitarias y los frutos cubiertos por un hipanto alado (Figura 1).

1.3. Distribución geográfica y hábitat

T. andina es una especie que crece en los Andes del norte al centro de Argentina (Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza), entre los 1700 y los 5000 msnm, formando estepas arbustivas (Figura 1). Esta especie crece en las ecorregiones de Prepuna, Puna, y Altoandina (Cabrera 1976; Cabrera y Willink 1973). Se caracteriza por encontrarse en suelos donde se practica una intensa ganadería, por lo que es un indicador de sobrepastoreo (Borgnia y col., 2006; García y Beck, 2006; Genin y Alzérreca, 2006).

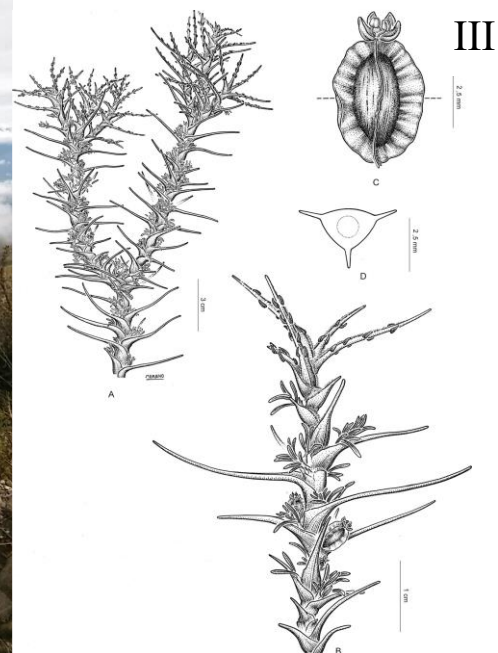
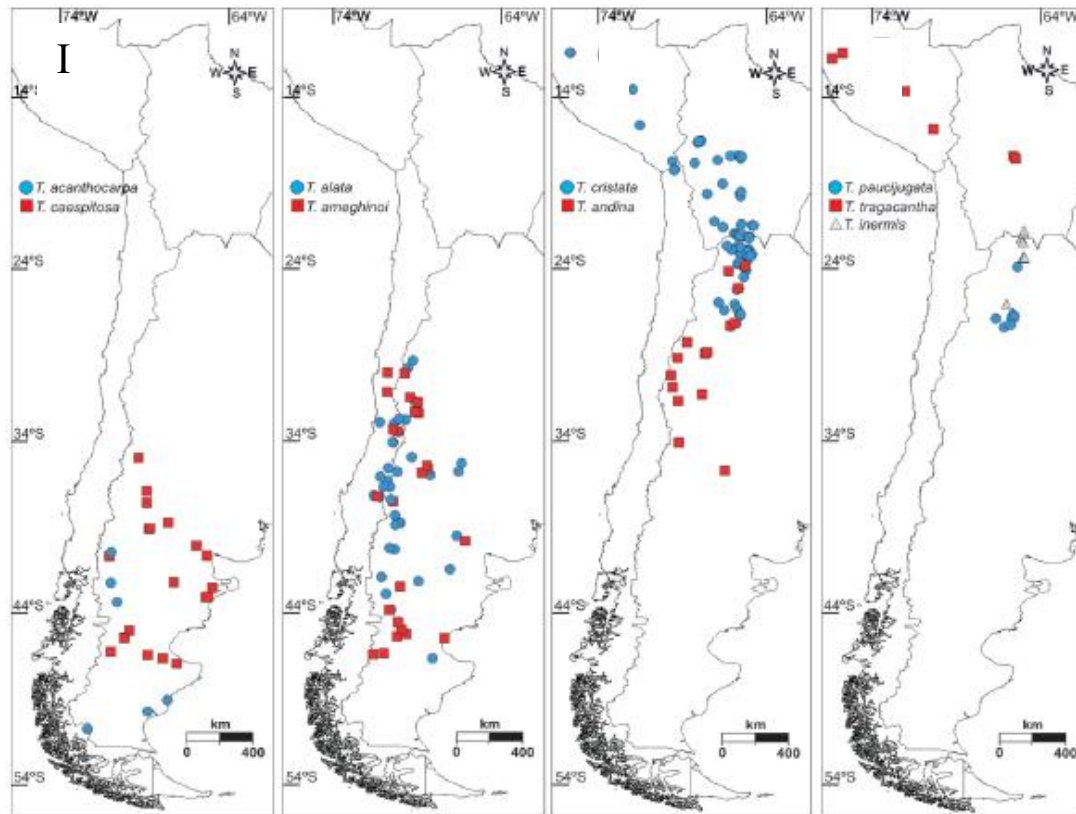


Figura 1. I. Distribución de las diferentes especies de *Tetraglochin*. Imagen obtenida de Acosta y col., 2016. **II.** *Tetraglochin andina*, fotografía tomada durante la recolección de la muestra en Huaca Huasi, Tucumán. Detalle de partes aéreas., **III.** **A.** Partes aéreas. **B.** Detalle de una rama que muestra el eje pecíolo-raquis espinoso persistente, todavía con folíolos en el ápice de la rama. **C.** Detalle del hipanto alado que cubre la fruta. **D.** Sección transversal del hipanto y la fruta. Dibujo del holotipo.

1.4. Usos populares

T. andina es empleada como combustible y como alimento para camélidos y ganado doméstico. Sus frutos también son utilizados como alimento humano y las partes aéreas como medicamentos para tratar procesos inflamatorios e infecciones bacterianas y fúngicas por los habitantes de esta región (García y Beck, 2006; Thomas y col., 2009; Zampini y col., 2009; Torres Carro y col., 2015, 2017).

1.5. Composición química y actividades biológicas

Se ha demostrado actividad antibacteriana de extractos etanólicos (etanol 80°) de partes aéreas de *T. andina* sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Proteus mirabilis* (Zampini y col., 2009) y actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico (etanol 17°) (Torres Carro y col., 2015, 2017). No se encontró en bibliografía informes que validen científicamente el uso de esta especie como antimicótico.

Objetivo general: El objetivo de esta investigación es evaluar el potencial uso de extractos hidroalcohólicos de *Tetraglochin andina* en candidiasis vulvovaginal como antimicótico, antioxidante y antiinflamatorio.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar la materia prima (partes aéreas de *T. andina*) desde el punto de vista morfoanatómico.
2. Obtener un extracto hidroalcohólico a partir de partes aéreas de la especie y estandarizarlo desde el punto de vista químico.
3. Evaluar el efecto del extracto estandarizado sobre el crecimiento de especies de *Candida* aisladas de infecciones vaginales.
4. Evaluar el efecto del extracto estandarizado sobre el crecimiento de *Lactobacillus* spp. aislados de microbiota vaginal normal.
5. Evaluar la capacidad de extractos estandarizados de controlar los procesos oxidativos e inflamatorios asociados a la candidiasis vaginal.

2. Resultados y discusión

2.1. Caracterización morfoanatómica de *T. andina*

2.1.1. Caracteres macroscópicos

Las ramas de *T. andina* son erectas con macro y braquiblastos cubiertos por la base de los pecíolos; vainas glabras en la región central a densamente vellosas en el margen (Fig. 2A y D). Las hojas imparipinnadas presentan 2-3 pares de folíolos opuestos a subopuestos que se desprenden fácilmente, raquis glabro en la región media a pubescente en el extremo apical, 10-16 mm de longitud (Fig. 2E). Las hojas de los macroblastos y la hoja basal del braquiblasto muestran un eje del pecíolo-raquis persistente, endurecido a ligeramente duro, espinoso, marrón, glabro en la madurez, recto o ligeramente curvado, folíolos fácilmente caducifolios; leptofilia a nanofilia (0,5) 1,5-2,8 (3,3) cm de largo. Las hojas de los braquiblastos son leptofilas de 7-15 mm de largo (Fig. 2D-E). Los folíolos son sésiles, (2,1) 3,5-5,5 (7,2) × (0,4) 0,6-1 mm, oblongo, con ápice agudo acuminado y base obtusa, margen entero revuelto, glabro, raramente con pocos pelos cerca del margen del lado adaxial (Fig. 2F-H). El patrón de venación del folíolo terminal presenta vena primaria pinnada, masiva con curso recto. Las venas secundarias se alternan, cladodromas a reticulodromas, con un espaciado irregular que aumenta gradualmente hacia la base, formando ángulos obtusos agudos a rectos, raros, con la vena principal. Las dicotomías a venas terciarias reticuladas al azar forman la venación final medialmente ramificada con vetillas que terminan libremente (Figuras 2F-H).

Las flores son solitarias y axilares en los braquiblastos. Sépalos de 1,2 mm de largo, ovados-elípticos, agudos, glabros. Apétalo, 3 estambres, estigma fimbriado (Fig. 2B). Frutos cubiertos por el hipanto, 4-9 × 2,5-6 mm, alados, con 3 alas de 0.5-2 mm de ancho, dúctiles, duros, glabros, con margen completo a ligeramente erosivo, todos igualmente desarrollados, raramente uno de ellos más estrecho o irregular (Fig. 2C).

2.1.2. Caracteres microscópicos

Anatómicamente, la base de los pecíolos en visión paradermal presentó células epidérmicas elongadas poliédricas, con paredes anticlinales gruesas y rectas (Fig. 3A-B). La epidermis inferior mostró células más pequeñas y raramente estomas de tipo anomocíticos o ciclocíclicos (Fig. 3B). El margen presentó aspecto crenado con tricomas unicelulares no glandulares (231,26±83,01 μm) y tricomas capitados glandulares con tallo uniseriado de cuatro o cinco células y cabeza multicelular globosa (135,27±67,82 μm) (Fig. 3C). La misma disposición se observa en el pecíolo-raquis

con la diferencia de que presenta abundantes tricomas glandulares en el extremo apical y estomas en ambas superficies epidérmicas (Fig. 3D-E). En el corte, la vaina presentaba alas y tres nervios prominentes conformados por haces vasculares colaterales individuales con refuerzos de fibras en el polo del floema, el parénquima circundante era homogéneo y esclerificado (Fig. 4A). Hacia el pecíolo-raquis las alas disminuyen, formando refuerzos de colénquima laminar en posición marginal y sub-epidérmica, hasta desaparecer y presentar una forma circular. Se observaron drusas de oxalato de calcio en el parénquima que rodea los haces vasculares. Los haces vasculares se aproximan para formar un solo nervio constituido por tres haces vasculares colaterales con fuertes cubiertas de fibra adaxial y abaxial (Fig. 4B-C).

En la vista frontal, las hojuelas son hipostomáticas con células epidérmicas poliédricas elongadas, con paredes anticlinales rectas; raramente se observan tricomas no glandulares o glandulares, como se describió previamente (Fig. 3F-G). El índice de empalizada varió entre 13,75 y 14,05. La epidermis inferior mostró células más pequeñas por debajo del margen revuelto y estomas anomocíticos ($25,84 \pm 2,36$ mm de largo por $21,67 \pm 1,85$ mm de latitud para las células oclusivas) hundidos y distribuidos a lo largo de las criptas por el margen revuelto de la hoja, densidad $130,16 \pm 36,81$ estomas por mm^2 (Fig. 3G). En la sección transversal, el folíolo resultó isolateral con cutícula gruesa ($4 \pm 0,7$ mm para ambas superficies epidérmicas), epidermis uniseriada con paredes periclinales externas ($39,36 \pm 4,13$ mm y $38,72 \pm 10,72$ mm para las superficies adaxial y abaxial respectivamente), 2-3 capas de parénquima adaxial en empalizada ($69,57 \pm 12,34$ mm) y 1-2 capas de parénquima empalmado abaxial ($55,35 \pm 9,23$ mm). Las venas primarias, secundarias y terciarias presentaron haces vasculares colaterales rodeados de vainas parenquimatosas. Se observaron drusas de oxalato de calcio en la capa subepidérmica de la vena media (Fig. 4E).

Las secciones de macroblastos y braquiblastos fueron similares con forma circular, revelando un crecimiento secundario. Se observó un peridermis persistente con anillos de crecimiento contenidos por la presencia de la base del pecíolo. La corteza parenquimatososa mostró 6-10 capas de células cuadrangulares con una disposición radial altamente ordenada. Se observó una reserva continua, con drusas de oxalato de calcio en el floema y abundantes fibras de xilema. La médula, que tiende a colapsarse, estaba formada por células parenquimáticas de paredes gruesas, que se esclerifican centrífugamente (Figura 4F-G).

La maceración de macroblasto, braquiblastos y hojas espinosas reveló abundantes fibras (figura 4H-J), células de parénquima y elementos de vasos.

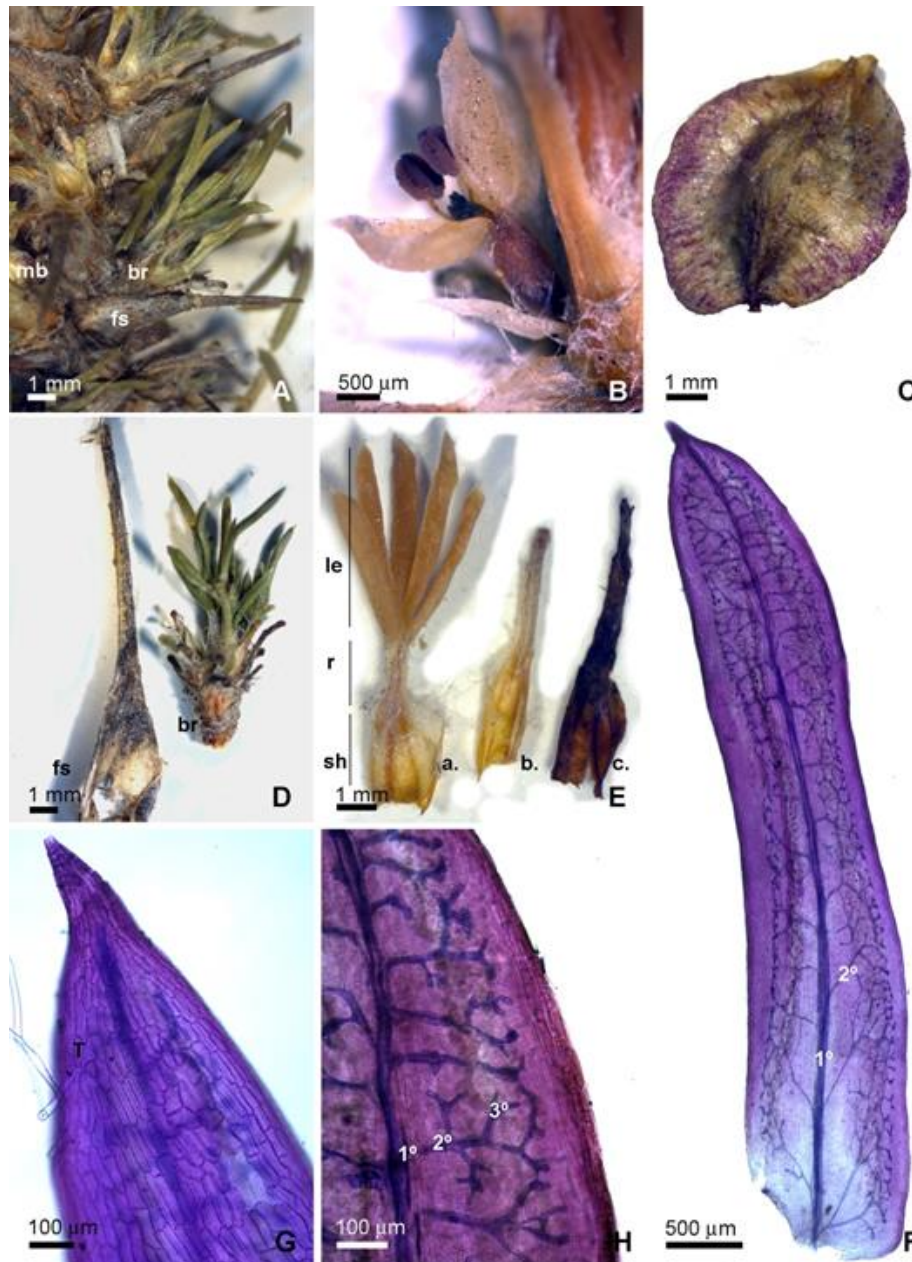


Figura 2. Aspecto general de *T. andina*. **A.** Macroblasto y braquiblasto con hojuelas. **B.** Flor solitaria y axilar en los braquiblastos. **C.** Hipanto con 3 alas con margen erosado. **D.** Macroblasto endurecido de hoja espinosa vieja como espina foliar y aspecto del braquiblasto. **E.** Etapas de la hoja de braquiblasto; (a) hoja apical con folíolos; (b) hoja espinosa que perdió sus folíolos; (c) hoja espinosa vieja endurecida; **F.** Aspecto general de la arquitectura foliar. **G.** Ápice agudo acuminado del folíolo. **H.** Detalle de venación, venas terciarias forman la venación máxima con vetillas libres. Referencias: **mb**, macroblasto; **br**, braquiblasto; **fs**, espina foliar; **sh**, vaina; **r**, pecíolo-raquis; **le**, folíolos; **T**, tricoma no glandular; **1°** vena primaria; **2°** vena secundaria, **3°** vena terciaria.

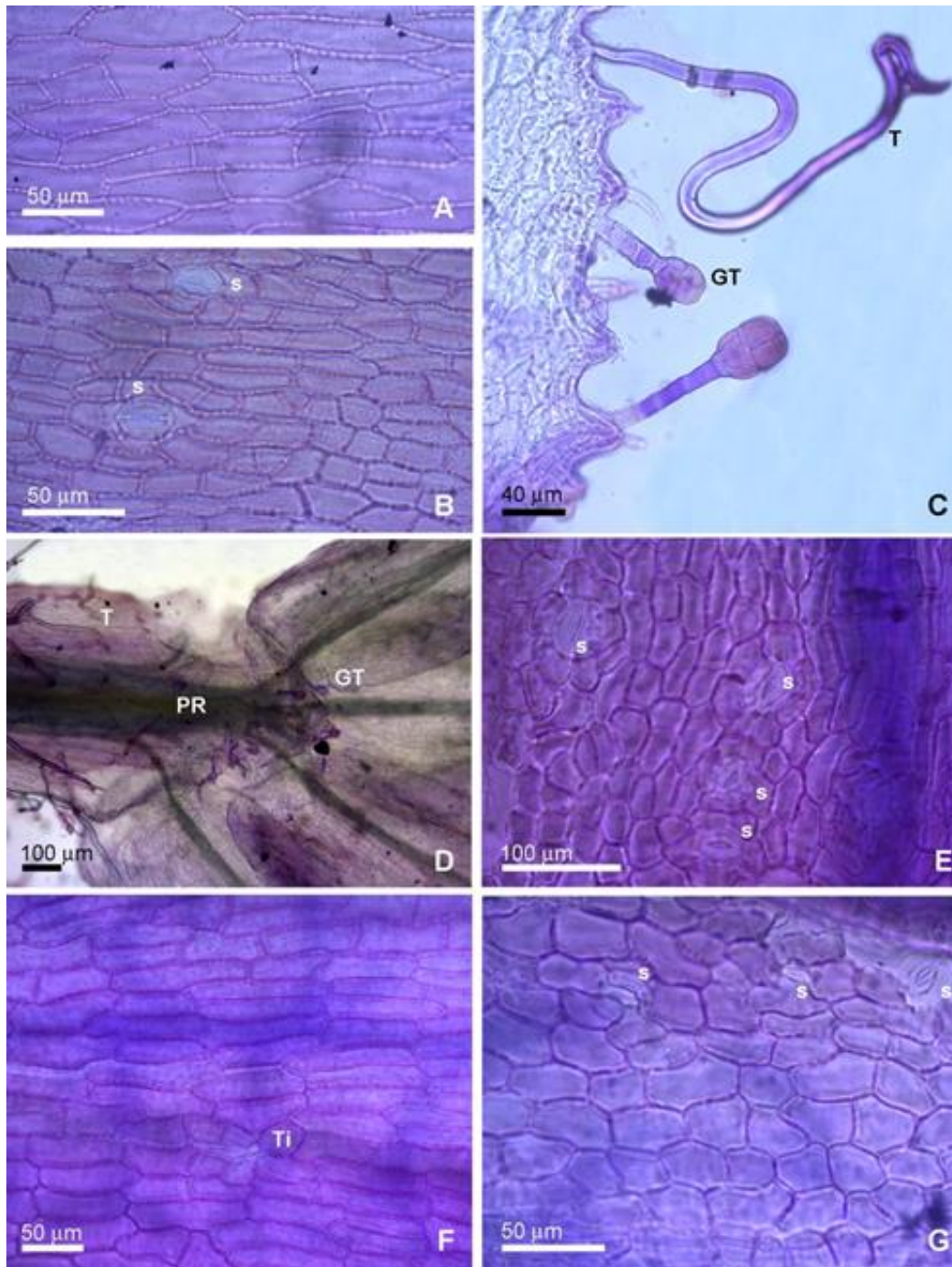


Figura 3. Características microscópicas de *T. andina*. Vista paradormal. **A.** Epidermis adaxial de la vaina. **B.** Epidermis abaxial de la vaina. **C.** Margen hirsuto de la vaina con tricomas unicelulares no glandulares y capilares glandulares. **D.** Aspecto del pecíolo-raquis. **E.** Epidermis adaxial del pecíolo-raquis con estomas. **F.** Epidermis adaxial foliar. **G.** Epidermis abaxial foliar.

Referencias: **s**, estoma; **T**, tricoma no glandular; **GT**, tricomas glandulares; **PR**, pecíolo-raquis; **Ti**, inserción de tricoma.

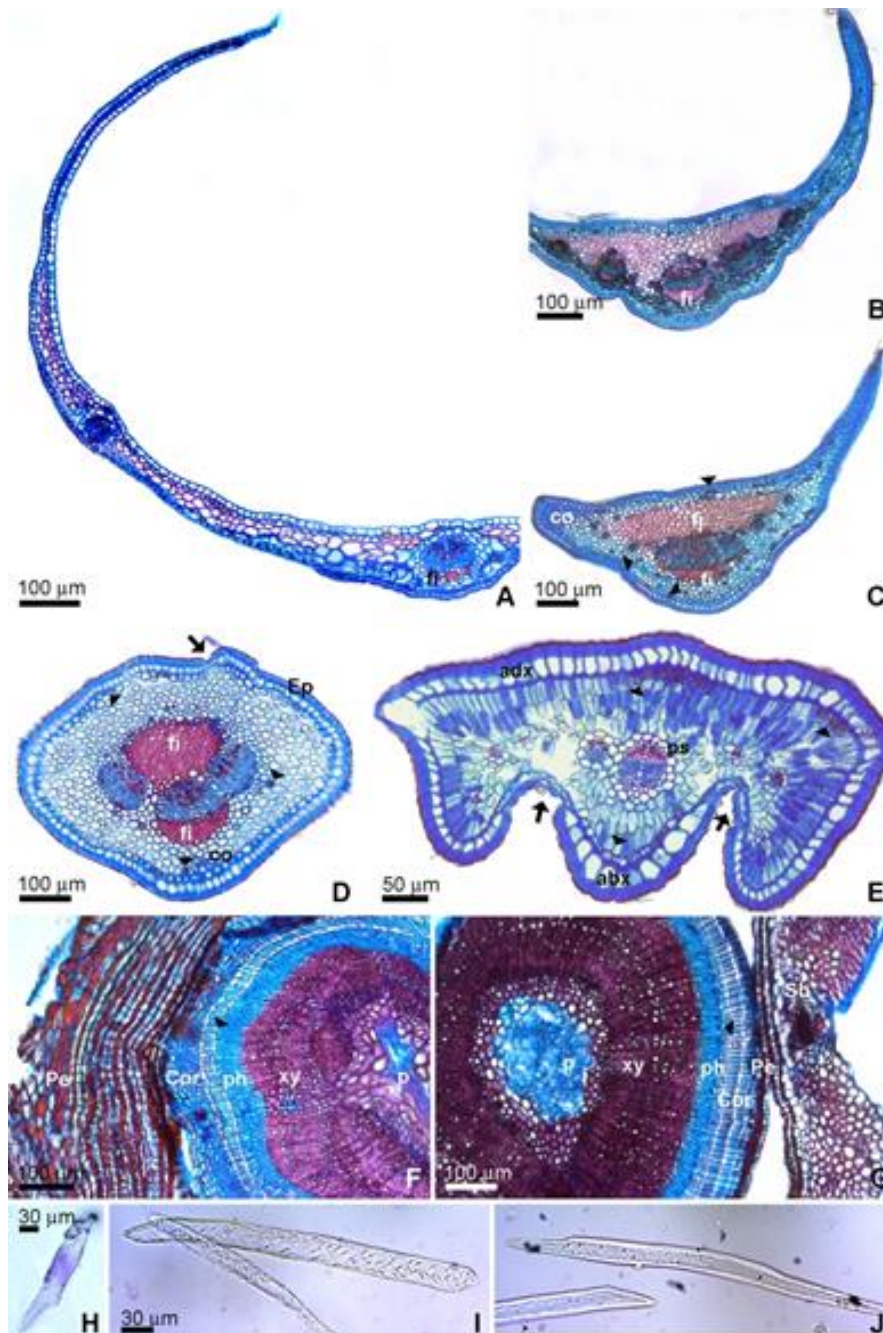


Figura 4. Detalles histológicos de la hoja de *T. andina*. **A.** Sección transversal de la vaina en su extremo proximal cerca del tallo. **B.** Sección transversal de la vaina en su región media. **C.** Corte transversal de la vaina en su extremo distal cerca del pecíolo-raquis. **D.** Corte transversal del pecíolo-raquis. **E.** Sección transversal del folíolo. **F.** sección transversal de braquiblasto. **G.** Sección transversal de macroblasto. **H-J.** Fibras observadas en tejidos macerados.

Abreviaturas: Flecha: estoma; punta de flecha: drusas; fi: fibras; Ep: epidermis; co: colénquima; adx: epidermis adaxial; abx: epidermis abaxial; pd: parénquima; Pe: peridermis; Cor: corteza; ph: floema; xy: xilema; p: médula (médula, parénquima).

2.2. Caracterización fitoquímica de los extractos de *T. andina*

2.2.1. Determinación cualitativa de fitoquímicos

A partir de los extractos hidroalcohólicos de *T. andina* se obtuvo un rendimiento de extracción de $14,3 \pm 1,4$ (% g ES/100 g material vegetal seco).

El análisis cualitativo mostró la presencia de una gran variedad de principios activos, destacándose triterpenos/esteroides, taninos, flavonoides, saponinas y glucósidos cardiotónicos. No se detectaron compuestos alcaloides, cumarinas ni derivados antracénicos libres.

2.2.2. Determinación cuantitativa de fitoquímicos

Se determinó la composición fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *T. andina* por técnicas espectrofotométricas. El extracto contenía un elevado nivel de compuestos fenólicos totales ($386,9 \pm 1,7$ mg EAG/g PS), correspondientes a 38,69% del peso seco, fenólicos flavonoides ($260,4 \pm 2,7$ mg EAG/g PS), 26% del peso seco y compuestos fenólicos no flavonoides ($126,5 \pm 2,3$ mg EAG/g PS), 12,6% del peso seco. El contenido de compuestos fenólicos totales fue superior al reportado por Torres Carro y col. (2015) para una extracción en etanol 17°, mientras que el contenido de fenólicos no flavonoides fue similar. También se detectaron taninos condensados ($60,4 \pm 3,5$ mg de EPB2/g PS) y taninos hidrolizables (26 ± 2 mg EAG/g PS), siendo este último superior al reportado por Torres Carro y col. (2015) en extractos hidroalcohólicos con mayor contenido de agua.

2.2.3. Perfil cromatográfico

2.2.3.1. Cromatografía en capa fina

El análisis fitoquímico de los extractos en cromatografía en capa fina, con visualización bajo luz UV de 254 y 365 nm y revelado con NP (Figura 5), mostró la presencia de compuestos fenólicos, compuestos flavonoides (bandas verde-anaranjadas) y ácidos fenólicos y/o cumarinas (bandas azules) y una zona oscura en el punto de siembra lo que indicaría que existen compuestos que no desarrollan con el sistema de solvente utilizado y probablemente corresponderían a los taninos condensados e hidrolizables presentes en el extracto analizado.

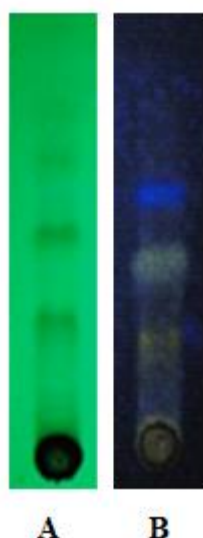


Figura 5. Cromatografía en placas de sílica gel de extractos hidroalcohólicos de *T. andina*. 200 μg de compuestos fenólicos de cada extracto fueron separados por CCF (Merck Kieselgel 60 F254), utilizando como sistema de solvente tolueno/acetona/cloroformo (4,5:3,5:2,5; v/v/v). **A.** Placa visualizada por UV a 254 nm. **B.** Placa revelada con NP y visualizada a 365 nm.

2.2.3.2. HPLC-ESI-MS/MS

El análisis del extracto de *T. andina* permitió la identificación tentativa de 50 compuestos, que incluyen taninos, flavonoides, fenólicos simples y fenilpropanoides (Tabla 1, Figura 6). Los cromatogramas de iones seleccionados se utilizaron para identificar los constituyentes principales y los compuestos relacionados en los extractos. El ion a m/z 301 se usó para detectar ácido elágico y derivados de quercetina, mientras que el ion a m/z 289 permitió la identificación de monómeros y oligómeros de catequina/epicatequina.

El compuesto **1** exhibió un ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ a m/z 481 y mostró una pérdida neutra de 180 uma que conduce a un pico de base de MS^2 a m/z 301, de acuerdo con un resto de ácido elágico. De acuerdo con Fischer y col. (2011) y Sandhu y Gu (2010), este compuesto se asignó como hexahidroxidifeniloil (HHDP)-hexósido. Los elagitaninos presentan unidades de HHDP unidas en dos puntos a una estructura central polihidroxilada, típicamente glucopiranosas. La notable diversidad de estructuras dentro de esta familia se debe en parte a las diferentes posibilidades de unión de HHDP a la estructura de glucopiranosas (Feldman y col., 2003). Los compuestos **3**, **10**, **14**, **15**, **17**, **24** y **30** mostraron un ion molecular de 633 uma. Estos iones exhibieron una pérdida neutra de 332 uma (galloil glucosa), dando lugar a un ion de fragmento intenso a m/z 301, de acuerdo con los derivados galloil-HHDP-hexósidos (Fischer y col., 2011). Los

compuestos **4**, **5**, **7**, **9**, **13**, **16**, **36**, **37**, **39** y **41** fueron identificados como bis-HHDP hexósidos (pedunculaginas), basados en el ion $[M-H]^-$ m/z 783, con iones de fragmentación a m/z 633, 615, 481 y 301 características del galoil-HHDP-hexósido, su derivado deshidratado, HHDP-hexósido y ácido elágico, respectivamente (Fischer y col., 2011). Se observó un ion $[M-H]^-$ m/z 785 para los compuestos **20**, **33** y **35**. Estos mostraron iones de fragmentación a 633, 483 y 301 uma, de acuerdo con galoil-HHDP-hexósido, digaloil-hexósido y ácido elágico, respectivamente. Los compuestos **20**, **33** y **35** se identificaron como isómeros de hexósido de digaloil-HHDP (isómeros de pedunculagina II). También se identificaron dos isómeros de hexósidos de galoil di-HHDP (casuarinas). Los compuestos **40** y **43** mostraron un ion molecular de 935 uma con fragmentos de iones a m/z 783, 633 y 301, característicos de bis-HHDP-hexósido, galloil-HHDP-hexósido y ácido elágico, respectivamente. Cuatro derivados de ácido elágico fueron tentativamente identificados en la muestra. Los compuestos **32**, **34**, **38** y **44** mostraron el ion ácido elágico característico en m/z 301. Los compuestos **32**, **34** y **44** con iones moleculares de 625, 639 y 615 uma, exhibieron pérdidas neutras de hexosa, glucuronato y galoilo (162, 176 y 152 uma), respectivamente, lo que conduce a una base de pico de MS^2 a m/z 463, de acuerdo con el hexósido de ácido elágico. Los compuestos **32**, **34** y **44** se identificaron tentativamente como dihexósido de ácido elágico (**32**), glucurónidohexósido de ácido elágico (**34**) y galloilhexósido de ácido elágico (**44**). Mientras tanto, el compuesto **38** se identificó como hexósido de ácido elágico, basado en el ion $[M-H]^-$ m/z 463, que exhibe una pérdida neutra de 162 uma (hexosa), que conduce a la base de pico MS^2 de m/z 301, de acuerdo con el ácido elágico.

El compuesto **2** se identificó como galoilhexósido, basado en su ion molecular de 331 uma y la pérdida neutra de una hexosa (162 uma), que conduce al ion de fragmentación de ácido gálico característico a m/z 169. Los compuestos **6**, **11** y **23** mostraron un ion $[M-H]^-$ a m/z 483. El compuesto **6** muestra pérdidas consecutivas de 152 (galoilo) y 162 uma (hexosa) que conducen a los iones de m/z 331 y 169. La fragmentación de los compuestos **11** y **23** muestra un ion a m/z 313 (galoil hexosa). Los compuestos **6**, **11** y **23** se identificaron como tres isómeros de digaloilhexósidos diferentes (Fischer y col., 2011). El compuesto **42**, con un ion molecular de 481 uma, mostró una pérdida neutra de ácido gálico (169 uma), conduciendo a un ion a m/z 313 (galoilhexósido) y se identificó tentativamente como un isómero de digaloilhexósido adicional.

Los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico se detectaron en el extracto. El compuesto **8** se identificó tentativamente como ácido hexósido protocatecuico en base a

su ion molecular de 315 uma, cuya fragmentación evidencia una pérdida neutra de 162 (hexosa) que conduce a un ion de m/z 153 de acuerdo con el ácido protocatecuico, mientras que los compuestos **25**, **26** y **27** se identificaron tentativamente como derivados de hexósidos de ácido vanílico. El compuesto **25**, identificado tentativamente como ion pseudomolecular 2 $[M-H]^-$ vanílico, mostró un ion molecular a m/z 659, cuya fragmentación condujo a una base de pico MS^2 de m/z 329, de acuerdo con el hexósido de ácido vanílico. Los compuestos **26** y **27**, con iones de origen a m/z 329 y 409, fragmentos de m/z 167, característicos del ácido vanílico, después de la pérdida de un resto de hexosa (162 uma) en **26** y pérdidas sucesivas de sulfato y hexosa (80 y 162 uma) en **27**. Los compuestos se asignaron tentativamente como hexósido de ácido vanílico (**26**) y el derivado de sulfato de hexósido (**27**). Los compuestos **22** y **31** estaban de acuerdo con los hexósidoisómeros del ácido carboxílico de brevifolina, que muestran $[M-H]^-$ ion a m/z 455 cuya fragmentación condujo a los iones de m/z a 291 y 247 uma (Fischer y col., 2011). Con respecto a los ácidos hidroxicinámicos, los compuestos **12** y **29**, con iones moleculares de 353 y 367 uma, se fragmentan en un pico base a m/z 191 y 193 uma, respectivamente, y se identificaron como ácidos 3-cafeoilquínico y 3-feruloilquínico siguiendo el esquema de orden de Clifford y col. (2003).

Los compuestos **18**, **19**, **21** y **28** se identificaron como proantocianidinas. Los compuestos **18** y **19** exhibieron un ion $[M-H]^-$ a m/z 577 y la señal característica de las unidades de (epi) catequina a m/z 289. Ambos compuestos mostraron una pérdida neutra de 152 uma que conduce a un pico de base MS^2 en m/z 425, de acuerdo con una unidad de catequina adicional (epi) (Lin y col., 2014). Los compuestos se identificaron como dímero isómeros (epi) catequina- (epi) catequina. El compuesto **21**, mostró un ion $[M-H]^-$ a m/z 865 uma, con una pérdida neutra de 289 uma que conduce a un pico base MS^2 a m/z 577 uma, sugiriendo una unidad de catequina (epi) unida a (epi) dímero de catequina (Lin y col., 2014). Por lo tanto, el compuesto **21** se asignó como trímero de (epi)catequina- (epi) catequina- (epi)catequina. El compuesto **28** con una masa molecular de 289 uma, mostró una pérdida neutra de 44 uma que conduce a un pico base de MS^2 de 245, de acuerdo con (epi) catequina. La identidad de (epi) catequina se corroboró mediante la inyección de un estándar de catequina en las mismas condiciones cromatográficas y el patrón de fragmentación iónico.

Se detectaron seis glucósidos de flavonol por los máximos de absorción UV característicos alrededor de 350 nm. El compuesto **45** exhibió $[M-H]^-$ ión a m/z 477 que presentó pérdidas consecutivas de 162 uma (hexosa) y 15 uma (metilo), de acuerdo con

ramnetin/isorhamnetin hexósido. Los compuestos **46-50** se identificaron tentativamente como quercetina rutinósido, hexósido y glucurónido y dos isómeros de pentósido, respectivamente. Las asignaciones se basaron en la pérdida neutra de 308 una correspondientes a rutinosa (compuesto **46**), 162 correspondientes a hexosa (compuesto **47**), 176 pertenecientes a glucurónido (compuesto **48**) y 132 una pertenecientes a pentosa (compuestos **49** y **50**), lo que lleva al pico MS² base a m/z 301, característico de la quercetina.

Entre los compuestos identificados en *T. andina*, se informó previamente la capacidad antioxidante de ácido cafeoilquínico, HHDP, bis HDDP hexósidos (pedunculanginas) y galloil HHDP hexósidos (casuarinas) (Marinova y col., 2009; Preedy, 2015; Sieniawska y Baj, 2017). Se reportó además actividad antioxidante y antiinflamatoria en epicatequina (Aree y Jongrungruangchok, 2016), actividad antiproliferativa y apoptótica de ácido elágico (Seeram y col., 2005), actividad de glucurónido de quercetina como antioxidante, antiviral, antiarteriosclerosis y antiinflamatorio (Wang y col., 2016; Li y col., 2017), actividad de pedunculagina como antitumoral, antiinflamatorio, anticáncer y antimicrobiano (Marzouk 2007; Feldman y Smith, 1996; Hardman 2014; Barry y col., 2001), actividad de casuarina como antioxidante, antiviral , antiinflamatorio (Kwon y col., 2011), actividad de ácido cafeoilquínico como antimicrobiano (Bajko y col., 2016), entre otras.

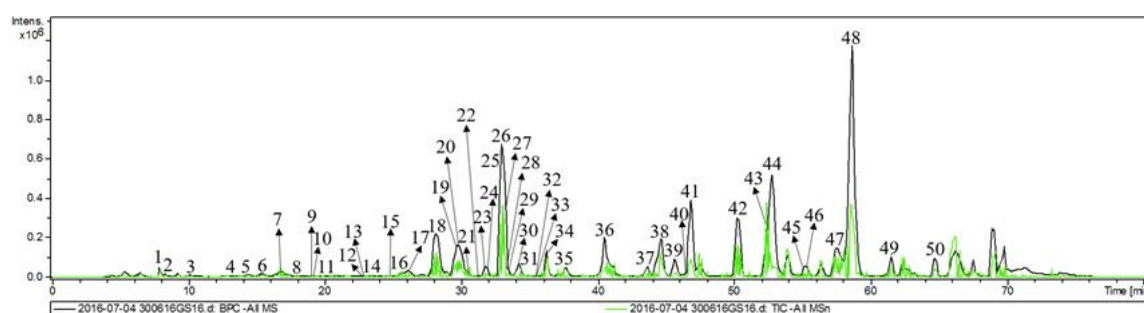


Figura 6. Análisis de HPLC-ESI-MS/MS del extracto de *T. andina*. Detección: UV (280 nm, en negro) TIC-todo MSn (en verde).

Tabla 1. Identificación de compuestos del extracto de *T.andina* por HPLC-ESI-MS/MS.

Compuesto	Tr(min)	[M-H]	MS/MS	Identificación
1	8,0	481	301(100)	HHDP hexósido
2	8,5	331	271(74), 169(100)	Galoil hexósido
3	10,1	633	463(8), 301(100)	Galoil HHDP hexósido
4	12,7	783	481(65), 301(100)	bis-HHDP hexósido (pedunculagina)
5	14,1	783	481(71), 301(100)	bis-HHDP hexósido (pedunculagina)
6	15,6	483	331(100), 169(24)	Digaloil hexósido
7	16,6	783	481(73), 301(100)	bis-HHDP hexósido (pedunculagina)
8	17,5	316	152(100)	Ácido protocatecuico hexósido
9	19,2	783	481(60), 301(100)	bis-HHDP hexósido (pedunculagina)
10	19,6	634	301(100)	Galoil HHDP hexósido
11	20,3	483	313(100)	Digaloil hexósido
12	23,0	354	191(100), 179(32)	Ácido 3-cafeoilquinico ¹
13	23,3	783	481(51), 301(100)	bis-HHDP hexósido (pedunculagina)
14	23,9	634	481(21), 301(100)	Galoil HHDP hexósido
15	24,9	634	421(27), 301(100)	Galoil HHDP hexósido
16	25,7	783	481(43), 301(100)	bis-HHDP hexósido (pedunculagina)
17	26,2	633	301(100)	Galoil HHDP hexósido
18	28,2	577	451(84), 425(100), 289(35)	Dímero (epi)catequina-(epi)catequina
19	29,6	577	451(66), 425(100), 289(6)	Dímero (epi)catequina-(epi)catequina
20	29,7	785	633(49), 483(88), 301(100)	Digaloil-HHDP hexósido (pedunculagina II)
21	30,7	865	695(41), 577(100), 520(7)	Trímero (epi)catequina-(epi)catequina-epi)catequina
22	30,9	455	291(100), 247(19)	Ácido brevifolin carboxílico hexósido ²
23	31,9	483	331(20), 313(18), 271(100)	Digaloil hexósido
24	31,9	633	613(100), 301(68)	Galoil HHDP hexósido
25	32,7	659	329(100)	2[M-H] ácido vanílico hexósido ion pseudomolecular
26	32,9	329	167(100)	Ácido vanílico hexósido ²
27	33,0	409	329(16), 241(100), 167(8)	Ácido vanílico hexósido sulfato
28	33,6	289	245(100), 205(36)	(epi)catequina ³
29	33,8	367	193(100)	Ácido 3-feruloilquinico ¹
30	34,4	633	463(11), 301(100)	Galoil HHDP hexósido
31	34,5	455	291(100), 247(24)	Ácido brevifolin carboxílico hexósido ²
32	34,7	626	463(100), 301(8)	Ácido elágico dihexósido
33	35,2	785	633(23), 483(83), 301(100)	Digaloil HHDP hexósido (pedunculagina II) ²
34	36,4	639	463(100), 301(10)	Ácido elágico glucurónido hexósido
35	37,6	785	633(19), 483(100), 302(23)	Digaloil HHDP hexósido (pedunculagina II)
36	40,4	784	633(100), 301(44)	bis-HHDP hexósido (pedunculagina)
37	43,9	784	615(39), 419(53), 301(100)	bis-HHDP hexósido (pedunculagina)
38	44,7	463	301(100)	Ácido elágico hexósido
39	45,7	784	613(95), 481(35), 301(100)	bis-HHDP hexósido (pedunculagina)
40	46,5	935	633(100), 301(29)	Galoil di HHDP hexósido (casuarinina)
41	46,9	783	613(100), 481(17), 301(85)	bis-HHDP hexósido (pedunculagina)
42	50,3	481	439(100), 313(85)	Digaloil hexósido
43	52,5	934	783(20), 633(19), 301(100)	Galoil di HHDP hexósido (casuarinina)
44	52,5	616	463(100), 301(2)	Ácido elágico galoil hexósido
45	54,7	477	315(100), 301(4)	Isoramnetina hexósido
46	55,4	609	301(100)	Quercetina rutinósido
47	57,3	463	301(100)	Quercetina hexósido
48	58,6	477	301(100)	Quercetina glucurónido
49	61,5	434	301(100)	Quercetina pentósido
50	64,7	434	301(100)	Quercetina pentósido

¹De acuerdo con Clifford y col. (2003). ²De acuerdo con Fischer y col. (2011).

³Confirmado comparando los valores de t_R con el estándar.

2.3. Actividades biológicas del extracto hidroalcohólico de *T. andina*

2.3.1. Actividad antifúngica

2.3.1.1. Determinación cualitativa. Ensayo bioautográfico

Se evaluó la actividad de los extractos de *T. andina* sobre el crecimiento de *C. albicans* por bioautografía en siembra puntual de 200 µg EAG/ml (sin desarrollar con el sistema de solventes), demostrándose la actividad antifúngica del fitocomplejo (Figura 7A).

Posteriormente, se realizó un ensayo bioautográfico frente a *C. albicans* para evaluar si la actividad antifúngica presente en el fitocomplejo se debe a uno o varios compuestos. La actividad antifúngica se vio reflejada en el punto de siembra, pudiendo asumir que los compuestos responsables del efecto podrían ser los taninos identificados en los extractos que no fueron desarrollados con el sistema de solvente utilizado (Figura 7B, C).

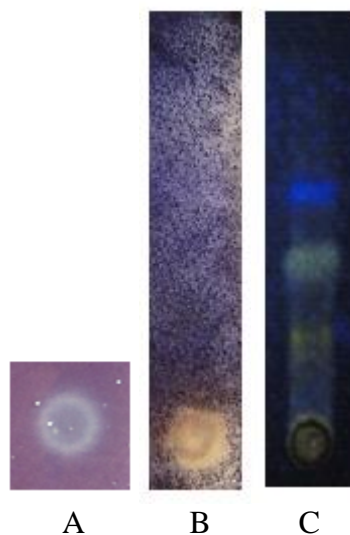


Figura 7. Ensayo bioautográfico del extracto de *T. andina* frente a *C. albicans*. **A.** Siembra puntual con 200 µg EAG en placas de sílica gel F254. **B.** Extracto desarrollado en un sistema cromatográfico en placas de sílica gel F254 utilizando tolueno/acetona/cloroformo (4,5:3,5:2,5; v/v/v). En ambos casos las placas fueron inoculadas con *C. albicans*, incubadas a 37°C y reveladas con una sal de tetrazolium (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium) para determinar la viabilidad celular. **C.** Extracto etanólico desarrollado igual que en (B) y revelado con NP y visualizado con luz ultravioleta a 365 nm.

2.3.1.2. Determinación cuantitativa de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico se ensayó *in vitro* frente a 10 cepas de levaduras obtenidas a partir de exudados vaginales de pacientes con infección vaginal por hongos. Incluyeron tres cepas de *S. cerevisiae*, tres cepas de *C. albicans*, tres cepas de *C. glabrata* y una cepa de *C. tropicalis* (Tabla 2). Algunas cepas de *S. cerevisiae* y *C. albicans* y no albicans son susceptibles a azoles, como fluconazol,

voriconazol, itraconazol (85%), o resistentes (R) (15%). Las especies de *Candida* y *Saccharomyces* también fueron susceptibles a la nistatina y a anfotericina B. El extracto etanólico fue efectivo a baja concentración contra *C. albicans* y no albicans. Los valores de CIM₅₀ frente a la mayoría de las cepas de levadura se encontraron entre 12,5 y 25 µg EAG/ml (Tabla 2). El extracto etanólico mostró potencias comparables contra dos cepas de *S. cerevisiae*, pero fue menos activo contra la cepa 134544 de *S. cerevisiae* (Tabla 2). La actividad del extracto hidroalcohólico también se examinó en términos de concentración fungicida mínima (CFM), a los fines de evaluar si los resultados de susceptibilidad antifúngica se correlacionan con la capacidad de muerte de los extractos. Para todos los aislamientos de *C. glabrata*, los valores de CFM del extracto fueron iguales a los valores de CIM₉₀ (Tabla 2), consistentes con una buena actividad candidacida. El extracto de *T. andina* produjo inhibición del crecimiento de *L. casei* CRL1267, *L. paracasei* CRL1291 y *L. johnsonii* CRL1292 aislados de la vagina humana, con valores de CIM más altos que contra *Candida* (> 400 µg EAG/ml) demostrando que el uso del extracto en infecciones vaginales no afectaría la microbiota normal de lactobacilos de la vagina. De acuerdo con Tangarife-Castaño y col. (2011) podríamos considerar al extracto de *T. andina* como un antifúngico con potencia de fuerte a débil, dependiendo de la cepa analizada.

Como describimos en este capítulo, el extracto de *T. andina* contiene un nivel elevado de taninos hidrolizables de tipo pedunculanginas y casuarininas. Los taninos hidrolizados son compuestos con actividad anti *Candida* demostrada. Existen algunas evidencias de que los compuestos mencionados afectan las células fúngicas a través de la interacción con la bicapa lipídica de la membrana celular; en consecuencia podrían actuar alterando la integridad de la membrana o intercalándose en la pared celular (Martins y col., 2015; Sieniawska y Baj, 2017).

Tabla 2. Efecto del extracto de *T. andina* sobre diferentes cepas de levaduras aisladas de infecciones vaginales.

Cepa	Número de colección	Fenotipo de aislados clínicos	CIM 90/50* µg EAG/ml	CFM µg EAG/ml
<i>C. albicans</i>	144783	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	400/12,5	>400
	134333	Flu ^R ,Am ^S ,Ny ^S	400/12,5	>400
	2089	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	400/12,5	>400
<i>C. glabrata</i>	031646	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	400/12,5	400
	042030	Flu ^S ,Am ^S ,Ny ^S	400/12,5	400
	031982	Flu ^R ,Am ^S ,Ny ^S	400/12,5	400
<i>C. tropicalis</i>	1841	Flu ^S ,Am ^S Ny ^S	400/25	>400
<i>S. cerevisiae</i>	134528	Flu ^S ,Am ^S Ny ^S	25/12,5	>400
	124263	Flu ^S ,Am ^S Ny ^S	400/12,5	>400
	134544	Flu ^R ,Am ^S ,Ny ^S	>400/400	>400
<i>C. parapsilosis</i>	134410	Flu ^S ,Am ^S Ny ^S	400/12,5	>400
<i>C. krusei</i>	134409	Flu ^R ,Am ^S Ny ^S	100/12,5	>400

*Los valores de CIM representan el 90 y 50% de la inhibición del crecimiento en comparación con el control de crecimiento. Flu: Fluconazol; Am: Anfotericina B; Ny: Nistatina; R: Resistente; S: Sensible.

2.3.2. Actividad antioxidante

El extracto etanólico de *T. andina* mostró actividad depuradora de radicales ABTS^{•+} con un valor CD₅₀ de 4,30 µg PS/ml, similar al obtenido con el antioxidante sintético BHT (Tabla 3). En el ensayo de la hemólisis oxidativa, el extracto exhibió un efecto inhibitorio sobre la lipoperoxidación de las membranas de glóbulos rojos de sangre humana con un valor de CI₅₀ de 0,59 µg PS/ml, (Tabla 3), siendo más activo que los antioxidantes quercetina y BHT usados como referencia.

La concentración de polifenoles necesaria para depurar el 50% del H₂O₂ fue aproximadamente cinco veces mayor a la de quercetina, demostrando una menor actividad, mientras que frente al ensayo del [•]OH el extracto fue considerablemente más potente (Tabla 3). El extracto de *T. andina* resultó treinta veces más potente que el antioxidante quercetina.

La actividad antioxidante del extracto etanólico de *T. andina* podría atribuirse al contenido de ácido cafeoilquínico, HHDP, bis HDDP hexósidos (pedunculanginas) y

galloil HHDP hexósidos (casuarinas), compuestos con demostrada capacidad antioxidante (Marinova y col., 2009; Preedy, 2015; Sieniawska y Baj, 2017). Se reportó además actividad antioxidante en epicatequina (Aree y Jongrungruangchok, 2016), ácido elágico (Seeram y col., 2005) y glucurónido de quercetina (Wang y col., 2016), compuestos también presentes en *T. andina*.

Tabla 3. Actividad antioxidante del extracto de *T. andina* ($\mu\text{g PS/ml}$) y drogas comerciales usadas como referencia ($\mu\text{g PS/ml}$).

Muestra	ABTS ^{•+}	AAPH	•OH	H ₂ O ₂
	CD ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CD ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CD ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
E-Ta	4,30±0,12 ^c	0,59±0,02 ^a	0,98±0,03 ^a	188,08±4,90 ^b
BHT	3,50±0,20 ^b	1,20±0,10 ^c	-	-
Quercetina	1,40±0,10 ^a	0,90±0,08 ^b	30,00±2,00 ^b	38,00±3,20 ^a

E: extracto; Ta: *T. andina*; BHT: butil hidroxitolueno. Los valores se reportan como media \pm desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna indicaron diferencias significativas en la actividad antioxidante de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

2.3.3. Actividad antiinflamatoria

Los porcentajes de inhibición de 50 $\mu\text{g EAG/ml}$ (129,23 $\mu\text{g PS/ml}$) del extracto etanólico de *T. andina* para LOX y COX-2 fueron 42,47±0,3 y 45,52±1,8%, respectivamente. La actividad sobre COX-2 fue superior a la reportada por Torres Carro y col. (2015) para *Tetraglochin andina*, en donde se observó que 200 $\mu\text{g PS/ml}$ (extracto en etanol 17°) presentaron un porcentaje de inhibición de 34% de la actividad de COX-2, mientras que 150 $\mu\text{g PS/ml}$ del mismo extracto mostraron una inhibición del 15% de la actividad de LOX (Torres Carro y col., 2017), inferior a la obtenida en nuestras condiciones (etanol 60°). Otros investigadores han demostrado que extractos de *T. andina* son capaces de reducir Fe³⁺ de manera dosis-dependiente con valores de CR₅₀ de 29,7±0,6 $\mu\text{g/ml}$ (Torres Carro y col., 2017). Por otro lado, tienen baja capacidad de depurar Fe²⁺ (41,9±6,0% con 500 μg de extracto seco). En este trabajo se demostró que el extracto de *T. andina* tiene elevada capacidad de transferencia de electrones, por lo que esta especie podría inhibir la actividad de enzimas como LOX preferentemente reduciendo el grupo de hierro no hemo o depurando los electrones del ciclo redox del hierro.

El extracto también mostró un efecto inhibitorio sobre FLA₂ con un porcentaje de inhibición de 34,52±0,8%, superior a los porcentajes obtenidos con los antiinflamatorios comerciales naproxeno e indometacina utilizados como referencia (Tabla 4). De acuerdo con Torres Carro y col. (2017), el extracto de *T. andina* (etanol 17°) no mostró actividad inhibitoria sobre FLA₂, lo que indicaría que los compuestos responsables de esta actividad se extraen solo con mayores concentraciones de etanol. Estos resultados indicarían que los taninos aportarían a la inhibición de FLA₂ y LOX, ya que los niveles de taninos condensados extraídos con etanol 60° de partes aéreas de *T. andina* corresponderían a 60,4±3,5 mg de EPB2/g PS, mientras que los extraídos con etanol 17° se corresponderían con 5,46±0,01 mg de EPB2/g PS (Torres Carro y col., 2015; 2017), en consecuencia en la cantidad de peso seco utilizado en el ensayo tenemos mayor cantidad de este tipo de compuestos que lo encontrado por Torres Carro y col. (2015, 2017).

Se reportó previamente actividad antiinflamatoria de taninos hidrolizables y condensados como casuarinina, pedunculagina, epicatequina y flavonoides como glucorónido de quercetina (Kwon y col., 2011; Lipińska, 2014; Bettaieb y col., 2016; Li y col., 2017), compuestos presentes en *T. andina*.

Tabla 4. Inhibición de las enzimas LOX, COX-2 y sFLA₂ por 50 µg EAG/ml del extracto de *T. andina* y 50 µg/ml de fármacos comerciales de referencia.

Muestras	% Inhibición		
	LOX	COX-2	sFLA ₂
E-Ta	42,47±0,30 ^a	45,52±1,80 ^a	34,52±0,80 ^c
Naproxeno	95,00±2,80 ^b	-	12,00±0,60 ^a
Indometacina	-	-	16,00±0,80 ^b
Nimesulida	-	100,00±5,00 ^b	-

E-Ta: extracto de *T. andina*. LOX: lipoxigenasa; COX-2: ciclooxigenasa-2; sFLA₂: fosfolipasa A₂. Los valores se presentan como media ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna para cada especie de la planta indicaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

2.3.4. Actividad mutagénica. Test de Ames

La evaluación de la mutagenicidad del extracto hidroalcohólico de *T. andina* utilizando cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 indicó que, en las concentraciones bioactivas, el extracto de *T. andina* no induce un incremento del número de revertentes de TA98 y TA100 respecto al número de revertentes espontáneos (relación de mutagenicidad <1,5), lo que indica que se trata de un material no genotóxico (Tabla 5).

Tabla 5. Número de revertantes/placa y relación de mutagenicidad (RM) en *S. typhimurium* TA98 y TA100 con distintas dosis del extracto hidroalcohólico de *T. andina*.

Muestra	µg EAG/ placa	TA 98 (-) S9	TA 100 (-) S9	RM TA98	RM TA100
<i>Tetraglochin andina</i>	500	41±3 ^a	140±12 ^a	1,20	1,27
	250	41±1 ^a	136±8 ^a	1,20	1,23
	125	28±5 ^a	139±23 ^a	0,82	1,26
Control positivo ¹		1222±109 ^b	723±171 ^b		
Control negativo ²		34±2 ^a	110±16 ^a		

Los valores se presentan como media ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna indicaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). ND: Afecta viabilidad de la cepa. ¹Control positivo: 4-nitrofenilendiamina (10 µg/placa). ²Control negativo: DMSO (100 µl/placa).

CAPÍTULO VI:

Sinergismo entre los
extractos de las especies
analizadas

1. Introducción

Se ha demostrado que en general la aplicación de combinaciones de antimicrobianos extiende el espectro de actividad y en muchos casos se logra un efecto sinérgico que mejora el efecto terapéutico y minimiza la resistencia de los microorganismos a los mismos (Wolska y col., 2012). En los últimos años la experimentación *in vivo* de combinaciones de antimicrobianos de naturaleza muy diversa brindó resultados prometedores que podrían acelerar su implementación en tratamientos destinados a medicina humana y veterinaria, agricultura y a la industria alimentaria para combatir a los microorganismos patógenos. Durante milenios las plantas han sido una de las principales fuentes para la obtención de nuevas drogas y se ha comprobado que las infusiones herbales y los aceites esenciales han contribuido enormemente a preservar la salud humana (Amenu, 2014). Generalmente, los estudios biológicos y fitoquímicos de plantas medicinales se han realizado en extractos individuales, y muy poco sobre mezclas o combinaciones de extractos. Sin embargo, la medicina folklórica utiliza muchas recetas y formulaciones basadas en mezclas de extractos de plantas medicinales, como remedios efectivos para curar o aliviar una determinada enfermedad, lo que conlleva a imaginar las innumerables mezclas que se pueden investigar. Estudios realizados por otros autores sobre mezclas de plantas medicinales sugieren que puede existir sinergismo entre extractos (Arnason y col., 2004; Carabajal y col., 2017).

Interacción entre mezclas de antimicrobianos

Una de las estrategias empleadas para combatir el alarmante fenómeno de la resistencia y multi-resistencia a los antibióticos comprende el desarrollo de esquemas terapéuticos innovadores para mejorar la eficacia de los tratamientos a través de la combinación entre compuestos antimicrobianos.

Existen varias razones que justifican el hecho de analizar combinaciones de antimicrobianos:

- 1- la probabilidad de aparición de cepas resistentes a algunos de los antimicrobianos.
- 2- algunos agentes solo se pueden utilizar hasta ciertas concentraciones límites debido a su elevada toxicidad.
- 3- aparición de infecciones polimicrobianas.
- 4- la presencia de sinergismo entre agentes antimicrobianos.

Cuando se combinan dos antimicrobianos, pueden darse cuatro efectos:

a- Indiferencia: la actividad de los dos antimicrobianos no difiere de la actividad del más efectivo en solitario.

b- Aditividad: el efecto combinado es igual a la suma de los efectos observados por cada antimicrobiano por separado.

c- Sinergismo: la actividad de los dos antimicrobianos es significativamente mayor que la adición de las actividades de los dos antimicrobianos separados.

d- Antagonismo: la actividad de los dos antimicrobianos juntos es significativamente menor que la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados.

Los tratamientos convencionales para las enfermedades fúngicas son limitados debido al hecho de que los hongos son organismos eucariotas, por lo que es difícil el desarrollo de un fármaco que sea selectivamente tóxico para la célula fúngica y no para el huésped. En los últimos años la resistencia a terapias antifúngicas tradicionales (azoles y polienos) se ha incrementado, además se conoce que es altamente tóxica y que presenta muchas interacciones y trastornos adicionales. La falta de disponibilidad de antifúngicos convencionales ha llevado a buscar alternativas entre los productos naturales (Tangarife-Castaño y col., 2011). Estos agentes antimicóticos podrían usarse como tal en una terapia complementaria a antifúngicos convencionales o como fuente para la búsqueda de nuevas estructuras químicas con potencial antimicótico.

El sinergismo de drogas entre agentes antimicrobianos conocidos y extractos bioactivos de plantas es un concepto novedoso y constituye una de las nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes (Coutinho y col., 2008; 2009).

Se han encontrado sustancias antimicrobianas de origen natural, presentes en plantas, que potencian el efecto de agentes antimicrobianos sintéticos, dichas sustancias solas carecen de propiedades antimicrobianas, pero cuando se las asocia a antimicrobianos estándares, ellas aumentan el efecto de la droga (Kamatou y col., 2006). Es evidente que muchas veces las plantas adoptan un paradigma diferente – “el sinergismo” – para combatir a las infecciones (Hemaiswarya y col., 2008).

Los fitocompuestos en extractos crudos tienen una complejidad estructural diversa y como ellos son de origen no microbiano, ningún microorganismo, sin importar qué tan bien equipado y desarrollado esté genéticamente, puede montar un efecto supresor *in vitro*. Lo mismo ocurre *in vivo* cuando los fitocompuestos son combinados con la quimioterapia habitual, ya que los fitoquímicos en extractos crudos constituyen firmes barreras a los patógenos microbianos (Dubey y Padhy, 2013).

Recurrir a las plantas buscando nuevos químicos sería una alternativa prudente, no solo por ser fuentes de antimicrobianos, sino también porque gran cantidad de fitocompuestos puros se están utilizando con éxito en la clínica (Dubey y Padhy, 2013). Por lo tanto, muchos de estos fitoquímicos serían una opción como medicina complementaria frente a patógenos multirresistentes.

Los efectos sinérgicos que resultan de la combinación de antibióticos con varios extractos vegetales y compuestos aislados han sido previamente estudiados y experimentados (Ibezim y col., 2006; Esimone y col., 2008; Akinyele y col., 2017; Torres y col., 2017; Bustos y col., 2018), retrasando también la aparición de cepas resistentes (Chambers, 2006).

Recientemente se reportó efecto sinérgico frente a *C. albicans* al combinar antifúngicos entre sí (Fakhim y col., 2016; Lu y col., 2018) y extractos o compuestos puros con antifúngicos (Liu y col., 2017; Sun y col., 2017; Yang y col., 2017; Canturk 2018; Sun y col., 2018; Zaidi y col., 2018).

Atendiendo a todo lo expuesto, en este capítulo se pretende evaluar el efecto de combinaciones binarias entre los extractos de *Zuccagnia punctata* (Zp), *Larrea cuneifolia* (Lc), *Larrea divaricata* (Ld), *Larrea nitida* (Ln) y *Tetraglochin andina* (Ta), con el propósito de considerarlos posteriormente como otra alternativa en la lucha contra infecciones fúngicas.

2. Resultados y discusión

Como se describió en los capítulos anteriores y siguiendo protocolos internacionales se realizó:

- A) La estandarización del material biológico mediante su autenticación por metodología botánica, macroscópica y microscópica.
- B) La puesta a punto de un protocolo de producción de extractos a escala de laboratorio de cinco plantas medicinales nativas.
- C) La estandarización de estos mediante la identificación y cuantificación de marcadores de calidad química.
- D) La determinación de actividad biológica de dichos extractos para estandarizarlos desde el punto de vista biológico.

Hasta aquí, podemos decir que los extractos etanólicos por separado resultaron efectivos inhibidores del crecimiento de las especies de levaduras ensayadas, clasificando a los

extractos de *Z. punctata*, *L. cuneifolia* y *L. divaricata* (CIM de 25 a 100 µg EAG/ml) como antifúngicos fuertes frente a *Candida* de acuerdo con Tangarife-Castaño y col. (2011), mientras que a los de *L. cuneifolia* y *T. andina* (CIM de 25 a 400 µg EAG/ml) se los clasificó como antimicóticos fuertes, moderados o débiles, dependiendo de la especie evaluada. Además, resultaron antioxidantes y antiinflamatorios con diferente potencia, de modo tal que podemos considerar a estos extractos individuales como fitoterápicos multipropósito, antifúngicos, antiinflamatorios y antioxidantes. A partir de estos resultados, se decidió evaluar el efecto de combinaciones binarias de los extractos hidroalcohólicos, en el rango de concentraciones entre 6,25 y 800 µg EAG/ml para definir si las mezclas bi-herbales resultan más efectivas.

2.1. Efecto de las combinaciones de extractos o mezclas bi-herbales sobre el crecimiento de levaduras aisladas de candidiasis vaginal

Los resultados obtenidos indican que las combinaciones entre *Z. punctata* y las especies de *Larrea* son más eficaces como antifúngicos que las combinaciones de especies de *Larrea* entre sí, y entre *Larrea* o *Z. punctata* con *T. andina*. La mejor combinación fue la de *Z. punctata* y *L. cuneifolia* (*Zp/Lc*; 1:4), que mostró efecto sinérgico o aditivo frente a todas las levaduras, con valores de ICFI comprendidos entre 0,500 y 0,750 (Tabla 1). Esto indicaría que la interacción entre los componentes químicos contenidos en ambas especies incrementa la capacidad antifúngica. Previamente, se demostró que los extractos estandarizados de *Z. punctata* presentan chalconas e hidrochalconas mayoritarias, principalmente 2',4'-dihidroxicalcona, y en los extractos de especies de *Larrea* se demostró que el ácido nordihidroguayarático era el compuesto mayoritario. La 2',4'-dihidroxicalcona es activa frente a *C. albicans* (Nuño y col., 2014), al igual que el ácido nordihidroguayarático (Agüero y col., 2011). También se reportó actividad anticándida para ácido quínico y pinocembrina (Ozçelik y col., 2011; Lu y col., 2017) presentes en el extracto de *Z. punctata*.

Las mezclas de *Z. punctata* y *L. divaricata* (*Zp/Ld*; 1:1) y de *Z. punctata* y *L. nitida* (*Zp/Ln*; 1:1) también resultaron activas. *Zp/Ln* mostró sinergismo frente a *C. glabrata*, *C. parapsilopsis* y *S. cerevisiae*, aditivismo frente a *C. albicans* y *C. tropicalis* e indiferencia frente a *C. krusei*. La mezcla *Zp/Ld* presentó un efecto sinérgico frente a *C. glabrata*, indiferente para *C. albicans*, y aditivo para el resto de las cepas.

En las combinaciones en las que se observó sinergismo, los valores de CIM lograron reducirse hasta 16 veces, comparando con la actividad de los extractos individuales,

dependiendo de la cepa ensayada. De esta manera, a modo de referencia, los valores de CIM de los extractos de *L. cuneifolia* y *T. andina* usados individualmente frente a las cepas de *C. glabrata*, fueron de 400 µg EAG/ml en ambos casos, mientras que en las combinaciones los valores fueron de 100 y 25 µg EAG/ml, respectivamente. La mezcla menos activa fue *Ta/Ln*, que mostró efecto indiferente frente a todas las levaduras ensayadas (ICFI entre 1,062-2,250).

El aumento de la capacidad antimicrobiana cuando los extractos herbales son combinados podría explicarse por el mecanismo a través del cual varios constituyentes bioactivos de las plantas afectan diversos sitios blancos y trabajan cooperativamente de una manera sinérgica (Al-Bayati, 2008). Esta estrategia se denomina efectos multi-diana. Este enfoque no es exclusivo para las combinaciones de extractos, sino también para combinaciones entre productos naturales individuales o extractos con quimioterápicos o antibióticos (Hemaiswarya y col. 2008; Rodrigues y col., 2009; Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009).

La evaluación de las potencialidades terapéuticas de las plantas nativas de la Argentina podría potenciar la utilización de estas en el tratamiento de las enfermedades, sobre todo, cuando hay sinergia entre las mismas. Es por ello, que la mezcla de los extractos de *Z. punctata* (especie más activa usada individualmente) con las tres especies de *Larrea* (especies más prometedoras potenciando el efecto en las mezclas) fueron seleccionados para las pruebas de toxicidad, actividad antiinflamatoria y antioxidante, que serán desarrolladas en este capítulo.

La selección de las mezclas más activas se realizó teniendo en cuenta aquellas que mostraron mayor incidencia de efecto sinérgico y/o aditivo, y considerando la relación que presentaban entre sí los extractos, así, por ejemplo, en la mezcla *Zp/Ln* en los casos donde se observó sinergismo la relación entre los componentes de la mezcla era 1:1.

Las mezclas seleccionadas fueron:

- *Zuccagnia punctata/Larrea nitida*: Relación 1:1
- *Zuccagnia punctata/Larrea cuneifolia*: Relación 1:4
- *Zuccagnia punctata/Larrea divaricata*: Relación 1:1

Tabla 1. Índices CFI de combinaciones de extractos frente a levaduras aisladas de infecciones vaginales en humanos.

Cepa	Lc/Zp	Lc/Ta	Lc/Ln	Lc/Ld	Zp/Ta	Zp/Ln	Ld/Zp	Ld/Ln	Ta/Ld	Ta/Ln
<i>C. albicans</i>	100/25* (0,500) ^s	25/800 (2,062) ⁱ	50/200 (2,125) ⁱ	200/100 (1,500) ⁱ	25/100 (0,500) ^s	50/50 (1,000) ^a	200/6,25 (2,062) ⁱ	25/25 (0,500) ^s	50/200 (2,125) ⁱ	50/200 (2,125) ⁱ
<i>C. glabrata</i>	100/12,5 (0,500) ^s	100/25 (0,312) ^s	100/25 (0,750) ^a	50/25 (0,625) ^a	12,5/100 (0,500) ^s	12,5/12,5 (0,500) ^s	12,5/12,5 (0,500) ^s	12,5/25 (0,750) ^a	50/100 (2,125) ⁱ	50/100 (2,125) ⁱ
<i>C. tropicalis</i>	200/25 (0,750) ^a	200/50 (0,625) ^a	25/50 (0,562) ^a	200/200 (2,500) ⁱ	100/25 (1,062) ⁱ	50/12,5 (0,625) ^a	50/50 (1,000) ^a	100/12,5 (1,125) ⁱ	12,5/50 (0,531) ^a	50/200 (2,125) ⁱ
<i>S. cerevisiae</i>	25/12,5 (0,500) ^s	25/400 (1,250) ⁱ	25/12,5 (0,500) ^s	12,5/25 (0,625) ^a	50/12,5 (1,031) ⁱ	12,5/12,5 (0,500) ^s	25/12,5 (0,750) ^a	25/12,5 (0,750) ^a	25/25 (0,562) ^a	25/50 (1,062) ⁱ
ATCC <i>C. parapsilosis</i>	100/50 (0,750) ^a	400/25 (1,062) ⁱ	25/50 (0,562) ^a	25/50 (0,562) ^a	100/12,5 (1,031) ⁱ	25/25 (0,500) ^s	50/25 (0,750) ^a	25/50 (0,750) ^a	25/100 (1,062) ⁱ	25/100 (1,062) ⁱ
ATCC <i>C. krusei</i>	12,5/25 (0,625) ^a	200/25 (2,250) ⁱ	50/50 (1,500) ⁱ	25/12,5 (0,500) ^s	50/12,5 (1,125) ⁱ	50/25 (1,500) ⁱ	25/12,5 (0,750) ^a	50/25 (1,500) ⁱ	25/25 (0,750) ^a	200/12,5 (2,250) ⁱ

*µg EAG/ml de cada extracto en la combinación. Los valores del índice CFI se muestran entre paréntesis. ^s Efecto sinérgico ($\leq 0,5$); ^a Efecto aditivo ($> 0,5$ y ≤ 1); ⁱ Efecto indiferente (> 1 y < 4). CFI: Concentración Fraccionaria Inhibitoria. Lc: *Larrea cuneifolia*; Zp: *Zuccagnia punctata*; Ln: *Larrea nitida*; Ld: *Larrea divaricata*; Ta: *Tetraglochin andina*.

2.2. Estandarización química de la formulación bi-herbal

La estandarización es un importante aspecto para asegurar la calidad, eficacia y la seguridad de una formulación bi-herbal, logrando el efecto terapéutico buscado y evitando las variaciones de lote a lote. En el caso de las mezclas binarias *Zp/Ld*; *Zp/Ln*; *Zp/Lc* seleccionadas en este trabajo como antifúngicos se cuantificaron los principales grupos de compuestos fenólicos y los resultados obtenidos se compararon con el contenido de los mismos compuestos en las especies vegetales individuales que se utilizaron para preparar las combinaciones. Como se puede ver en la Figura 1, no se observaron grandes variaciones en el contenido de fenólicos totales ni en los otros tipos de fenólicos entre las mezclas bi-herbales y las especies vegetales individuales.

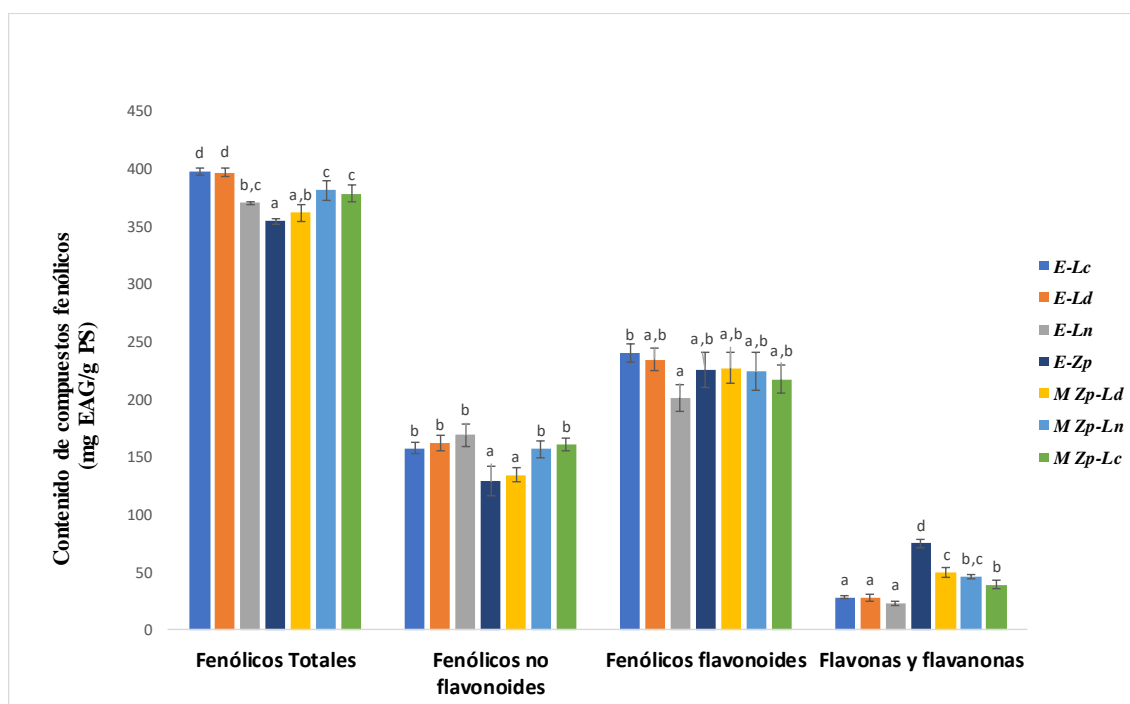


Figura 1. Contenido de compuestos fenólicos en extractos y mezclas binarias de extractos. Los valores se presentan como media \pm desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en cada grupo de compuestos indicaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras de error representan el error estándar de la media. E: extracto. M: mezcla.

Las mezclas de extractos fueron analizadas por HPLC-DAD, identificando y cuantificando los compuestos marcadores de calidad química seleccionados para cada especie, 2',4'-dihidroxichalcona (DHC) para *Z. punctata* y ácido nordihidroguayarático (ANDG) para las especies de *Larrea*.

En la Tabla 2 se muestra el contenido de cada uno de ellos en los extractos y en las mezclas *Zp/Lc* (1:4), *Zp/Ln* (1:1), *Zp/Ld* (1:1).

En la Figura 2 se muestran los cromatogramas obtenidos, evidenciando la presencia de estos marcadores en las mezclas. Los picos fueron determinados en base a sus espectros de absorción UV visible y tiempos de retención comparando con estándares comerciales. En el pico 1 se determinó ANDG y en el pico 2 se determinó DHC.

Tabla 2. Cuantificación de marcadores químicos en extractos de *L. divaricata*, *L. cuneifolia*, *L. nitida* y *Z. punctata* y en extractos combinados en mg PS de mezclas o de extractos individuales.

Muestra	ANDG µg /mg PS	DHC µg /mg PS
E- <i>Ld</i>	134,32±0,10	-
E- <i>Lc</i>	158,69±0,05	-
E- <i>Ln</i>	268,12±0,10	-
E- <i>Zp</i>	-	40,13±0,10
M <i>Zp/Ld</i> (1:1)	62,84±0,05	20,21±0,50
M <i>Zp/Lc</i> (1:4)	204,65±0,02	18,19±0,50
M <i>Zp/Ln</i> (1:1)	143,03±0,03	22,44±0,10

Ld: *L. divaricata*; *Lc*: *L. cuneifolia*; *Ln*: *L. nitida*; *Zp*: *Z. punctata*; E: extracto; M: mezcla. Los datos corresponden a la media ± desvío estándar de tres repeticiones.

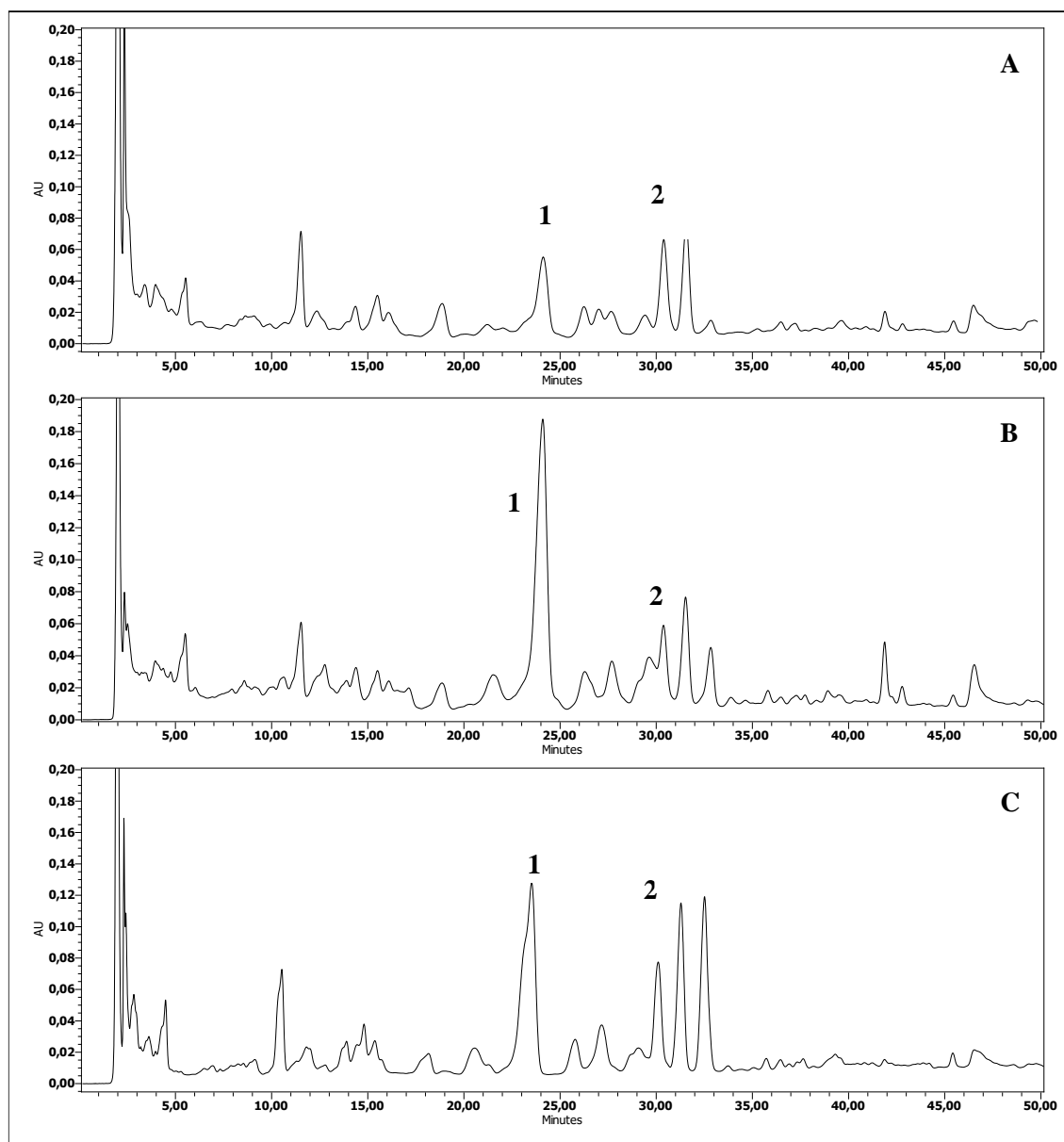


Figura 2. Perfiles cromatográficos de combinaciones binarias de extractos a 282 nm. **A.** Extractos de *L. divaricata* y de *Z. punctata*. **B.** *L. cuneifolia* y *Z. punctata*. **C.** *L. nitida* y *Z. punctata*. Compuesto 1. ANDG. Compuesto 2. DHC.

2.3. Estandarización biológica de preparaciones bi-herbales

2.3.1. Actividad antioxidante

En la Tabla 3 se resumen los valores de CD_{50} y CI_{50} obtenidos con los extractos hidroalcohólicos de especies individuales y de las mezclas binarias.

En el ensayo del ABTS, se puede observar que las combinaciones resultaron más activas que los extractos individuales, resultando la mezcla *Zp/Ld* la más potente con un valor de CD_{50} ligeramente inferior al resto de las muestras.

Con respecto a la depuración del radical $\cdot\text{OH}$, no se observaron diferencias significativas entre los extractos individuales y las mezclas. Sin embargo, en todos los casos, la potencia fue considerablemente superior al antioxidante natural quercetina usado como referencia.

En el ensayo del AAPH, las muestras más activas fueron *Zp/Lc*, *Zp/Ld*, *Zp/Ln* y el extracto de *Z. punctata*, siendo hasta ocho veces más potentes que el resto de los extractos evaluados.

En comparación con el resto de los ensayos, las muestras fueron menos activas para depurar H_2O_2 , siendo la potencia de las mezclas similar a la de los extractos individuales.

La actividad antioxidante de los extractos y mezclas se puede atribuir en parte al ácido nordihidroguayarático (Lee y col., 2003; Anesini y col., 2004; Guzmán-Beltrán y col., 2008) presente en los extractos de *Larrea*, y a la presencia en *Z. punctata* de 2',4'-dihidroxichalcona (Morán Vieyra y col., 2009; Nuño y col., 2015), pinocembrina (Vargas-Sánchez y col., 2015) y catequina (Aree y Jongrungruangchok, 2016; Grzesik y col., 2018), compuestos con conocida potencia antioxidante.

Tabla 3. Actividad antioxidante de extractos, mezclas bi-herbales y antioxidantes comerciales de referencia.

Muestra	CD ₅₀ ABTS ^{•+} ($\mu\text{g PS/ml}$)	CD ₅₀ $\cdot\text{OH}$ ($\mu\text{g PS/ml}$)	CD ₅₀ H_2O_2 ($\mu\text{g PS/ml}$)	CI ₅₀ AAPH ($\mu\text{g PS/ml}$)
E- <i>Zp</i>	9,13 \pm 0,50 ^f	0,98 \pm 0,05 ^a	184,84 \pm 15,20 ^b	0,14 \pm 0,01 ^a
E- <i>Lc</i>	10,29 \pm 0,50 ^g	1,73 \pm 0,10 ^a	191,81 \pm 13,00 ^b	0,30 \pm 0,02 ^b
E- <i>Ld</i>	6,72 \pm 0,20 ^e	1,18 \pm 0,10 ^a	175,02 \pm 14,50 ^b	0,55 \pm 0,05 ^c
E- <i>Ln</i>	12,14 \pm 0,60 ^h	1,11 \pm 0,07 ^a	192,12 \pm 14,00 ^b	0,56 \pm 0,02 ^c
M <i>Zp/Lc</i> (1:4)	4,91 \pm 0,27 ^d	1,46 \pm 0,11 ^a	173,16 \pm 13,20 ^b	0,08 \pm 0,01 ^a
M <i>Zp/Ln</i> (1:1)	5,11 \pm 0,26 ^d	0,89 \pm 0,08 ^a	182,82 \pm 12,60 ^b	0,078 \pm 0,002 ^a
M <i>Zp/Ld</i> (1:1)	3,81 \pm 0,26 ^c	1,28 \pm 0,10 ^a	186,70 \pm 15,50 ^b	0,100 \pm 0,005 ^a
Quercetina	1,41 \pm 0,08 ^a	30,00 \pm 2,00 ^b	38,00 \pm 3,20 ^a	0,90 \pm 0,08 ^d
BHT	3,52 \pm 0,20 ^{b,c}	-	-	1,20 \pm 0,10 ^e
ANDG	2,60 \pm 0,20 ^b	-	52,00 \pm 4,50 ^a	1,12 \pm 0,05 ^e

E: extracto; M: mezcla; *Lc*: *Larrea cuneifolia*; *Ld*: *Larrea divaricata*; *Ln*: *Larrea nitida*; *Zp*: *Zuccagnia punctata*; BHT: butil hidroxitolueno; ANDG: ácido nordihidroguayarático. Los valores se informan como media \pm desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna para cada especie de planta indicaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

2.3.2. Actividad antiinflamatoria

Los extractos más activos como antifúngicos (*Zp*, *Ld* y *Ln*) inhibieron las enzimas de la vía de AA en diferentes niveles (Tabla 4). Todos los extractos fueron más activos sobre LOX, seguidos por COX-2 y luego sFLA₂, tal como se describió en los respectivos capítulos cuando se analizan cada una de las especies por separado.

La actividad inhibidora de las combinaciones binarias fue en general más alta que los niveles exhibidos por las especies de plantas individuales a igual concentración, principalmente sobre COX-2. En las mezclas binarias donde se incluyen cantidades iguales de ambos extractos para llegar a los 50 µg/ml (*Zp/Ld* y *Zp/Lc*) se incrementa el porcentaje de inhibición de COX-2 desde un 50% para algunas especies individuales hasta alrededor del 100% en la mezcla binaria. En el ensayo del efecto de las combinaciones sobre la enzima proinflamatoria LOX, se logró alrededor de un 100% de inhibición, valor semejante al porcentaje de inhibición que mostraron los extractos individuales. El efecto de las combinaciones binarias sobre sFLA₂ fue levemente mayor que para los extractos individuales. Todas las combinaciones mostraron un nivel de inhibición similar o superior a los de los fármacos antiinflamatorios comerciales utilizados como controles positivos (Tabla 4).

La utilización de productos naturales como antiinflamatorios, ya sea individuales o combinados, es una terapia muy prometedora, debido a que el uso de algunos antiinflamatorios sintéticos es limitado por sus importantes efectos adversos. Por otro lado, en estudios previos se reportó que la combinación de antiinflamatorios no esteroideos con productos naturales es una buena alternativa para el tratamiento antiinflamatorio ya que en algunos casos se produce sinergismo sin incrementar, e incluso a veces llegando a disminuir, efectos gástricos adversos (Ortiz y col., 2010).

Los resultados obtenidos muestran que las mezclas evaluadas podrían usarse potencialmente para dirigirse a la vía de AA en diferentes niveles, logrando así un control más eficiente de la producción de mediadores proinflamatorios.

Tabla 4. Efecto de los extractos, combinaciones (50 µg EAG/ml) y compuestos antiinflamatorios comerciales (50 µg/ml) en las enzimas del metabolismo del ácido araquidónico.

Muestra	Inhibición de enzima (%)		
	LOX	COX-2	sFLA ₂
<i>E-Lc</i>	53,37±2,70 ^a	57,92±2,00 ^{a,b}	17,06±0,80 ^b
<i>E-Ld</i>	94,41±3,40 ^b	59,94±1,50 ^b	39,28±1,50 ^d
<i>E-Ln</i>	94,17±3,20 ^b	49,39±1,50 ^a	30,16±1,40 ^c
<i>E-Zp</i>	95,25±4,20 ^b	71,96±2,80 ^c	28,57±0,50 ^c
M <i>Zp/Ld</i> (1:1)	99,50±4,50 ^b	99,20±3,90 ^d	45,24±1,80 ^e
M <i>Zp/Ln</i> (1:1)	99,30±4,30 ^b	98,70±3,20 ^d	50,00±1,70 ^f
M <i>Zp/Lc</i> (1:4)	97,92±5,10 ^b	95,30±2,90 ^d	38,09±0,90 ^d
Naproxeno	95,00±2,80 ^b	-	12,00±0,60 ^a
Indometacina	-	-	16,00±0,80 ^b
Nimesulida	-	100,00±5,00 ^d	-

LOX: lipooxigenasa; COX-2: ciclooxigenasa-2; sFLA₂: fosfolipasa A₂; E: extracto; M: mezcla; *Lc*: *Larrea cuneifolia*; *Ld*: *Larrea divaricata*; *Ln*: *Larrea nitida*; *Zp*: *Zuccagnia punctata*. Los valores se informan como media ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna para cada especie de planta indicaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

2.3.3. Actividad mutagénica. Test de Ames

El ensayo de mutagenicidad utilizando cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 indicó que, hasta una concentración de 250 µg/placa, los extractos hidroalcohólicos de las mezclas *Zp/Ld*, *Zp/Ln* y *Zp/Lc* no inducen un incremento del número de revertantes por placa respecto al número de revertantes espontáneos, presentando en todos los casos una RM<1,5 (Tabla 5). A la concentración de 500 µg/placa no se pudo determinar el efecto frente a ninguna de las dos cepas, dado que en esa concentración se ve afectada la viabilidad bacteriana, debido a la actividad antimicrobiana de las mezclas.

Los resultados obtenidos indicarían que las mezclas binarias seleccionadas no resultan genotóxicas a las concentraciones ensayadas, al igual que los extractos individuales presentados en los capítulos anteriores.

Tabla 5. Número de revertantes/placa y relación de mutagenicidad (RM) en *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 con distintas dosis de mezclas binarias de extractos.

Muestra	µg EAG/placa	TA 98 (-) S9	TA 100 (-) S9	RM TA98	RM TA100
M Zp/Lc	500	ND	ND	ND	ND
	250	32±2 ^a	129±21 ^a	0,94	1,17
	125	35±3 ^a	128±26 ^a	1,03	1,16
M Zp/Ln	500	ND	ND	ND	ND
	250	34±3 ^a	123±12 ^a	1,00	1,12
	125	35±3 ^a	139±19 ^a	1,03	1,26
M Zp/Ld	500	ND	ND	ND	ND
	250	40±0 ^a	128±14 ^a	1,17	1,16
	125	43±5 ^a	136±14 ^a	1,26	1,24
Control positivo ¹		1222±109 ^b	723±171 ^b		
Control negativo ²		34±2 ^a	110±16 ^a		

Los datos corresponden a la media ± desviación estándar de triplicados. Diferentes letras en la misma columna indicaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). M: Mezcla; Ld: *Larrea divaricata*; Lc: *Larrea cuneifolia*; Ln: *Larrea nitida*; Zp: *Zuccagnia punctata*. ND: Afecta viabilidad de la cepa. ¹Control positivo: 4-nitro-fenilendiamina (10 µg/placa). ²Control negativo: DMSO (100 µl/placa).

CAPÍTULO VII:

Formulación de fitoterápicos

1. Introducción

La efectividad limitada de las formulaciones vaginales típicas como cremas, supositorios o tabletas está relacionada con su bajo tiempo de residencia activa, área de absorción pequeña, propiedades de barrera de la mucosa y diseminación inadecuada de la formulación en las superficies vaginales (Marciello y col., 2017). Para mejorar la efectividad, se han desarrollado nuevos sistemas de administración basados en nanopartículas (Ensign y col., 2014; Wong y col., 2014; Li y col., 2015, 2017; Gómez-Mascaraque y col., 2016a; Rivas-Morales y col., 2016). Estos portadores más pequeños tienen varias ventajas, que incluyen un área superficial específica alta relacionada con su pequeño tamaño, estabilidad mejorada de los agentes terapéuticos, mayor biodisponibilidad y propiedades de liberación controlada, haciéndolos atractivos para aplicaciones farmacéuticas prácticas.

Las nanopartículas y micropartículas de quitosano tienen un gran potencial para aplicaciones de administración de fármacos vaginales, debido a las excelentes propiedades de este polímero que incluye buena biocompatibilidad, baja toxicidad, mucoadhesividad y propiedades antimicrobianas inherentes, que han impulsado una serie de desarrollos en esta área (Andersen y col., 2017; Marciello y col., 2017). Se ha informado que el quitosano inhibe la adhesión de *C. albicans* a las células epiteliales vaginales humanas (Knapczyk y col., 1992; Li y col., 2009).

Entre las técnicas que se pueden utilizar para generar nano y micropartículas de quitosano, la electropulverización ha ganado una mayor atención. Esta técnica puede producir estructuras de microencapsulación en un proceso de un solo paso, en condiciones suaves, en ausencia de disolventes orgánicos/tóxicos, lo que limita la inactivación de los compuestos bioactivos y es adecuada tanto para fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos o ingredientes con alta eficiencia de carga (Gómez-Mascaraque y col., 2016b).

Los efectos secundarios de los agentes antifúngicos utilizados actualmente en las formulaciones comerciales (Sawant y Khan, 2017) y las tasas de recidiva muy altas observadas (Bradshaw y Sobel, 2016) fomentan enfoques terapéuticos alternativos, que incluyen el uso de extractos naturales con capacidad antifúngica.

Las plantas que se encuentran en las regiones áridas y semiáridas de Argentina se han utilizado ampliamente en la medicina tradicional para tratar infecciones fúngicas y bacterianas y como antiinflamatorias (Quiroga y col., 2001; Torres y col., 2003; Stege y col., 2006; Zampini y col., 2007; Barboza y col., 2009; Svetaz y col., 2010; Vogt y col.,

2013; Butassi y col., 2015, 2018; Nuño y col., 2015, 2016; Torres Carro y col., 2015, 2017).

En este trabajo de Tesis demostramos que los extractos hidroalcohólicos de arbustos como *Larrea divaricata*, *L. cuneifolia*, *L. nitida*, *Zuccagnia punctata* y *Tetraglochin andina* contienen una variedad de compuestos fenólicos, que son dependientes de la especie y muestran buena a excelente capacidad antioxidante, antiinflamatoria y actividad antifúngica contra especies de *Candida albicans* y no albicans aisladas de infecciones vaginales. La potencia antioxidante, antiinflamatoria y antifúngica comprobada hace que estos extractos sean excelentes candidatos para formulaciones fitoterápicas vaginales contra la candidiasis.

Administración por vía vaginal

Como se describió en el marco teórico de la introducción de este trabajo de Tesis Doctoral, la vagina es un órgano del tracto reproductor femenino, potencial vía de administración de fármacos para conseguir efectos tanto locales como sistémicos, puesto que el epitelio vaginal se considera una mucosa. Los excipientes a utilizar para el desarrollo de fármacos para administración vaginal deben ser mucoadhesivos, es decir ser capaces de adherirse al mucus, el cual está compuesto por una mezcla de glicoproteínas, mucinas, agua, electrolitos, células epiteliales, bacterias y productos del metabolismo bacteriano. Al tener el mucus una composición tan heterogénea, pequeñas variaciones cuali o cuantitativas pueden alterar los perfiles de adhesión de los sistemas, al igual que las etapas del ciclo menstrual, el período climatérico o el flujo constante de secreciones desde el útero o desde el folículo durante la ovulación. Para modificar la composición de los sistemas tradicionales se añaden polímeros biocompatibles naturales o sintéticos, que posean dos propiedades principales, mucoadhesión y liberación sostenida, y que permitan una mayor residencia del principio activo en la superficie de la mucosa vaginal (Valenta, 2005; Mansuri y col., 2016).

Actualmente, las formulaciones farmacéuticas empleadas no presentan la eficacia requerida debido a que el flujo vaginal constante arrastra estos sistemas. Por esta razón, se desea obtener sistemas capaces de permanecer adheridos en la mucosa vaginal durante períodos prolongados de tiempo. Las formas farmacéuticas en estudio persiguen una liberación sostenida de fármaco que se corresponde con el tiempo de bioadhesión para que se consiga una protección frente al patógeno durante el período completo que permanezcan mucoadheridas dichas formulaciones.

Polímeros mucoadhesivos

Con el fin de solucionar los problemas planteados en el párrafo anterior, se buscan nuevos sistemas de liberación vaginal tratando de alcanzar un equilibrio adecuado entre eficacia clínica y comodidad para la paciente.

Con este objetivo, se están investigando formulaciones que contienen polímeros mucoadhesivos y biocompatibles, los cuales presentan hinchamiento en contacto con el mucus (medio acuoso), consiguiéndose de esta forma una liberación controlada. Por otra parte, presentan la capacidad de adherirse a mucosas durante un período prolongado, por lo tanto, si la formulación posee un elevado tiempo de residencia en el lugar de acción y la liberación del principio activo es sostenida durante todo ese tiempo, nos encontramos ante excipientes de gran interés a la hora de desarrollar nuevos sistemas de prevención de candidiasis vaginal. Entre estos polímeros encontramos:

-Polímeros naturales

Quitosano

Es un copolímero policatiónico natural formado por glucosamina y N-acetilglucosamina, que se obtiene por desacetilación parcial de quitina, la cual procede del exoesqueleto de crustáceos, insectos y de algunos hongos (Porrás y col., 2012; Sosnik y col., 2014; Singh y col., 2017) (Figura 1).

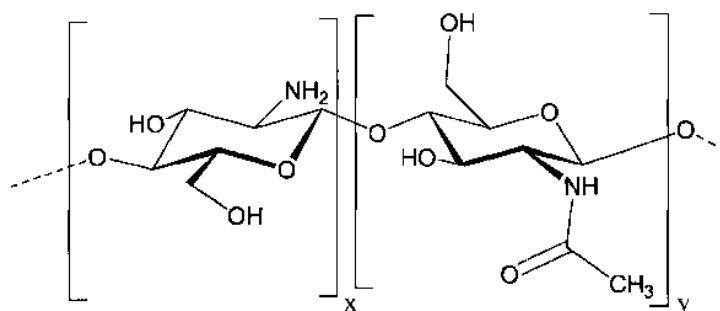


Figura 1. Estructura química del quitosano.

La presencia de grupos amino y grupos hidroxilo permite la adhesión a las mucosas mediante enlaces de hidrógeno. Además, le otorgan al polímero un pKa ácido, de tal forma que en medio vaginal se protonan mejorando dicha adhesión, ya que la mucosa presenta una superficie con carga negativa (Dmour y Taha, 2018).

El quitosano es biocompatible y biodegradable, además de que no es tóxico, por lo que se ha empleado en el desarrollo de numerosos sistemas para la administración vaginal,

como comprimidos, emulsiones y geles. Además, las formulaciones que contienen este excipiente presentan una liberación sostenida y propiedades mucoadhesivas (Luessen y col., 1996; Dodane y Vilivalam, 1998; Kim y col., 2003; Rodríguez y col., 2010; Porras y col., 2012; Sosnik y col., 2014; Singh y col., 2017; Dmour y Taha, 2018; Gómez-Mascaraque y col., 2018).

Gelatina

Los sistemas más antiguos conocidos de liberación de fármacos por vía vaginal se basaban en gelatina, por lo que se puede considerar que estos fueron los primeros sistemas de liberación mucoadhesivos. La gelatina es un polipéptido de origen animal que se obtiene a partir del colágeno, principal proteína estructural de piel, tendón y hueso (Sifuentes, 2011), mediante hidrólisis ácida (gelatina tipo A) o alcalina (gelatina tipo B) (Farmacopea Argentina, 2013). Está compuesta principalmente por residuos de glicina, prolina y 4-hidroxiprolina (Figura 2). Es una macromolécula polianfóptica, que tiene restos tanto catiónicos como aniónicos, junto con grupos hidrófobos (Dmour y Taha, 2018). La incorporación de fármacos en gelatina ofrece muchas ventajas sobre los correspondientes medicamentos en su forma libre, tales como la liberación prolongada de los mismos y efectos secundarios reducidos. Se ha utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica para la producción de recubrimientos, geles termo-sensibles y cápsulas (Sosnik y col., 2014).

Esta proteína no es tóxica, es biocompatible y biodegradable (Dmour y Taha, 2018).

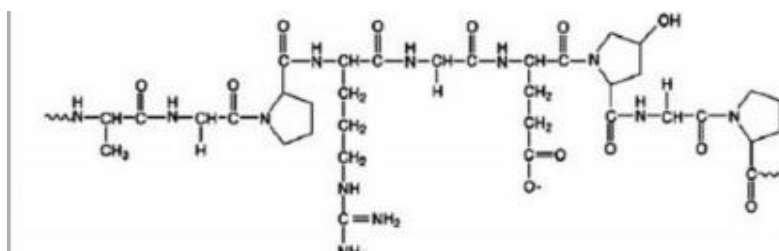


Figura 2. Estructura química de la gelatina

-Polímeros semisintéticos

Derivados de celulosa

Son polímeros obtenidos por tratamiento y modificación de la celulosa. De esta forma se obtienen derivados semisintéticos, de entre los cuales se destacan por sus propiedades la carboximetilcelulosa sódica (NaCMC), la metilcelulosa (MC) y la hidroxipropilmetilcelulosa o hipromelosa (HPMC), siendo el primero de ellos de

carácter iónico al ser un polianión y los otros dos de carácter neutro (Figura 3). Los derivados de celulosa se han utilizado como nanovehículos para diversos fármacos, como agentes antiinflamatorios no esteroideos, antimicrobianos y anticancerosos (El-Habashy y col., 2016; Dmour y Taha, 2018). Estos polímeros son biocompatibles, biodegradables y no tóxicos (Dmour y Taha, 2018).

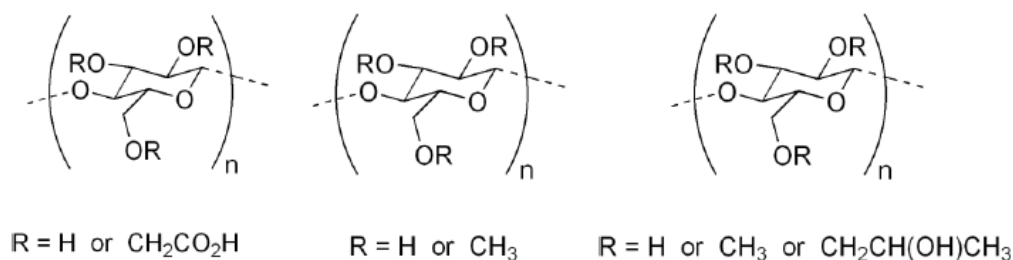


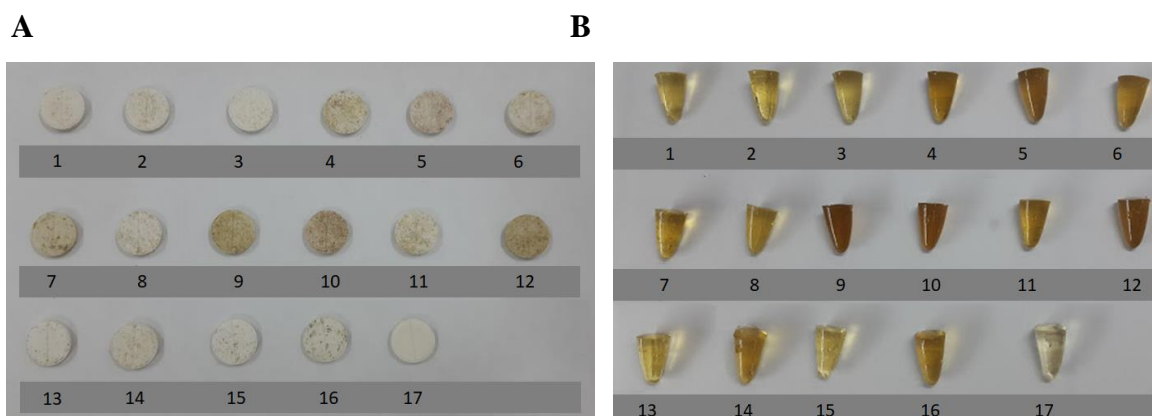
Figura 3. Derivados de celulosa. De izquierda a derecha, estructuras químicas de NaCMC, MC y HPMC.

El **objetivo** del presente capítulo fue desarrollar sistemas de administración basados en microcápsulas de quitosano, tabletas con derivados de celulosa y óvulos de gelatina, para su aplicación vaginal, conteniendo extractos seleccionados de plantas medicinales argentinas. Se caracterizaron la morfología, la carga del fármaco, la capacidad de absorción de agua, así como las propiedades biológicas (actividad antifúngica y antioxidante) y de liberación de estos sistemas de administración vaginal.

2. Resultados y discusión

2.1. Diseño y caracterización de formulaciones fitoterápicas

Se elaboraron microcápsulas, tabletas y óvulos utilizando extractos de *Z. punctata*, *L. cuneifolia*, *L. divaricata*, *L. nitida*, *T. andina* y de las mezclas más activas (*Zp/Lc*; *Zp/Ln*; *Zp/Ld*). Las estructuras obtenidas se muestran en la Figura 4.



C



Figura 4. A. Tabletas. **B.** Óvulos. **C.** Microcápsulas de *Larrea divaricata*. Referencias: 1. Muestra 1: *Zp* (1,5 mg PS). 2: *Ln* (1,5 mg PS). 3: *Ld* (1,5 mg PS). 4. *Lc* (5 mg PS). 5. *Ta* (5 mg PS). 6: *Zp* (3 mg PS). 7: *Ln* (3 mg PS). 8: *Ld* (3 mg PS). 9: *Lc* (10 mg PS). 10: *Ta* (10 mg PS). 11: *Zp+ Lc* (0,75 mg PS *Zp*+2,5 mg PS *Lc*). 12: *Zp+ Lc* (1,5 mg PS *Zp*+5 mg PS *Lc*). 13: *Zp+ Ln* (0,75 mg PS *Zp*+0,75 mg PS *Ln*). 14: *Zp+ Ln* (1,5 mg PS *Zp*+1,5 mg PS *Ln*). 15: *Zp+ Ld* (0,75 mg PS *Zp*+0,75 mg PS *Ld*). 16: *Zp+ Ld* (1,5 mg PS *Zp*+1,5 mg PS *Ld*). 17: placebo.

2.1.1. Tabletas

Las formulaciones de tabletas bioadhesivas de ketoconazol de aplicación vaginal basadas en Carbopol 934P, en combinación con hidroxipropil metil celulosa (HPMC) en diferentes proporciones, bicarbonato de sodio y ácido cítrico, fueron formuladas y analizadas previamente por otros autores (Wang y Tang, 2008). En este trabajo de Tesis, se describió por primera vez el diseño de tabletas bioadhesivas de liberación vaginal con Carbopol 934P, en combinación con HPMC y una mezcla efervescente de bicarbonato de sodio y ácido cítrico para promover la desintegración, con la incorporación de extractos de plantas medicinales de Argentina. Las tabletas formuladas presentaron un peso promedio de $272,5 \pm 10$ mg, $12 \pm 0,1$ mm de diámetro y $2,0 \pm 0,1$ mm de espesor.

Mostraron una eficiencia de carga entre el 80 y el 90% en todos los casos. Sin embargo, podían observarse visualmente en la superficie de las tabletas vaginales acumulaciones de extracto (Figura 4A), lo que sugiere que la miscibilidad de los extractos con los ingredientes de la tableta resultó baja. Todas las tabletas mostraron propiedades de desintegración adecuadas (TD entre 20 ± 4 min), ya que, de acuerdo con la Farmacopea Argentina, los comprimidos no recubiertos se deben desintegrar hasta un tiempo máximo de 30 minutos. Los valores de dureza se encontraron alrededor de $1,34 \text{ MPa} \pm 0,13$. Los porcentajes de friabilidad fueron bajos, entre 0-0,71%, indicando que son resistentes al estrés mecánico. Estos valores son aceptables según la Farmacopea Europea, la Farmacopea de los Estados Unidos y la Farmacopea Argentina, que consideran una aceptación de pérdida de peso máximo de 1%.

Con respecto a la morfología, la incorporación de extractos en las tabletas produjo una superficie áspera, a diferencia de las tabletas placebos que presentaron una superficie

suave al tacto. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) mostraron que las tabletas que contenían extractos de plantas no presentaban una superficie uniforme, presentaban partículas de forma variada (varilla, redondeada). En la Figura 5 se muestra a modo de ejemplo las imágenes de microscopía obtenidas de las tabletas conteniendo extracto de *Larrea nitida*.

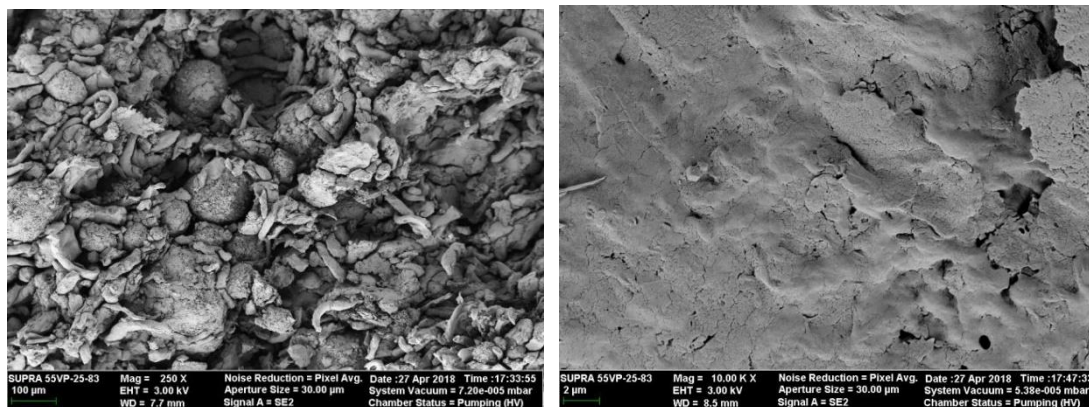


Figura 5. Imágenes de MEB de tabletas conteniendo extractos de *L. nitida* (Mag 250 X y 10.00 KX).

La Figura 6 muestra los espectros FT-IR de las tabletas placebo y las que contienen extractos. Los espectros de los extractos de plantas se caracterizaron por la presencia de bandas de absorción a 3395 cm^{-1} , $2960\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$, $1730\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ y en la región de $1600\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ atribuida al estiramiento, flexión y vibraciones de deformación de compuestos polifenólicos (Sivam y col., 2012). Dada la composición compleja de las tabletas, es difícil describir inequívocamente las bandas espectrales de cada componente, las bandas anchas observadas representan las contribuciones de diversos compuestos (Figura 6).

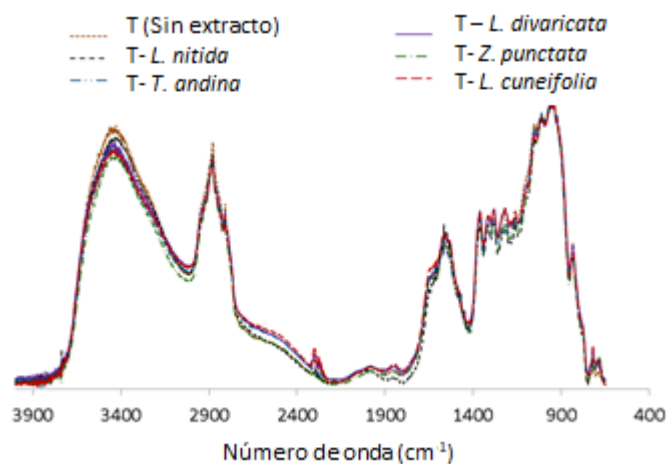


Figura 6. Espectros FT-IR de tabletas con y sin extractos. T: tabletas.

2.1.2. Microcápsulas

En la Figura 7 se muestra la morfología de los extractos encapsulados en quitosano por electrospraying. En los gráficos de distribución de tamaños de partículas (Figura 7) se puede observar variación en el diámetro de las cápsulas, a diferencia de lo observado cuando se encapsulan compuestos polifenólicos puros (Gómez-Mascaraque y col., 2016a).

Las microcápsulas contienen en su peso total un 10% de extracto, y presentan partículas de 0,1-1,5 μm de diámetro. Dependiendo del extracto incorporado, no solo se observaron variaciones en el tamaño sino también en la morfología de las cápsulas. Se obtuvieron partículas más pequeñas para el extracto de *L. cuneifolia*. Como la matriz de encapsulación y los parámetros de procesamiento fueron los mismos en todos los casos, las diferencias se podrían atribuir a los cambios en las propiedades de la solución de quitosano tras la adición de los extractos (Chakraborty y col., 2009). En todos los casos se observó una eficiencia de carga entre el 75 y el 90%.

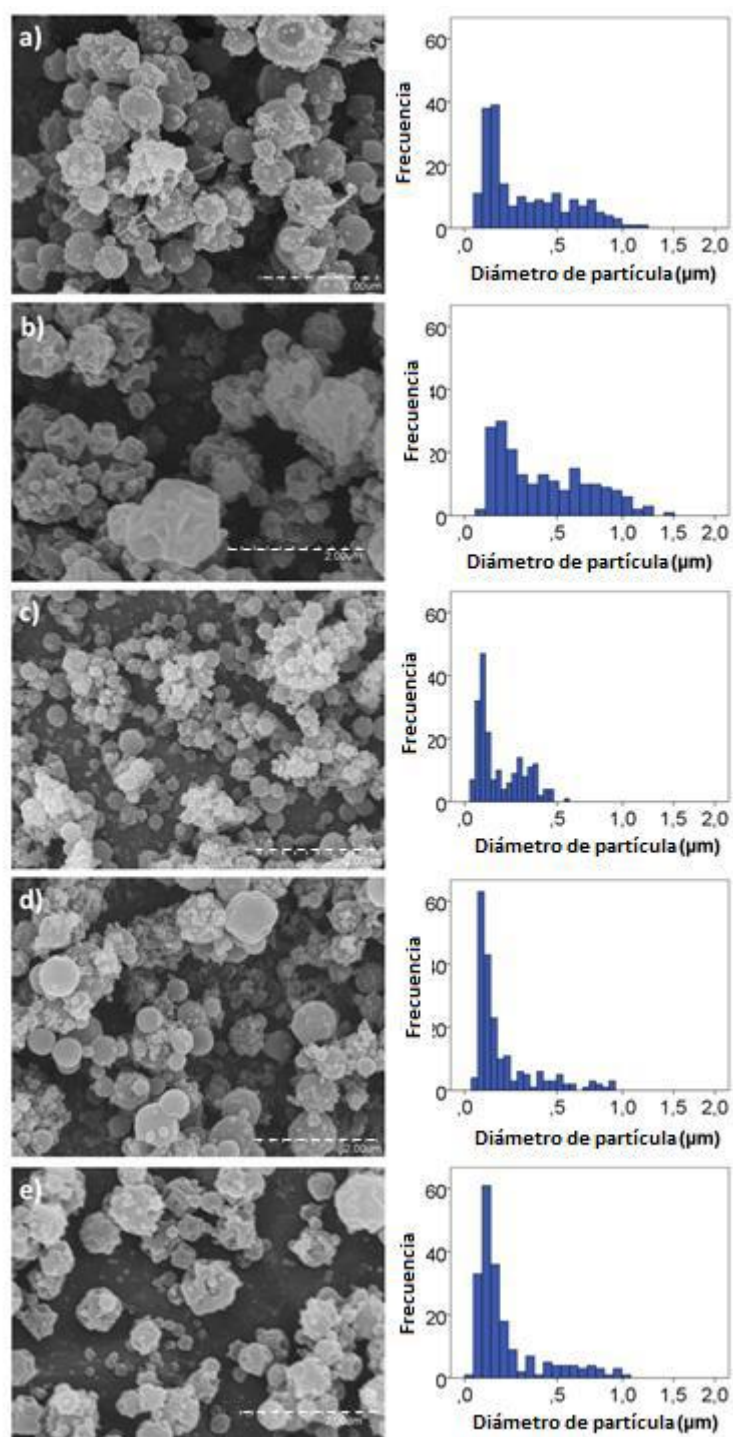


Figura 7. Imágenes de microscopía electrónica de barrido y gráficos de distribución de tamaños de nano y micropartículas de quitosano que contienen extractos de: a) *Z. punctata*; b) *T. andina*; c) *L. cuneifolia*; d) *L. divaricata*; e) *L. nitida*. Las barras de escala corresponden a 2 μm .

El espectro FT-IR de quitosano electroesprayado (Figura 8) mostró una banda ancha con un máximo a 3400 cm^{-1} , atribuido a las vibraciones de estiramiento -OH y -NH. Se observaron otras bandas características de este polisacárido a 2929 cm^{-1} (estiramiento de enlaces C-H), 1633 cm^{-1} (estiramiento de amida I, C=O), 1560 cm^{-1} (flexión -NH₂),

1410 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$ de flexión) y 1078 cm^{-1} (estiramiento C-O de anillos de azúcar) (Azevedo y col., 2012; Gómez-Mascaraque y col., 2014). Los espectros de los extractos de plantas se caracterizaron por la presencia de bandas de absorción a 3395 cm^{-1} , 2960-2930 cm^{-1} , 1730-1700 cm^{-1} y en la región de 1600-800 cm^{-1} atribuida al estiramiento, flexión y vibraciones de deformación de compuestos polifenólicos (Sivam y col., 2012). La incorporación de extractos de plantas dentro de las partículas de quitosano causó algunos cambios en la absorbancia relativa de las bandas características del mismo, debido a la contribución de los extractos a los espectros infrarrojos. En todos los casos, se observó una disminución en la intensidad relativa de las bandas atribuidas a la banda de estiramiento -OH y -NH a 3400 cm^{-1} y las bandas de flexión amida I y -NH₂ a 1633 y 1560 cm^{-1} , respectivamente. Esto también podría apuntar a las interacciones entre la matriz de quitosano y los extractos polifenólicos, que estarían mediados principalmente por enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas, como generalmente se acepta para las interacciones polisacáridos-polifenoles (Le Bourvellec y col., 2004, 2012; Gómez-Mascaraque y col., 2017). Se observó un cambio hacia los números de onda más bajos de la banda de estiramiento C-O en los anillos de azúcar, lo cual sugirió un cambio en la conformación del polímero tras la incorporación de los extractos, probablemente debido a interacciones intermoleculares entre el polisacárido y los constituyentes de los extractos.

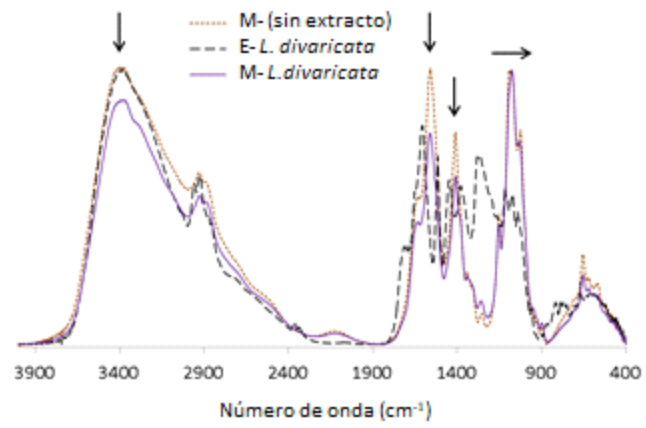
2.1.3. Óvulos

La gelatina forma geles térmicamente reversibles con agua, y la temperatura de fusión del gel (35°C) está por debajo de la temperatura corporal (Dmour y Taha, 2018), motivo por el cual resulta una buena matriz para el desarrollo de óvulos vaginales.

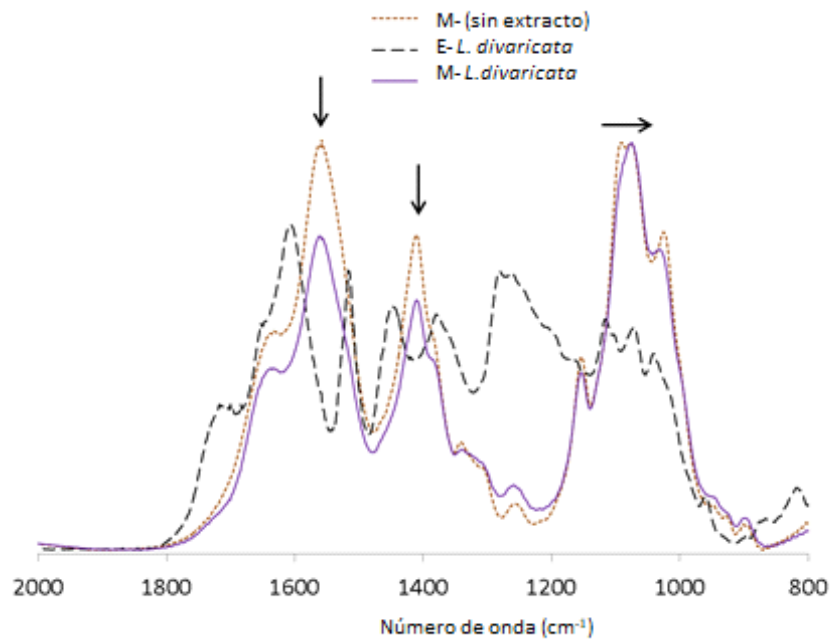
Los óvulos obtenidos pesaron $0,90 \pm 0,06$ g, y midieron $1,8 \pm 0,1$ cm de alto y $1 \pm 0,1$ cm de ancho. Mostraron diferente coloración (amarilla-amarronada), dependiendo de la concentración de extracto empleada para su formulación (Figura 4).

El análisis por FT-IR no se pudo realizar con los óvulos, debido a que el agua contenida en los mismos produce una banda larga de absorbancia en el rango de interés, lo que daría un espectro ilegible.

A



B



C

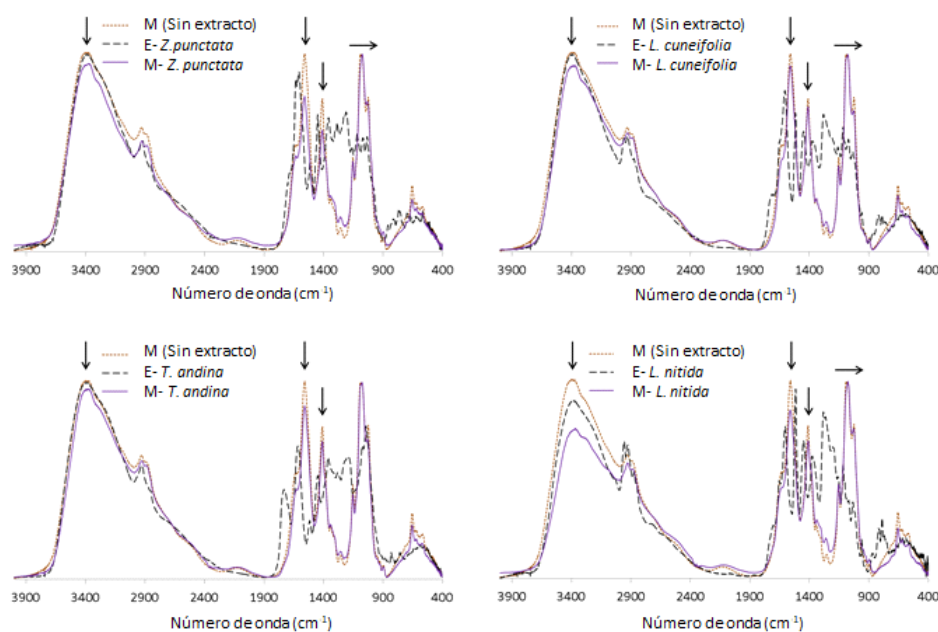


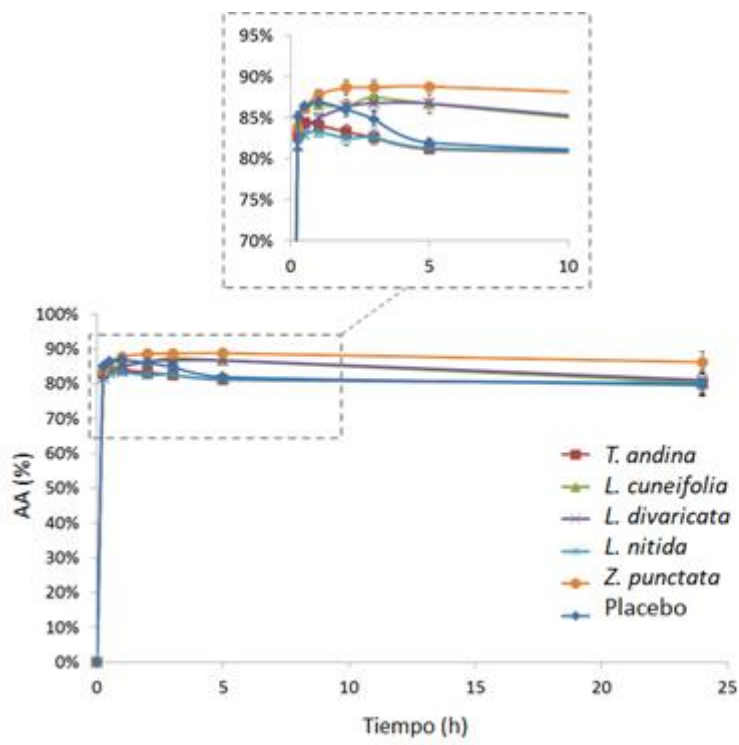
Figura 8. A. Espectros FT-IR de extracto de *L. divaricata*, junto con cápsulas de quitosano con y sin extracto. **B.** Detalle de los espectros previos en la región de 2000 a 800 cm^{-1} . **C.** Espectros de extractos, microcápsulas con y sin extractos de *Z. punctata*, *L. cuneifolia*, *L. nitida* y *T. andina*. E: extracto; M: mezcla; T: tabletas.

2.1.4. Ensayo de hinchamiento de formulados

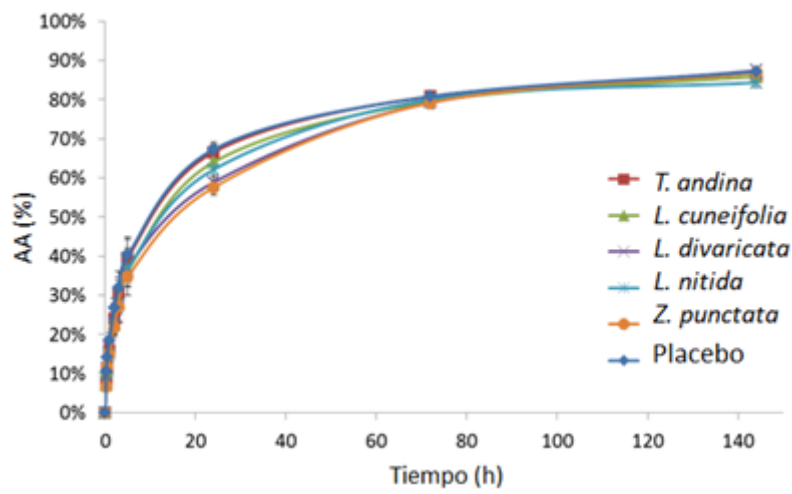
En el caso de formulados a base de polímeros, es de vital importancia el hinchamiento de los mismos en medio acuoso, ya que es un buen indicador para predecir las capacidades mucoadhesivas y cohesivas del polímero ensayado. Por otra parte, tanto la estabilidad del polímero como la liberación del fármaco introducido en la formulación están directamente relacionados con dicho hinchamiento (Sáez y col., 2004).

Se calculó la capacidad de absorción de agua (AA) de los formulados en tampón acuoso. Los perfiles obtenidos se muestran en la Figura 9. Todas las estructuras de encapsulación basadas en quitosano presentaron un rápido hinchamiento al contacto con el tampón acuoso debido a la naturaleza hidrófila del polisacárido, alcanzando valores de AA tan altos como 80-90% (es decir, el agua representó hasta 80-90% del peso total de las microcápsulas hidratadas). Se observaron pequeñas diferencias entre los formulados (Figura 9A), lo que sugiere que el grado de interacción entre la matriz y los extractos ricos en polifenoles varía entre los diferentes extractos debido indudablemente a la diferencia de componentes químicos, teniendo un impacto en la capacidad de hinchamiento de la matriz de quitosano.

A



B



C

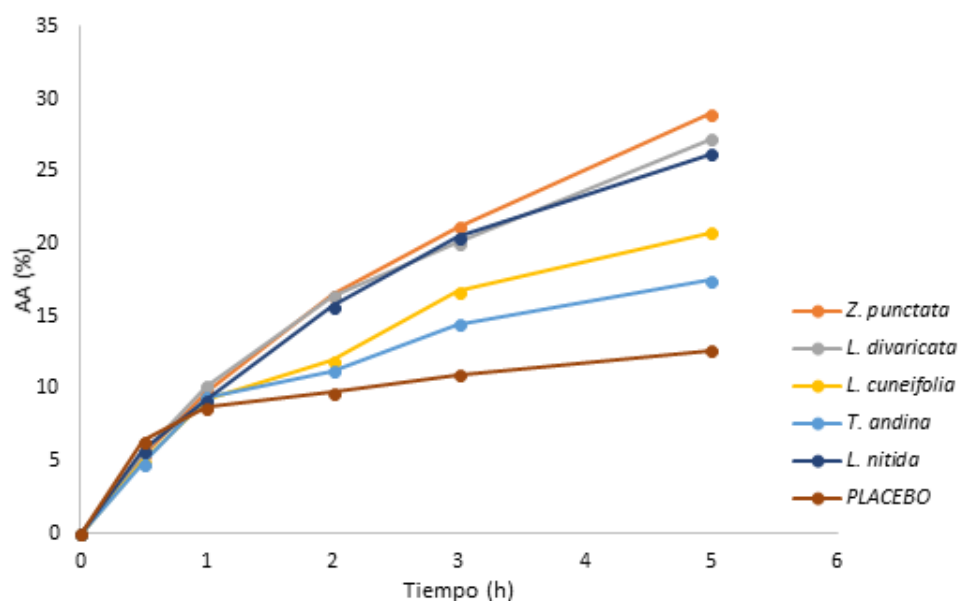


Figura 9. Perfiles de hinchamiento de los fitoterápicos y placebos en tampón de fosfato (pH = 4,5): **A.** Microcápsulas. **B.** Tabletas. **C.** Óvulos.

Las microcápsulas de quitosano sin extractos (placebo) también se evaluaron con fines comparativos. Mientras que la capacidad de AA de las microcápsulas con extractos permaneció casi constante después de un hinchamiento inicial rápido, los valores de la AA en los placebos comenzaron a disminuir después de 1 hora (Figura 9A). Este efecto fue observado también por otros autores para los hidrogeles basados en quitosano durante los experimentos de hinchamiento y se atribuyó la pérdida de peso a la disolución de una fracción de moléculas de quitosano en el tampón (Azevedo y col., 2012). Por lo tanto, se encontró que la presencia de los diferentes extractos de plantas dentro de la matriz de quitosano estabiliza los microhidrogeles formados, retrasando la disolución del polisacárido (se observó una menor pérdida de peso en las microcápsulas que contienen extractos, como se observa en el recuadro de la Figura 9A). La estabilización de matrices de carbohidratos por polifenoles ha sido descrita y atribuida a la presencia de interacciones físicas entre ambos componentes (Floriano-Sánchez y col., 2006).

Con respecto a las tabletas (Figura 9B), el hinchamiento fue mucho más gradual considerando el hecho de que para la formulación de las tabletas el material fue compactado en una prensa, produciendo una matriz más densa (menor superficie de contacto con respecto a las microcápsulas) con propiedades de difusión en agua más lentas.

En el caso de los óvulos, debido a la naturaleza hidrofílica de la gelatina, los mismos se disuelven en el tampón y atraviesan el papel de filtro utilizado para el ensayo, de ese modo, se obtienen porcentajes negativos con respecto al peso inicial. Por tal motivo, la gráfica correspondiente a óvulos solo se muestra hasta un tiempo de 5 horas (Figura 9C), antes de que comience la disolución bajo las condiciones del ensayo. Cabe destacar que la capacidad de hinchamiento de los óvulos utilizados como control (placebo) fue menor, y los mismos comenzaron a disolverse ligeramente más rápido que los óvulos que contenían extractos, posiblemente debido a interacciones entre los componentes polifenólicos de los extractos y la matriz utilizada. Una propiedad importante de los polifenoles es su capacidad para acomplejarse con proteínas (Ortiz-Barrera y col., 2015). Previamente se reportaron interacciones entre gelatina y taninos contenidos en extractos vegetales. Las cápsulas de gelatina con extractos que contienen taninos tienden a endurecerse con el tiempo, aumentando el tiempo de desintegración. Por lo tanto, el efecto observado en óvulos de *Z. punctata* puede deberse a la interacción entre la gelatina y los taninos presentes en esta especie, y con otros componentes polifenólicos más abundantes en los extractos, al igual que en los óvulos de *T. andina* (ricos en taninos hidrolizables), mientras que en las especies de *Larrea* podrían ser los lignanos los responsables de dicha interacción (Sharapin, 2000).

2.1.5. Liberación *in vitro* de los extractos de plantas desde los formulados en un sistema tampón y en fluido vaginal simulado (FVS)

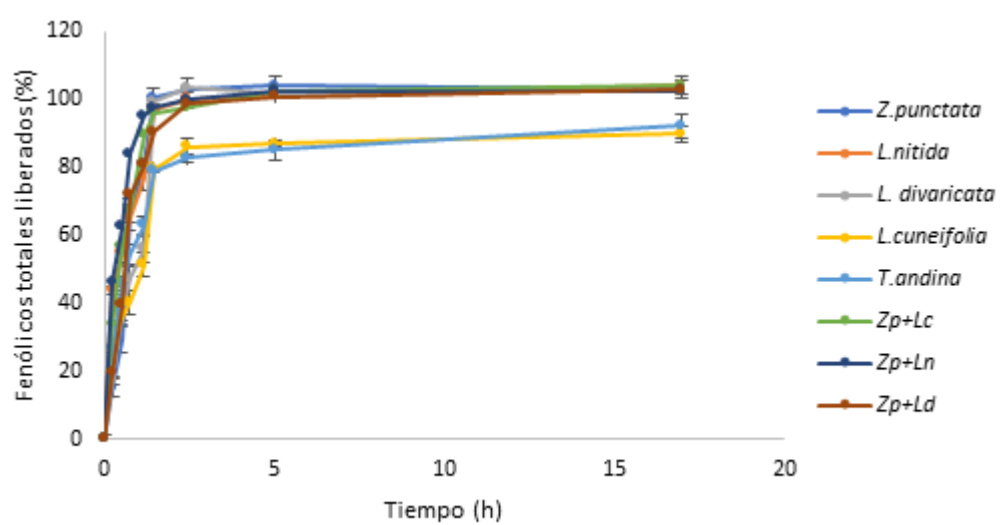
Se estudió la liberación de los polifenoles de los extractos vegetales incorporados a las microcápsulas de quitosano en tampón acuoso (PBS, pH = 4,5) y se comparó con la liberación de los mismos extractos desde comprimidos y óvulos vaginales. La cantidad de polifenoles liberado de las microcápsulas de quitosano y los óvulos fue significativamente mayor que la de las tabletas, para todos los extractos de plantas ensayados. En las microcápsulas de quitosano y en los óvulos, se observó una liberación muy rápida de compuestos fenólicos en las primeras 4-5 horas, que es el comportamiento típico de liberación de matrices hidrófilicas (quitosano/gelatina), debido al hinchamiento rápido de la matriz al contacto con un medio de liberación acuoso (Atay y col., 2017). El nivel de compuestos fenólicos liberados de las tabletas vaginales convencionales hasta las 5 horas fue mucho menor que para las microcápsulas y óvulos. La dispersión de los extractos fue considerablemente mayor en las microcápsulas electroesprayadas que en las tabletas, explicado por los diferentes

métodos de preparación. Tanto el disolvente utilizado para preparar soluciones de encapsulación como el entrelazado de cadenas de polisacáridos con las moléculas de polifenoles podrían haber facilitado su posterior liberación en el medio acuoso tras la hidratación de las microcápsulas de quitosano. Por el contrario, las acumulaciones de extracto se pueden observar visualmente en las tabletas vaginales convencionales, lo que sugiere una miscibilidad pobre de los extractos con los ingredientes de la tableta. Los extractos permanecieron insolubles incluso después de la desintegración de las tabletas (aún podrían observarse visualmente en la suspensión de liberación). En resumen, las microcápsulas de quitosano y los óvulos de gelatina resultaron más solubles en medio acuoso, y por lo tanto mostraron una liberación más rápida, en comparación con la formulación de tabletas vaginales durante las primeras horas. Sin embargo, después de 24 horas, el 100% del extracto incorporado se liberó de las tabletas, a excepción del extracto de *T. andina* (80%).

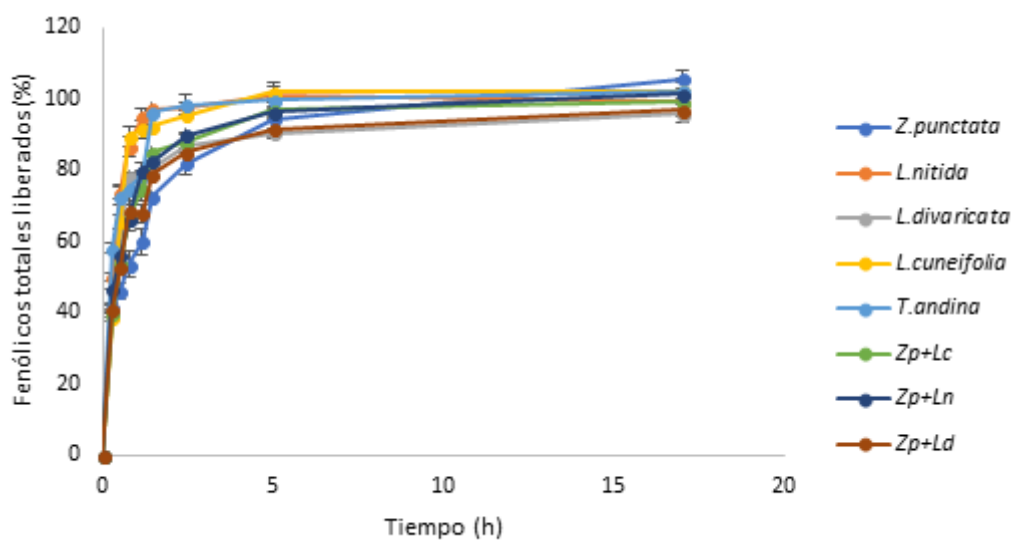
Es interesante observar que la liberación de las microcápsulas de quitosano fue mayor de lo esperado, probablemente debido a la solubilidad previa de los extractos en medio ácido, que aparentemente hizo que algunos de los compuestos fenólicos fueran más accesibles en los medios de liberación. Se informó anteriormente que las propiedades del quitosano promueven un contacto más estrecho entre la forma fitoterapéutica y el tejido vaginal, aumentando así el tiempo de residencia de los compuestos bioactivos en el sitio de administración (Albertini y col., 2009; Martín-Villena y col., 2013; Caramella y col., 2015).

Para predecir el contenido de compuestos fenólicos liberados de los formulados utilizando condiciones *in vitro* que imitaban el escenario *in vivo*, las tres formulaciones vaginales se incluyeron en FVS durante 24 horas. Bajo nuestras condiciones experimentales, los porcentajes de compuestos fenólicos totales liberados estuvieron en todos los casos en el rango de 77 a 100% para todos los formulados (Figura 10 A, B y C). Los resultados obtenidos han demostrado una buena liberación de compuestos bioactivos en FVS para todos los extractos de plantas ensayados. Por HPLC-DAD se analizaron los compuestos fenólicos individuales liberados de los formulados, para determinar si la encapsulación o la inclusión en las tabletas y óvulos afectaban su estabilidad. El perfil de cromatografía obtenido para cada uno de ellos fue similar al de los extractos secos de cada especie de planta utilizada en este estudio (perfiles no mostrados).

A



B



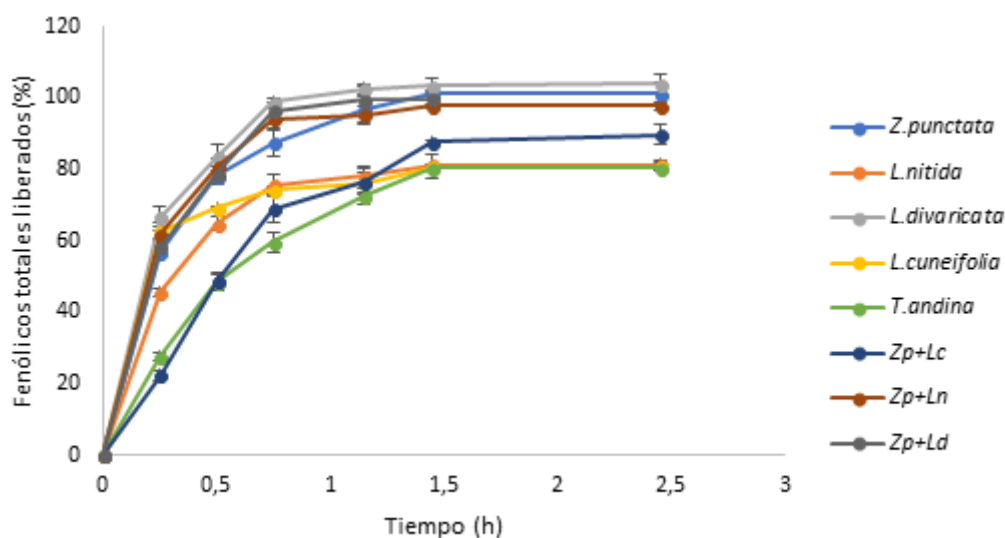


Figura 10. Porcentajes de liberación de compuestos fenólicos totales en FVS de: **A.** Microcápsulas. **B.** Tabletas. **C.** Óvulos.

2.1.6. Actividades biológicas de los extractos de plantas liberados desde los formulados

2.1.6.1. Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los extractos vegetales, solos o incorporados en microcápsulas, tabletas y óvulos se ensayó *in vitro* frente a tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, tres cepas de *C. albicans*, tres de *C. glabrata* y una cepa de *C. tropicalis*, aisladas de pacientes con infecciones vaginales.

Los extractos secos y los extractos eluidos de los formulados fueron efectivos contra *C. albicans* y *no albicans* en ensayos de macrodilución. Los valores de CIM de *C. albicans* de compuestos fenólicos eluidos de los formulados que contenían extractos de *Z. punctata*, *L. divaricata* y *L. nitida* fueron inferiores a los valores de CIM de los que contienen *L. cuneifolia* y *T. andina* (Tabla 1). Los valores de CIM de los compuestos fenólicos eluidos desde los formulados fueron coincidentes con los valores de CIM correspondientes a los extractos secos utilizados para obtener las formulaciones vaginales.

La mayor actividad de los formulados conteniendo *Z. punctata* sobre las especies de *Candida* podría atribuirse al contenido de 2', 4'-dihydroxichalcona, compuesto con actividad antifúngica demostrada (Isla y col., 2016; Nuño y col., 2014). Estos compuestos también fueron inhibidores efectivos en la formación de biopelículas, así como en la formación previa de biofilm de *Candida* preformado y del tubo germinativo. Además, los chalconas pueden inhibir las exoenzimas, que son responsables de los

mecanismos de invasión de *Candida*. Todos estos efectos podrían moderar la colonización, suprimiendo así el potencial invasivo del patógeno (Nuño y col., 2014). Entre los compuestos presentes en *Z. punctata*, también se reportó actividad inhibitoria del ácido quínico y pinocembrina (Ozcelik y col., 2011; Lu y col., 2017) sobre cepas de *Candida*.

Todas las formulaciones obtenidas de *L. divaricata* fueron más activas en *S. cerevisiae* que las de *T. andina*. Los productos con *T. andina* contenían un mayor nivel de taninos hidrolizados de tipo de pedunculanginas y casuarinas. Los taninos hidrolizados son compuestos con actividad anti *Candida* demostrada. Existen algunas evidencias de que los compuestos mencionados afectan las células fúngicas a través de la interacción con la bicapa lipídica de la membrana celular. Podrían actuar alterando la integridad de la membrana o intercalando la pared celular (Martins y col., 2015; Sieniawska y Baj, 2017). Además, los formulados con especies de *Larrea* contienen principalmente lignanos.

Nuestros resultados son consistentes con una potente actividad fungicida en todos los casos, tanto en los extractos como en las fitoformulaciones.

De acuerdo con la clasificación de Tangarife-Castaño y col. (2011), los extractos de *Zp*, *Ln*, *Lc*, *Ld* y *Ta*, así como sus fitoformulaciones podrían considerarse como antifúngicos naturales de potencia fuerte a moderada.

Tabla 1. Efecto de extractos secos, extractos liberados de microcápsulas, tabletas y óvulos sobre levaduras aisladas de infecciones vaginales clínicas en humanos.

Cepa	N° de colección	<i>L. cuneifolia</i> CIM (µg EAG/ml)				<i>L. divaricata</i> CIM (µg EAG/ml)				<i>L. nitida</i> CIM (µg EAG/ml)				<i>Z. punctata</i> CIM (µg EAG/ml)				<i>T. andina</i> CIM (µg EAG/ml)			
		E	M	T	O	E	M	T	O	E	M	T	O	E	M	T	O	E	M	T	O
<i>C. albicans</i>	144783	400	400	400	400	100	100	100	100	100	100	100	100	50	50	50	50	400	400	400	400
<i>C. albicans</i>	134333	400	400	400	400	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	400	400	400	400
<i>C. albicans</i>	2089	400	400	400	400	100	100	100	100	100	100	100	100	50	50	50	50	400	400	400	400
<i>C. glabrata</i>	031646	400	400	400	400	100	100	100	100	50	50	50	50	25	25	25	25	400	400	400	400
<i>C. glabrata</i>	042030	400	400	400	400	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	400	400	400	400
<i>C. glabrata</i>	031982	400	400	400	400	50	50	50	50	50	50	50	50	25	25	25	25	400	400	400	400
<i>C. tropicalis</i>	1841	400	400	400	400	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	400	400	400	400
<i>S. cerevisiae</i>	134528	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	25	25	25	25	25	25	25	25
<i>S. cerevisiae</i>	134544	100	100	100	100	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	>400	>400	>400	>400
<i>S. cerevisiae</i>	124263	50	50	50	50	25	25	25	25	50	50	50	50	25	25	25	25	400	400	400	400
ATCC <i>C. parapsilosis</i> .	134410	400	400	400	400	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	400	400	400	400
ATCC <i>C. krusei</i>	134409	100	100	100	100	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	100	100	100	100

Los valores de CIM representan la inhibición del crecimiento en comparación con el control de crecimiento. E: extracto; M: microcápsulas; T: tabletas; O: óvulos.

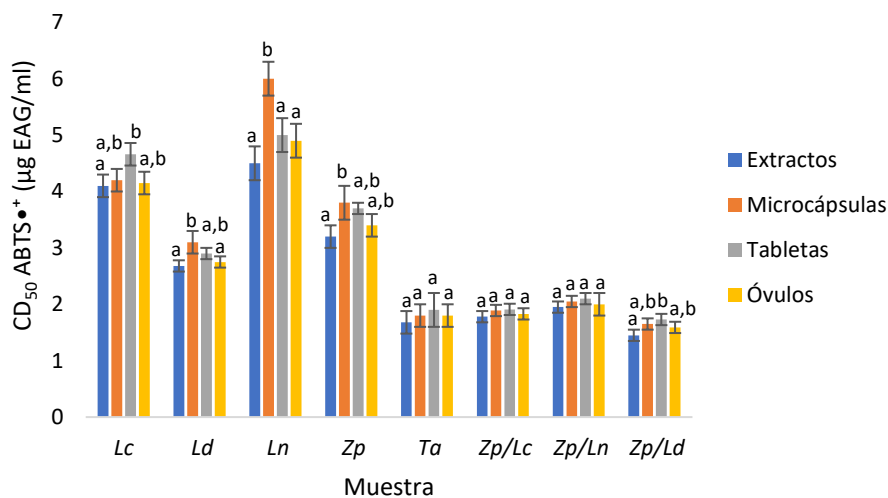
2.1.6.2. Capacidad antioxidante

En este trabajo se comparó la capacidad antioxidante de los extractos vegetales y mezclas (desarrollada en los capítulos 3, 4, 5 y 6) con la actividad de los compuestos fenólicos liberados a partir de los formulados que contienen dichos extractos, utilizando un sistema celular (ensayo del AAPH) y un sistema libre de células (ABTS^{•+}). Como se vio en los capítulos anteriores, la mayor actividad como depurador de ABTS^{•+} se obtuvo con la mezcla *Zp/Ld*, siendo esta actividad muy similar a las obtenidas con las mezclas *Zp/Ln* y *Zp/Lc*, y el extracto de *T. andina*. Como se puede ver en la Figura 11A, el orden de capacidad antioxidante se mantuvo para cada especie vegetal, considerando extracto etanólico y extracto liberado desde los formulados, siendo el orden de potencia en todos los casos *Zp/Ld* > *Ta* > *Zp/Lc* > *Zp/Ln* > *Ld* > *Zp* > *Lc* > *Ln*.

En el ensayo de inhibición de la hemólisis oxidativa, las mezclas exhibieron un efecto inhibitor más fuerte que los extractos sobre la lipoperoxidación de los glóbulos rojos, siendo el orden de potencia decreciente: *Zp/Ln* > *Zp/Lc* > *Zp/Ld* > *Zp* > *Lc* > *Ln* > *Ld* > *Ta*. Para cada especie vegetal o mezcla, no se observaron grandes diferencias entre la capacidad antioxidante obtenida con los extractos y con los compuestos liberados desde los formulados. Esto podría estar deberse a que la liberación de los compuestos fenólicos desde los mismos se encontró entre el 77 y 100%, con lo cual podría esperarse que las actividades biológicas se mantengan.

Las fitoformulaciones pudieron no solo reducir el ABTS, sino también prevenir y limitar la liberación de enzimas lisosómicas de los glóbulos rojos humanos a la matriz extracelular, lo que indica que podrían prevenir el daño en la membrana de los neutrófilos reduciendo la respuesta inflamatoria con potencia similar a la de los extractos medicinales. La capacidad antioxidante frente al AAPH en todos los casos fue mayor que la de los compuestos antioxidantes quercetina y BHT usados como referencia (CI_{50} $0,90 \pm 0,08$ y $1,20 \pm 0,10$, respectivamente). Se ha informado que los compuestos fenólicos son capaces de unirse covalentemente a proteínas de membrana y mediante enlaces de hidrógeno con los grupos de cabeza polar de fosfolípidos, lo que resultaría en la protección de los eritrocitos frente a la hemólisis oxidativa (Bonarska-Kujawa y col., 2012).

A



B

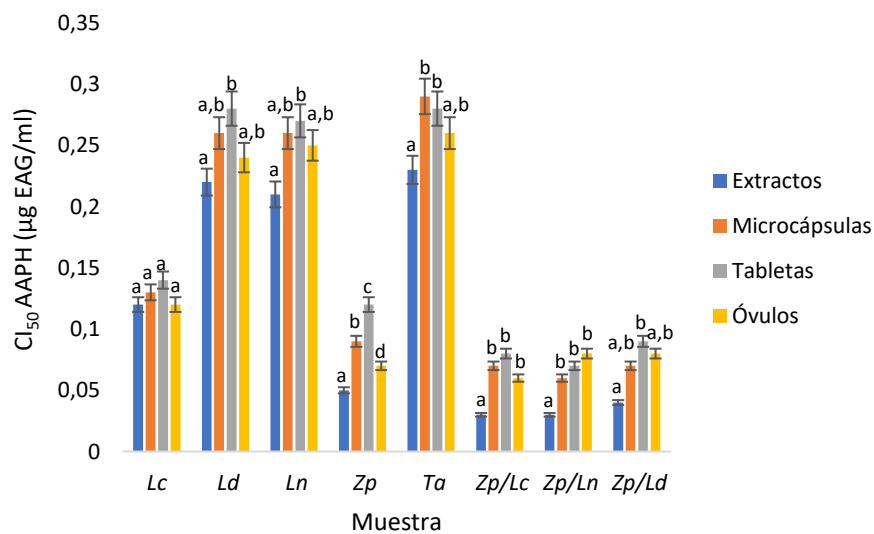


Figura 11. Actividad antioxidante de los extractos solos e incorporados en microcápsulas, tabletas y óvulos. **A.** Ensayo del ABTS \bullet^+ . **B.** Ensayo del AAPH. Diferentes letras en cada grupo de compuestos indicaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Aportes de este trabajo de
Tesis Doctoral para
promover la conservación y
uso sustentable de plantas
medicinales del NOA

Fitomedicina

Desde los tiempos más remotos, todas las sociedades han recurrido a las plantas como fuente de medicamentos. Actualmente, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de salud. Durante el último decenio, la Asamblea Mundial de la Salud ha adoptado un cierto número de resoluciones en respuesta al interés por el estudio y el empleo de la medicina tradicional en la asistencia médica, y en reconocimiento de la importancia que tienen las plantas medicinales para los sistemas sanitarios de muchos países en desarrollo. En respuesta al llamamiento de la OMS, las autoridades de salud de estos países han decidido ocuparse de las formas tradicionales de medicina y explorar la posibilidad de utilizarlas en la atención primaria de salud. Sin embargo, no se ha hecho ningún esfuerzo para garantizar esa continuidad, pese a las amenazas que suponen la demanda creciente, la explosión demográfica y la destrucción masiva de hábitat. Muchas plantas medicinales están hoy amenazadas de extinción o de graves pérdidas genéticas, pero no se dispone de información detallada a este respecto. En el caso de la mayor parte de las especies de plantas medicinales en peligro, no se ha adoptado ninguna medida de conservación, en la mayoría de los casos. Ni siquiera se ha hecho un inventario completo de plantas medicinales. Casi todo lo que se sabe sobre el empleo de éstas está en manos de las comunidades tradicionales, cuya propia existencia se ve actualmente amenazada y esa información no se ha recopilado de manera sistemática. Pero además de la identificación y selección de plantas medicinales para su empleo por los servicios sanitarios, cabe la posibilidad de que las plantas constituyan un reservorio inagotable para descubrir y aislar componentes químicos eficaces contra enfermedades para las cuales no se dispone todavía de ningún tratamiento.

Plantas medicinales y Fitoterápicos. Situación en Argentina

En la actualidad, son numerosas las amenazas derivadas de las actividades del hombre que causan la pérdida de biodiversidad en Argentina, entre las más relevantes por su magnitud se encuentran: la destrucción y fragmentación de hábitat, la sobreexplotación de poblaciones naturales para diferentes fines, la introducción de especies exóticas, la contaminación y el cambio climático global. En los últimos tiempos, la abundancia poblacional de muchas de las especies medicinales nativas del NOA ha ido disminuyendo como consecuencia de la expansión agropecuaria, el sobrepastoreo, la urbanización y el incremento de los niveles de recolección de las plantas medicinales,

dato que no se practica su cultivo como estrategia de autosuficiencia y de significancia cultural, sino que se basan exclusivamente en la recolección en el medio silvestre. La asociación natural que existe entre las plantas y los ecosistemas en los que habitan hace suponer que sería adecuada una intervención territorial para su estudio, diseño de fitomedicamentos usando como materia prima estos recursos y el diseño de políticas de conservación. Esta estrategia se fortalece cuando incluimos en la fórmula la presencia de los pueblos originarios que ocupan dichas regiones, los cuales aportan conocimientos invaluable del uso de las plantas medicinales locales. También es cierto que la eventual domesticación y producción de las plantas (materia prima) presenta mayores probabilidades de éxito si se lleva a cabo en las zonas ecogeográficas que les dieron origen, y si además en esta actividad intervienen las comunidades nativas locales, las cuales se beneficiarán desde el punto de vista económico y de inclusión social. De allí nuestro interés en bioprospectar especies medicinales nativas del NOA de diferentes ecorregiones, sobre todo aquellas especies que se encuentran en la lista roja preliminar de especies endémicas en peligro de extinción, tales como *Z. punctata* y *L. cuneifolia*, componentes de nuestra diversidad biológica del NOA a las que pretendemos estudiar para promover su conservación y uso sustentable.

Fitomedicamentos: Su estandarización

El papel de los medicamentos a base de plantas está creciendo no solo en la automedicación sino también en la práctica médica, así como las expectativas relacionadas con su calidad, seguridad y eficacia, que representan la condición previa y necesaria para obtener una autorización para la comercialización como medicamentos según la Directiva 2001/83/CE (EMA, 2001). Las primeras directrices para la evaluación de las hierbas medicinales y productos derivados fueron publicadas por la OMS en 1991. De acuerdo con ellas, el principio básico es lograr la identificación del principio activo y, cuando sea posible, la cuantificación de este en el producto final. Si la identificación de un principio activo no es posible, debería ser suficiente identificar una sustancia característica o mezcla de sustancias (por ejemplo, "huella digital cromatográfica") para garantizar la calidad constante de la preparación. La Farmacopea Europea (Farmacopea Europea, 2017) ha publicado hasta ahora más de 200 monografías sobre hierbas, medicamentos herbales y sobre extractos. Se han clasificado (Bilia, 2018) a los extractos en base a:

- estado físico (extractos líquidos, incluyendo extractos fluidos, tinturas, aceites macerados, preparaciones semisólidas llamadas extractos blandos y extractos secos).
- si solo contienen materia herbácea extraíble (extractos nativos) o excipientes adicionales (no nativo).
- conocimiento relacionado con sus constituyentes terapéuticamente activos (ajustados/ estandarizados, cuantificados). Los extractos refinados también son informados y definidos por el proceso de producción.

La ANMAT en el agregado XVIII del Acta 02/06 de la Comisión de productos de Salud define a los medicamentos fitoterápicos, así como los requerimientos para asegurar la calidad de los mismos.

Aportes del trabajo de Tesis Doctoral

En este trabajo de Tesis Doctoral se plantea el uso de cinco especies de plantas medicinales nativas argentinas usadas tradicionalmente para el tratamiento de micosis, procesos inflamatorios y patologías crónicas. Cuatro de ellas, *Z. punctata*, *L. cuneifolia*, *L. divaricata* y *L. nitida* crecen en la ecorregión del Monte, mientras que *T. andida* se distribuye en la ecorregión Altoandina.

A. En una primera instancia se realizó la recolección y secado de las partes aéreas de estas especies, luego la estandarización del material biológico mediante su autenticación por metodología botánica, macroscópica y microscópica (Cabrera, 1976; Barbour y col., 1977; Simpson y col., 1977; Ezcurra y col., 1991; Zuloaga y Morrone, 1999; Alonso y Desmarchelier, 2005; Ulibarri, 2008; Acosta y col., 2016).

Los datos obtenidos permitirían la autenticación no solo de muestra entera sino también pulverizada ya que se podrían analizar las estructuras anatómicas características de cada especie en particular.

B. A partir del material vegetal seco y molido se puso a punto un protocolo de producción de extractos a escala de laboratorio de las cinco plantas nativas por maceración en etanol 60°. Se estandarizaron los extractos mediante la determinación del rendimiento de extracción de principios solubles. En *Z. punctata*, *L. divaricata*, *L. nitida*, *L. cuneifolia* se extrajo alrededor de un 30% de principios solubles mientras que en *T. andina* el rendimiento fue inferior (14%). Posteriormente, los extractos secos se estandarizaron mediante la identificación y cuantificación de marcadores de calidad

química utilizando metodología recomendada a nivel internacional. Se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales, fenólicos no flavonoides y flavonoides, flavonas y flavonoles, y taninos condensados e hidrolizables. En todas las especies, los compuestos fenólicos mayoritarios fueron fenólicos flavonoides. El contenido de taninos condensados fue mayor en *Z. punctata* (135,24±7,0 mg EPB2/g PS) seguido por *T. andina* (60,4±3,5 mg EPB2/g PS). Se encontraron taninos hidrolizables principalmente en *T. andina* (26±2 mg EAG/g PS).

Se realizaron estudios de HPLC-ESI-MS/MS y se identificaron 23 compuestos en extractos de *Z. punctata* (principalmente chalconas, hidrochalconas, taninos, flavonoides glicosilados), 50 compuestos en *T. andina* (en su mayoría taninos hidrolizables) y 12 compuestos en las especies de *Larrea* (trihidroxi-6,7'-ciclolignano fue encontrado solo en *L. divaricata* y dihidroxi-metoxi-epoxilignano en *L. cuneifolia* y *L. nitida*), ANDG se encontró en las tres especies de *Larrea*.

En consecuencia, se logró a escala de laboratorio la puesta a punto de un protocolo de producción de un extracto seco estandarizado en base a su contenido de principio soluble y composición química.

C. Se determinó la actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos de las especies vegetales frente a hongos levaduriformes aislados de infecciones vaginales. De acuerdo con los resultados obtenidos, se podrían considerar a los fitoextractos de *Z. punctata*, *L. divaricata* y *L. nitida* como inhibidores fuertes del crecimiento de *Candida* (valores de CIM entre 25 y 100 µg EAG/ml), *L. cuneifolia* como inhibidor fuerte o moderado (CIM: 50-400 µg EAG/ml) y *T. andina* como inhibidor fuerte, moderado o débil dependiendo de la cepa analizada (50- >400 µg EAG/ml). Por otro lado, se decidió realizar combinaciones binarias de las especies medicinales bajo estudio, a fines de evaluar si las mismas presentaban efecto antimicrobiano sinérgico. Se evaluaron 10 combinaciones, en un amplio rango de concentraciones, destacándose tres de ellas: *Zp/Ld*, *Zp/Ln* y *Zp/Lc*, las cuales presentaron efecto sinérgico o aditivo según la cepa en el rango de concentraciones ensayadas. Este es el primer informe sobre efectos sinérgicos entre extractos hidroalcohólicos de especies de jarillas. Previamente se informaron combinaciones sinérgicas de extractos diclorometánicos de *Zp/Ln* (Butassi y col., 2015, 2018). El sinergismo de drogas entre agentes antimicrobianos conocidos y extractos bioactivos de plantas es un concepto novedoso y constituye una de las nuevas

alternativas para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes. Cabe destacar que las combinaciones que presentaron efecto sinérgico lograron disminuir hasta 16 veces los valores de CIM comparando con los extractos individuales.

Debido a que los procesos infecciosos están íntimamente relacionados con los procesos inflamatorios (Ferrer, 2000), se evaluó la capacidad de los extractos para inhibir enzimas involucradas en la cascada inflamatoria. Todos los extractos resultaron más activos sobre la enzima LOX, seguida por COX-2 y sFLA₂. Los extractos de *L. divaricata*, *L. nitida* y *Z. punctata* (50 µg EAG/ml) presentaron un porcentaje de inhibición de la enzima lipooxigenasa similar al antiinflamatorio naproxeno utilizado en este trabajo de Tesis doctoral como referencia (94,1-95,2%), mientras que el extracto de *L. divaricata* logró inhibir la enzima sFLA₂ en un porcentaje superior a los antiinflamatorios comerciales naproxeno e indometacina (39,3%). Las mezclas presentaron potencia similar a la de los extractos individuales frente a LOX, y actividad superior a la de los extractos frente a COX-2 (95,3-99,2%), siendo en este último caso similar a la capacidad inhibitoria del antiinflamatorio comercial nimesulida. Las mezclas *Zp/Ln* y *Zp/Ld* fueron capaces de inhibir con 50 µg EAG/ml el 45-50% de la actividad de la fosfolipasa A₂. En consecuencia, tanto los extractos individuales como las mezclas fueron capaces de inhibir a diferentes niveles la cascada del proceso inflamatorio, siendo las mezclas inhibidores más potentes.

Debido a la relación entre la infección e inflamación con los procesos oxidativos, se decidió evaluar el efecto de los extractos y mezclas sobre especies reactivas de oxígeno. Los extractos y las mezclas presentaron elevada potencia antioxidante, principalmente frente al radical hidroxilo (CD₅₀ 0,34-0,69 µg EAG/ml), siendo ampliamente superior a la potencia obtenida con el antioxidante natural quercetina. Los extractos y mezclas resultaron potentes inhibidores de la oxidación de membranas biológicas, siendo la potencia de las mezclas similar a la obtenida con los extractos de *Z. punctata* (CI₅₀ 0,03-0,05 µg EAG/ml), y superior a los extractos de *Larrea* y *T. andina* (CI₅₀ 0,12-0,23 µg EAG/ml), y resultando en todos los casos superior a la capacidad inhibitoria de los antioxidantes utilizados como referencia.

Cabe destacar que la concentración necesaria para depurar el 50% de los radicales o para proteger a los glóbulos rojos de la peroxidación lipídica, así como para inhibir a las enzimas proinflamatorias LOX y COX-2 fue inferior a los valores de CIM.

Tanto los extractos individuales como las mezclas binarias no resultaron genotóxicos en el rango de concentraciones ensayadas, lo cual garantizaría su uso seguro.

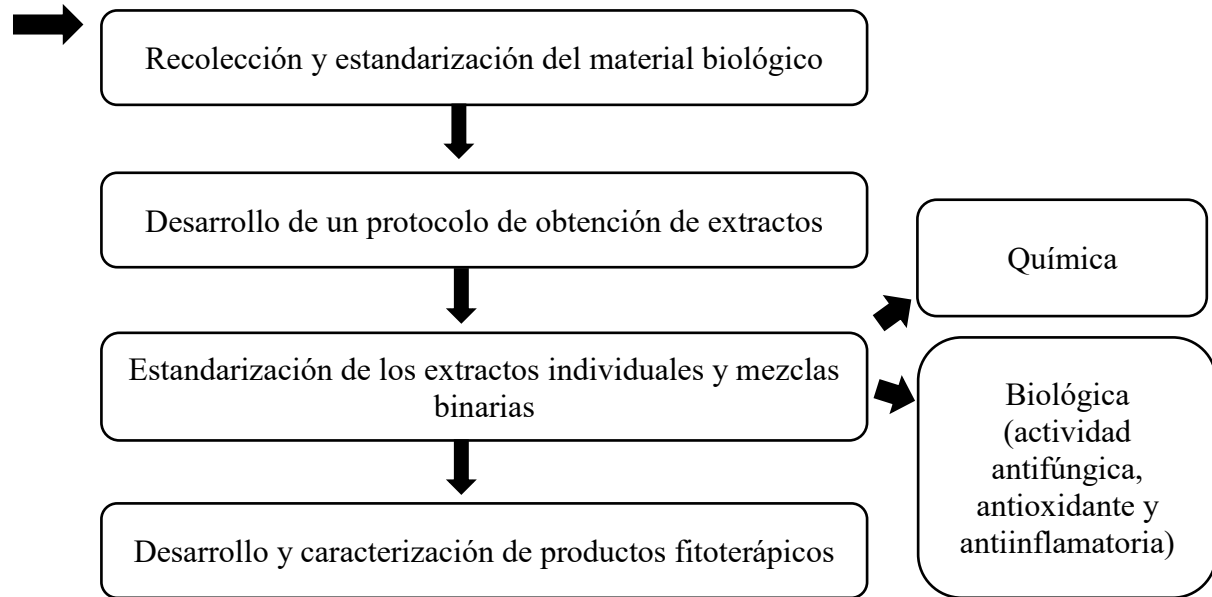
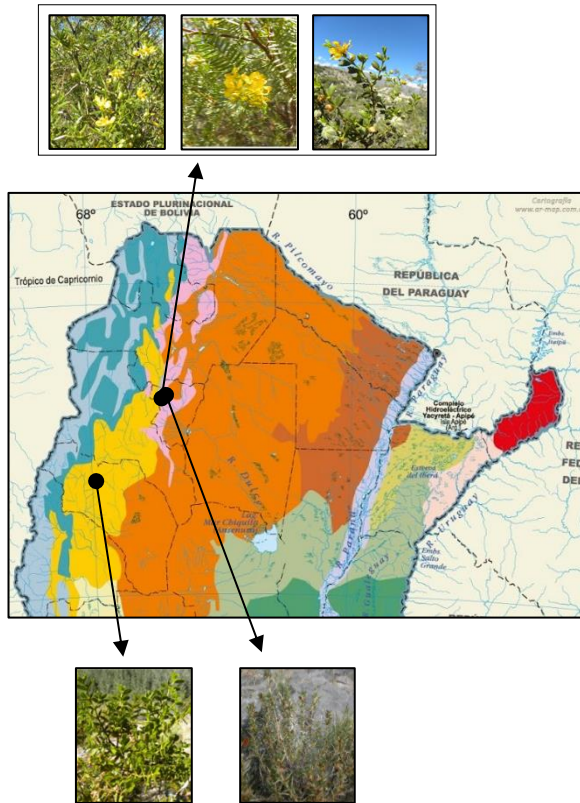
Los fitoextractos obtenidos podrían ser utilizados por sus propiedades antifúngicas, antioxidantes y antiinflamatorias.

D. En base a estos resultados, se seleccionaron los cinco extractos individuales y las mezclas más activas (*Zp/Ld*, *Zp/Ln* y *Zp/Lc*) para el desarrollo de formulados fitoterápicos, que incluyeron la elaboración de microcápsulas, tabletas y óvulos de aplicación vaginal, utilizando polímeros mucoadhesivos. Previamente se reportó el uso de los polímeros utilizados en este ensayo para el desarrollo de productos de aplicación vaginal (Albertini y col., 2009; Martín-Villena y col., 2013; Caramella y col., 2015).

Se caracterizaron la morfología, la carga del fármaco, la capacidad de absorción de agua y las propiedades biológicas (actividad antifúngica y antioxidante) y de liberación de estos sistemas de administración vaginal. Las propiedades biológicas ensayadas no se vieron afectadas ante la incorporación de estos extractos en los formulados. Además, los formulados no mostraron contaminación biológica con hongos ni bacterias. Se observó una velocidad de liberación de compuestos bioactivos diferente a partir de los formulados en las primeras horas, siendo más rápida en las microcápsulas y en los óvulos. Este hecho podría atribuirse a la naturaleza hidrofílica de las matrices utilizadas en los mismos, y a la mayor superficie específica en el caso de las microcápsulas de quitosano. Además, la solubilidad de los extractos seleccionados se vio favorecida por la formación de microcápsulas, lo que aumentaría potencialmente la biodisponibilidad de los compuestos activos en el entorno vaginal. Por otra parte, el desarrollo de formulados utilizando los extractos como fitocomplejos podría ser una forma más práctica y económica que la inclusión de compuestos bioactivos aislados.

Los resultados obtenidos indican que los fitoextractos (individuales o combinados, Zp/Ld, Zp/Ln y Zp/Lc) y los formulados obtenidos a partir de ellos serían una alternativa para el tratamiento de las infecciones fúngicas y de los procesos oxidativos e inflamatorios asociados.

Nuestros resultados permitirían promover la conservación e incentivar el cultivo y propagación de estas especies para su uso en la producción de fitoterápicos.



Conclusiones generales

- Las especies medicinales utilizadas en este trabajo fueron caracterizadas desde el punto de vista morfoanatómico y farmacognóstico.
- Los extractos vegetales usados como ingredientes para el desarrollo de fitoterápicos fueron estandarizados desde el punto de vista químico y biológico.
- Los extractos vegetales resultaron activos frente a especies de *Candida* y *Saccharomyces*, siendo más potentes los de *Z. punctata*, *L. divaricata* y *L. nitida*. Estos extractos no presentan actividad frente a lactobacilos presentes en la microbiota vaginal normal en el rango de concentración en el que presentan actividad frente a *Candida*.
- Todos los extractos demostraron capacidad antiinflamatoria (inhibición de la enzima LOX, COX-2 Y sFLA₂) y capacidad antioxidante (depuración de radicales e inhibición de la peroxidación lipídica) en bajas concentraciones, por lo cual podrían considerarse además inhibidores de factores de virulencia enzimáticos de *Candida* (fosfolipasas).
- Algunas de las mezclas binarias de extractos vegetales demostraron efecto antifúngico sinérgico, siendo las más activas las de *Zp/Ln*, *Zp/Ld* y *Zp/Lc*.
- Las mezclas *Zp/Ln*, *Zp/Ld* y *Zp/Lc* mostraron buena potencia antioxidante y antiinflamatoria, comparando con los extractos individuales.
- Se desarrollaron microcápsulas, tabletas y óvulos conteniendo extractos secos de plantas medicinales.
- Los ensayos de liberación evidenciaron que todas las formas farmacéuticas presentan entre 77-100% de liberación de polifenoles en un medio vaginal sintético, estabilidad química, microbiológica y biológica.
- Estos resultados indicarían que los fitoextractos individuales y combinados en mezclas binarias de *Zp/Ln*, *Zp/Ld* y *Zp/Lc*, así como los formulados farmacéuticos obtenidos a partir de las mismas, serían una buena alternativa para el tratamiento de las infecciones fúngicas y de los procesos oxidativos e inflamatorios asociados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, E.M. (2015). Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Acute Disease*, 5(6), 512-516.
- Abdelli, M., Moghrani, H., Aboun, A., Maachi, R. (2016). Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 94, 197-205.
- Abootalebian, M., Keramat, J., Kadivar, M., Ahmadi, F., Abdinian, M. (2016). Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different *Mentha spicata* and *M. longifolia* accessions. *Annals of Agricultural Sciences*, 61, 175-179.
- Abruzzo, A., Bigucci, F., Cerchiara, T., Saladini, B., Gallucci, M., Cruciani, F., Vitali, B., Luppi, B. (2013). Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. *Carbohydrate Polymers*, 91, 651-658.
- Abuja, P.M, Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 306, 1-17.
- Acosta, J.M., Salariato, D.L., Cialdella, A.M. (2016). Molecular Phylogeny and Morphological Analysis of *Tetraglochin* (Rosaceae: Rosoideae: Sanguisorbeae) and Recognition of the New Species *T. andina*. *Systematic Botany*, 41(4), 839-850.
- Adegboye, M.F., Akinpelu, D.A., Okoh, A. (2008). The Bioactive and Phytochemical Properties of *Garcinia kola* (Heckel) Seed Extract on Some Pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 7(21), 3934-3938.
- Aggarwal, P, Kashyap, B. (2018). Biofilm production by clinically isolated *Candida*: Comparative analysis based on specimen, methodology, and various *Candida* species. *Indian Journal of Medical Specialities*, 9, 69-72.
- Agüero, M.B., González, M., Lima, B., Svetaz, L., Sanchez, M., Zacchino, S., Feresin, G., Schmeda-Hirschmann, G., Palermo, J., Wunderlin, D., Tapia, A. (2010). Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) exudates: Phytochemical characterization and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 194-201.
- Agüero, M.B., Svetaz, L., Sánchez, M., Luna, L., Lima, B., López, M.L., Zacchino, S., Palermo, J., Wunderlin, D., Feresin, G.E., Tapia, A. (2011). Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1970-1978.

- Akinyele, T.A., Igbinsosa, E.O., Akinpelu, D.A., Okoh, A.I. (2017). *In vitro* assessment of the synergism between extracts of *Cocos nucifera* husk and some standard antibiotics. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, 306-313.
- Albertini, B., Passerini, N., Di Sabatino, M., Vitali, B., Brigidi, P., Rodriguez, L. (2009). Polymer-lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36, 591-601.
- Alberto, M.R., Nieva Moreno, M.I., Zampini, I.C., Isla, M.I. (2007). Anti-inflammatory activity of structurally related natural flavonoids. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6, 308-309.
- Alcoba-Florez, J., Mendez-Alvarez, S., Cano, J., Guarro, J., Perez-Roth, E., del Pilar Arevalo, M. (2005). Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 4107-4111.
- Alfonso, C., López, M., Arechavala, A., Perrone, M.C., Guelfand, L., Bianchi, M. (2010). Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance Candida Agar. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27, 90-93.
- Alonso, J. (2007). *Tratado de fitofármacos y nutraceuticos*. Editorial Corpus, Rosario, Argentina.
- Alonso, J., Desmarchelier, C. (2005). *Plantas medicinales autóctonas de la Argentina: bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud*. Buenos Aires: L.O.L.A.
- Álvarez Echazú, M.I., Olivetti, C.E., Peralta, I., Alonso, M.R., Anesini, C., Perez, C.J., Alvarez, G.S., Desimone, M.F. (2018). Development of pH-responsive biopolymer-silica composites loaded with *Larrea divaricata* Cav. extract with antioxidant activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 169, 82-91.
- Álvarez, S.L., Cortadi, A., Juárez, M.A., Petenatti, E., Tomi, F., Casanova, J., van Baren, C.M., Zacchino, S., Vila, R. (2012). (-)-5,6-Dehydrocamphor from the antifungal essential oil of *Zuccagnia punctata*. *Phytochemistry Letters*, 5, 194-199.
- Al-Bayati, F.A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 403-406.

- Al-Rifai, A. (2018). Identification and evaluation of *in-vitro* antioxidant phenolic compounds from the *Calendula tripterocarpa* Rupr. South African Journal of Botany, 116, 238-244.
- Amarowicz, R., Janiak, M. (2018). Hydrolysable Tannins, in: Reference Module in Food Science. Elsevier.
- Amenu, D. (2014). Antimicrobial activity of medicinal plant extracts and their synergistic effect on some selected pathogens. American Journal of Ethnomedicine, 1(1), 18-29.
- Anantharaju, P.G., Gowda, P.C., Vimalambike, M.G., Madhunapantula, S.V. (2016). An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. Nutrition Journal, 15, 99.
- Andersen, T., Mishchenko, E., Flaten, G. E., Sollid, J.U.E., Mattsson, S., Tho, I., Škalko-Basnet, N. (2017). Chitosan-Based Nanomedicine to Fight Genital *Candida* Infections: Chitosomes. Marine Drugs, 15, 64.
- Andrade, J.M., Fasolo, D. (2014). Polyphenol Antioxidants from Natural Sources and Contribution to Health Promotion. En: Polyphenols in Human Health and Disease, Eds. Watson, R., Preedy, V., Zibadi, S. Elsevier Editora LTDA, 20, 253-265.
- Anesini, C., Ferraro, G., Lopéz, E., Borda, P. (2001). Different intracellular signals coupled to the antiproliferative action of aqueous extract from *Larrea divaricata* Cav. and nordihydroguaiaretic acid on a lymphoma cell line. Phytomedicine, 81, 1-7.
- Anesini, C., Genaro, A., Cremaschi, G., Zubillaga, M., Boccio, J., Sterin-Borda, L., Borda, E. (1996a). *In vivo* and *in vitro* antitumoral action of *Larrea divaricata* Cav. Acta physiologica, pharmacologica et therapeutica latinoamericana, 46, 33-40.
- Anesini, C., Genaro, A., Cremaschi, G., Sterin Borda, L., Cazaux, C., Borda, E. (1996b). Immunomodulatory action of *Larrea divaricata* Cav. Fitoterapia, 67, 329-333.
- Anesini, C., Turner, S., Borda, E., Ferraro, G., Coussio, J. (2004). Effect of *Larrea divaricata* Cav. extract and nordihydroguaiaretic acid upon peroxidase secretion in rat submandibular glands. Pharmacological Research, 49, 441-448.
- Anibal, P.C., Sardi, J., Peixoto, I., Moraes, J., Höfling, J.F. (2010). Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. Brazilian Journal of Microbiology, 41(4), 824-831.

- Are, T., Jongrungruangchok, S. (2016). Crystallographic evidence for beta-cyclodextrin inclusion complexation facilitating the improvement of antioxidant activity of tea (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Carbohydrate Polymers*, 140, 362-373.
- Arnason, T.J., Guillet, G., Durst. (2004). Phytochemical diversity of insect defenses in tropical and temperate plant families. *Advances in Insect Chemical Ecology*, 1-10.
- Atay, E., Fabra, M.J., Martínez-Sanz, M., Gomez-Mascaraque, L.G., Altan, A, Lopez-Rubio, A. (2018). Development and characterization of chitosan/gelatin electrosprayed microparticles as food grade delivery vehicles for anthocyanin extracts. *Food Hydrocolloids*, 77, 699-710.
- Ávalos García, A., Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Avello, M., Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 494, 161-72.
- Avila, V., Bertolotti, S.G., Criado, S., Pappano, N., Debattista, N., García, N.A. (2001) Antioxidant properties of natural flavonoids: Quenching and generation of singlet molecular oxygen. *Journal of Food Science and Technology*, 36, 25-33.
- Ayoola, G.A., Coker, H.A.B., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia, E.C., Atangbayila, T.O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1019-1024.
- Azevedo, E.P., Santhana Mariappan, S.V., Kumar, V. (2012). Preparation and characterization of chitosans carrying aldehyde functions generated by nitrogen oxides. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 1925-1932.
- Bajko, E., Kalinowska, M., Borowski, P., Siergiejczyk, L. (2016). 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. *Journal of Food Science and Technology*, 65, 471-479.
- Bandara, H.M.H.N., Matsubara, V.H., Samaranayake, L.P. (2017). Future therapies targeted towards eliminating *Candida* biofilms and associated infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 15(3), 299-318.
- Barbour, M.G., Cunningham, G., Oechel, W.C., Bamberg, S.A. (1977). Growth and development form and function. In: Mabry, T.J., Hunziker, J.H., DiFeo Jr., D.R.

- (Eds.). Creosotebush: Biology and chemistry of *Larrea* in New World Deserts. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, PA, 48-91.
- Barbour, M.G., Díaz, D.V. (1973). *Larrea* plant communities on bajada and moisture gradients in the United States and Argentina. *Vegetatio*, 28, 335-352.
- Barbour, M.G., Díaz, D.V., Breidenbach, R.W. (1974). Contributions to the biology of *Larrea* species. *Ecology*, 55, 1199-1215.
- Barboza, G., Cantero, J., Nuñez, C., Pacciaroni, A., Ariza Espinar, L. (2009). Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 34(1-2), 7-365.
- Barreira, J.C.M., Ferreira, I.C.F.R. (2018). Artificial Antioxidants. In Reference Module in Food Science. Elsevier.
- Barreno, P.G. (2008). Inflamación. IX Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp), 102(1), 91-159.
- Barry, K.M., Davies, N.W., Mohammed, C.L. (2001). Identification of hydrolysable tannins in the reaction zone of *Eucalyptus nitens* wood by high performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 12, 120-127.
- Batallán, G., Torre, R., Flores, F., Königheim, B., Ludueña-Almeida, F., Tonn, C., Contigiani, M., Almirón, W. (2013). Larvicidal activity of crude extracts from *Larrea cuneifolia* (Zygophyllaceae) and of its metabolite nordihydroguaiaretic acid against the vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46, 84-87.
- Batlouni, M. (2010). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 94(4), 522-563.
- Batovska, D.I., Todorova, I.T. (2010). Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Current Clinical Pharmacology*, 5, 1-29.
- Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews*, 78, 547-581.
- Berger, M.M. (2005). Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition*, 24, 172-183.

- Bernstein, N., Akram, M., Daniyal, M., Koltai, H., Fridlender, M., Gorelick, J. (2018). Antiinflammatory Potential of Medicinal Plants: A Source for Therapeutic Secondary Metabolites. In *Advances in Agronomy*, 150, 131-183.
- Bettaieb, A., Cremonini E., Kang H., Kang J., Haj F.G., Oteiza P.I. (2016). Anti-inflammatory actions of (-) epicatechin in the adipose tissue of obese mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 81, 383-392.
- Bhargav, V., Kumar, R., Shivashankara, K.S., Manjunatha Rao, T., Dhananjaya, M.V., Sane, A., Usha Bharathi, T., Venugopalan, R., Roy, T.K. (2018). Diversity of flavonoids profile in China aster [*Callistephus chinensis* (L.) Nees.] genotypes. *Industrial Crops & Products*, 111, 513-519.
- Bigucci, F., Abruzzo, A., Vitali, B., Saladini, B., Cerchiara, T., Gallucci, M.C., Luppi, B. (2015). Vaginal inserts based on chitosan and carboxymethylcellulose complexes for local delivery of chlorhexidine: Preparation, characterization and antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(2), 456-463.
- Bilia, A.R. (2018). *Pharmaceutical Analysis: Plant Extracts*. In Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier.
- Blecha, J.E., Anderson, M., Chow, J., Guevarra, C., Pender, C., Penaranda, C., Zavodovskaya, M., Youngren, J., Berkman, C. (2007). Inhibition of IGF-1R and lipooxygenase by nordihydroguaiaretic acid (NDGA) analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 4026-4029.
- Blostein, F., Levin, E., Wagner, J., Foxman, B. (2017). Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Annals of Epidemiology*, 27 (9), 575-582.
- Bonarska-Kujawa, D., Pruchnik, H., Kleszczyńska H. (2012). Interaction of selected anthocyanins with erythrocytes and liposome membranes. *Cell Molecular Biology Letter*, 17, 289-308.
- Bongiovanni, G., Cantero, J., Eynard, A., Goleniowski, M. (2008). Organic extracts of *Larrea divaricata* Cav. induced apoptosis on tumoral MCF7 cells with an higher cytotoxicity than nordihydroguaiaretic acid or paclitaxel. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 7, 1-7.
- Borgnia, M., Maggi, A., Arriaga, M., Aued, B., Vila, B. L., Cassini, M.H. (2006). Caracterización de la vegetación en la Reserva de Biósfera Laguna Blanca (Catamarca, Argentina). *Ecología Austral*, 16, 29-45.
- Bradshaw, C.S., Sobel, J.D. (2016). Current treatment of bacterial vaginosis-limitations and need for innovation. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(1), S14-S20.

- Brooks, G.F., Carrol, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., Mietzner, T.A. (2011). Jawetz, Melnick, Adelberg. Microbiología médica. (25a ed.). (Blengio Pinto, J.R. Trad.) Estados Unidos: Mc Graw Hill.
- Burkart, A. (1952). Las Leguminosas argentinas, silvestres y cultivadas. 2da ed. ACME, Buenos Aires, Argentina.
- Butassi, E., Svetaz, L.A., Ivancovich, J.J., Feresin, G.E., Tapia, A., Zacchino, S.A. (2015). Synergistic mutual potentiation of antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav. and *Larrea nitida* Cav. extracts in clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Phytomedicine*, 22, 666-678.
- Butassi, E., Svetaz, L.A., Sortino, M.A., Quiroga, A.D., Carvalho, V.S.D., Cortés, J.C.G., Ribas, J.C., Zacchino, S.A. (2018). Approaches to the mechanism of antifungal activity of *Zuccagnia punctata*-*Larrea nitida* bi-herbal combination. *Phytomedicine*, in press.
- Burri, S.C.M., Ekholm, A., Håkansson, Å., Tornberg, E., Rumpunen, K. (2017). Antioxidant capacity and major phenol compounds of horticultural plant materials not usually used. *Journal of Functional Foods*, 38, 119-127.
- Bustos, P.S., Deza-Ponzio, R., Páez, P.L., Cabrera, J.L., Virgolini, M.B., Ortega, M.G. (2018). Flavonoids as protective agents against oxidative stress induced by gentamicin in systemic circulation. Potent protective activity and microbial synergism of luteolin. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 294-302.
- Cabrera, A.L. (1976). Regiones Fitogeográficas Argentinas. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. 2da ed. Kugler WF.
- Cabrera, A., Mach, N. (2012). Flavonoides como agentes quimiopreventivos y terapéuticos contra el cáncer de pulmón. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 16(4), 143-153.
- Cabrera, A.L., Willink, A. (1973). Biogeografía de América Latina. O.E.A. Serie de Biología, monografía. Washington, D.C., Estados Unidos, 120.
- Calderone, R.A., Fonzi, W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327-335.
- Calderone, R.A. (2002). *Candida and Candidiasis*. 3rd ed. American Society for Microbiology Press.
- Cancelo Hidalgo, M.J., Beltrán Vaquero, D., Calaf Alsina, J., Campillo Arias-Camisón, F., Cano Sanchez, A., Guerra Guirao, J.A., Neyro Bilbao, J.L. (2013). Protocolo Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia de diagnóstico y tratamiento de las

- infecciones vulvovaginales. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, 56(5), 278-284.
- Canturk, Z. (2018). Evaluation of synergistic anticandidal and apoptotic effects of ferulic acid and caspofungin against *Candida albicans*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 439-443.
- Carabajal, M.P.A., Isla, M.I., Zampini, I.C. (2017). Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of herbal teas from native plants used in traditional medicine in Argentina. *South African Journal of Botany*, 110, 258-265.
- Caramella, C.M., Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M.C., Sandri, G. (2015). Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 92, 39-52.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Catarino, M.D., Talhi, O., Rabahi, A., Silva, A.M.S., Cardoso, S.M. (2016). The Antiinflammatory Potential of Flavonoids: Mechanistic Aspects. In *Studies in Natural Products Chemistry*, (Elsevier B.V.), 65-99.
- Ceschel, G.C., Maffei, P., Lombardi, B.S., Ronchi, C., Rossi, S. (2001). Development of a mucoadhesive dosage form for vaginal administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27, 541-554.
- Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martinez, J.P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 130-180.
- Chakraborty, S., Liao, I.C., Adler, A., Leong, K.W. (2009). Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(12), 1043-1054.
- Chambers, H.F. (2006). General principles of antimicrobial therapy. In: Bruton LL, editor. *Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. 11th ed. USA: McGraw Hill, 1102-1104.
- Chen, L.M., Xu, Y.H., Zhou, C.L., Zhao, J., Li, C.Y., Wang, R. (2010). Over expression of CDR1 and CDR2 genes plays an important role in fluconazol resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C mutations. *Journal of International Medical Research*, 38, 536-545.

- Chen, Q. (2009). Nordihydroguaiaretic acid analogues: their chemical synthesis and biological activities. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(17), 1636-1659.
- Cheyrier, V., Tomas-Barberan, F.A., Yoshida, K. (2015). Polyphenols: from plants to a variety of food and nonfood uses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 7589-7594.
- Chieli, E., Romiti, N., Zampini, I.C., Garrido, G., Isla, M.I. (2012). Effects of *Zuccagnia punctata* extracts and their flavonoids on the function and expression of ABCB1/P-glycoprotein multidrug transporter. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(3), 797-801.
- Choudhary, N., Sekhon, B.S. (2011). An overview of advances in the standardization of herbal drugs. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2, (2), 55-70.
- Chovot, V. (2010). Simultaneous detection of pro- and antioxidative effects in the variants of the deoxyribose degradation assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2088-2094.
- Chung, K.T., Wei, C.I., Johnson, M.G. (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science and Technology*, 9, 168-175.
- Cialdella, A.M., Pometti, C.L. (2017). Taxonomic revision of the genus *Tetraglochin* (Rosaceae, Rosoideae) and morphometric analysis of its species. *Phytotaxa*, 296(3), 201-227.
- Cirak, M.Y., Kalkanci, A., Kustimur, S. (2003). Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(8), 1027-1032.
- Ciudad-Reynaud, A. (2007). Infecciones vaginales por candida: Diagnóstico y tratamiento. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 53(3), 159-166.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900-2911.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, M27-A3. Approved Standard, 3rd ed. Wayne, USA, 28(14).
- Christensen, L.P., Christensen, K.B. (2014). The Role of Direct and Indirect Polyphenolic Antioxidants in Protection Against Oxidative Stress. En: *Polyphenols*

- in Human Health and Disease, ed. Watson, R. R., Preedy, V. R., Zibadi, S. Elsevier Editora LTDA, 23, 289-309.
- Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira, J.P.Jr. (2009). Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. BMC Complementary Alternative Medicine, 9, 13-35.
- Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira, J.P.Jr. (2008). Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. Chemotherapy, 54, 328-330.
- Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J. (2010). The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents *in vitro*. Expert Review of Anti-infective Therapy, 8(3), 267-276.
- Cuenca-Estrella, M., Rodero, L., García-Effron, G., Rodríguez-Tudela, J.L. (2000). Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 49, 981-987.
- D'Almeida, R.E., Alberto, M.R., Morgan, P., Sedensky, M., Isla, M.I. (2015). Effect of structurally related flavonoids from *Zuccagnia punctata* Cav. on *Caenorhabditis elegans*. Acta Parasitologica, 60(1), 164-172.
- D'Almeida, R.E., Alberto, M.R., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I. (2012). Antimicrobial phenylpropanoids from the argentinean highland plant *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera. Journal of Ethnopharmacology, 142, 407-414.
- D'Almeida, R.E., Isla, M.I., Vildoza, E.L., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., Alberto, M.R. (2013). Inhibition of arachidonic acid metabolism by the Andean crude drug *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera. Journal of Ethnopharmacology, 150, 1080-1086.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). Manual de técnicas en histología vegetal. Hemisferio sur S.A., Buenos Aires.
- D'Andrea, G. (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? Fitoterapia, 106, 256-271.
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., Dhama, K. (2018). *Candida albicans*- Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control- An update. Microbial Pathogenesis, 117, 128-138.

- Das, U.N. (2018). Arachidonic acid in health and disease with focus on hypertension and diabetes mellitus: A review. *Journal of Advanced Research*, 11, 43-55.
- das Neves, J., Pinto, E., Teixeira, B., Dias, G., Rocha, P., Cunha, T., Santos, B., Amaral, M.H., Bahia, M.F. (2008). Vulvovaginal candidosis. *Drugs*, 68, 1787-1802.
- Davey, M. (2017). Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (2nd ed), 2, 462-467.
- Davicino, R., Genaro, A.M., Cremaschi, G., Anesini, C. (2011a). Leukotrienes antagonize the antiproliferative effect of *Larrea divaricata* Cav. on a lymphoma cell line interfering with cAMP intracellular level and PKC activity. *Cancer Investigation*, 29, 29-36.
- Davicino, R., Manuele, M.G., Turner, S., Ferraro, G., Anesini, C. (2010). Antiproliferative activity of *Larrea divaricata* Cav. on lymphoma cell line: participation of hydrogen peroxide in its action. *Cancer Investigation*, 28, 13-22.
- Davicino, R., Martino, R., Anesini, C. (2011b). *Larrea divaricata* Cav.: Scientific evidence showing its beneficial effects and its wide potential application. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10, 92-103.
- Davicino, R., Mattar, A., Casali, Y., Porporatto, C., Correa, S.G., Micalizzi, B. (2007). In vivo immunomodulatory effects of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 29, 352-366.
- David, R., Carde, J.P. (1964). Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif nadi. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences, Paris*, 258, 1338-1340.
- de Castro P.A., Bom V.L., Brown N.A., de Almeida R.S., Ramalho L.N., Savoldi M., Goldman M.H., Berretta A.A., Goldman G.H. (2013). Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, 60, 74-86.
- De la Rocha, N., María, A.O.M., Gianello, J.C., Pelzer, L. (2003). Cytoprotective effects of chalcones from *Zuccagnia punctata* and melatonin on gastroduodenal tract in rats. *Pharmacology Research*, 48, 97-99.
- de Vasconcellos, A.A, Gonçalves, L.M., Del Bel Cury, A.A., da Silva, W.J. (2014). Environmental pH influences *Candida albicans* biofilms regarding its structure, virulence and susceptibility to fluconazole. *Microbial Pathogenesis*, 69-70, 39-44.
- Devlin, T.M. (2006). *Bioquímica*. 4ta ed. Reverté S.A. (Ed). Barcelona, España.

- Del Pozo, J.L., Cantón, E. (2016). *Candida* biofilm-related infections. Revista Iberoamericana de Micología, 33(3), 176-183.
- Del Vitto, L.A., Petenatti, E.M., Petenatti, M.E. (1997). Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina). Primera Parte: Plantas Nativas. Multequina, 6, 49-66.
- Delgado Olivares, L., Betanzos Cabrera, G., Sumaya Martinez, M.T. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. Investigación y Ciencia, 50(1), 10-5.
- Devi, N.S., Ramanan, M., Paragi-Vedanthi, P., Doble, M. (2017). Phytochemicals as multi-target inhibitors of the inflammatory pathway- A modeling and experimental study. Biochemical and Biophysical Research Communications, 484(3), 467-473.
- Dizeo de Strittmatter, C. (1973). Nueva técnica de diafanización. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 15, 126-129.
- Dmour, I., Taha, M.O. (2018). Natural and semisynthetic polymers in pharmaceutical nanotechnology. Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery. Elsevier Inc., 35-100.
- Dodane, V., Vilivalam, V.D. (1998). Pharmaceuticals applications of chitosan. Pharmaceutical Science & Technology Today, 1, 246-253.
- Dubey, D., Padhy, R.N. (2013). Antibacterial activity of *Lantana camara* L. against multidrug resistant pathogens from ICU patients of a teaching hospital. Journal of Herbal Medicine, 3, 65-75.
- Dunaway, S., Odin, R., Zhou, L., Ji, L., Zhang, Y., Kadekaro, A.L. (2018). Natural antioxidants: Multiple mechanisms to protect skin from solar radiation. Frontiers in Pharmacology, 9, 392.
- Edeoga, H.O., Okwo, D.E., Mbaebie, B.O. (2005). Phytochemical Constituents of Nigerian Medicinal Plants. African Journal of Biotechnology, 4, 685-688.
- Edwards-Jones, V. (2013). Alternative antimicrobial approaches to fighting multidrug-resistant infections. In: Rai M, Kon K, editors. Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components. Amsterdam: Elsevier Inc., 1-9.
- Eichenberger, M., Lehka, B., Folly, C., Fischer, D., Martens, S., Simón, E., Naesbya, M. (2017). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for de novo production of dihydrochalcones with known antioxidant, antidiabetic, and sweet tasting properties. Metabolic Engineering, 39, 80-9.

- El-Habashy, S.E., Allam, A.N., El-Kamel, A.H. (2016). Ethyl cellulose nanoparticles as a platform to decrease ulcerogenic potential of piroxicam: formulation and *in vitro/in vivo* evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 2369-2380.
- EMA. (2001). Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo.
- Enache-Angoulvant, A. (2007). Reglas de interpretación de las infecciones por *Candida*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(4), 587-593.
- Engler, H.G.A. (1827). Zygophylleae. In: *Flora Brasiliensis*, XII, II, Fasc. Ed. von Martius C.F.P. 60, 73-74. <http://florabrasiliensis.cria.org.br/> (accessed 21.03.18).
- Ensign, L. M., Cone, R., Hanes, J. (2014). Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: a review. *Journal of Controlled Release*, 190, 500-514.
- Eraso, E., Sahand, I.H., Villar-Vidal, M., Marcos, C., Moragues, D., Madariaga, L., Pontón, J., Quindós, G. (2006). Usefulness of *Candida* ID2 agar for the presumptive identification of *Candida dubliniensis*. *Medical Mycology*, 44, 611-5.
- Escamilla Jiménez, C.I., Cuevas Martínez E.Y., Guevara Fonseca, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 52, 2.
- Esfanjani, A.F., Jafari, S.M. (2017). Nanoencapsulation of phenolic compounds and antioxidants. In *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients*. Elsevier. 63-101.
- Esimone, C.O., Okoye, F.B.C., Nworu, C.S., Agubata, C.O. (2008). *In vitro* interaction between caffeine and some penicillin antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 969-974.
- Ezcurra, E., Montaña, C., Arizaga, S. (1991). Architecture, light interception, and distribution of *Larrea* species in the Monte desert, Argentina. *Ecology*, 72, 23-34.
- Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D., Araujo-Escalona, A.G. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*, 35(5), 375-384.
- EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2012). Método para la determinación de CIM por dilución de agentes antifúngicos para levaduras. Definitive Document E.DEF 7.2 Revisión.
- Fakhim, H., Emami, S., Vaezi, Hashemi SM, Faeli L, Diba K, Dannaoui E, Badali H. (2016). *In vitro* activities of novel azole compounds ATTAF-1 and ATTAF-2 against fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(1), e01106-16.

- Fakurazi, S., Sharifudin, A., Arulsevan, P. (2012). *Moringa oleifera* hydroethanolic extracts effectively alleviate acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental rats through their antioxidant nature. *Molecules*, 17, 8334-8350.
- Farmacopea Argentina, 7ma ed. (2013). Buenos Aires, Argentina.
- Farmacopea de los Estados Unidos. (2003). NF 21. Rockville. US. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos, Inc.
- Farmacopea Europea. 6ta ed. (2007). Estrasburgo: Consejo de Europa.
- Farmacopea Europea. 9na ed. (2017). Estrasburgo: Consejo de Europa.
- Feldman, K.S., Iyer, M.R., Liu, Y. (2003). Ellagitannin Chemistry. Studies on the stability and reactivity of 2,4-HHDP-containing glucopyranose systems. *The Journal of Organic Chemistry*, 68(19), 7433-7438.
- Feldman, K.S, Smith, R.S. (1996). Ellagitannin Chemistry. First total synthesis of the 2,3- and 4,6-coupled ellagitannin pedunculagin. *The Journal of Organic Chemistry*, 61, 2606-2612.
- Fernandes, R.P.P, Trindade, M.A., de Melo, M.P. (2018). Chapter 2. Natural antioxidants and food applications: Healthy perspectives. *Alternative and Replacement Foods Handbook of Food Bioengineering*, 31-64.
- Fernando, C.D., Soysa, P. (2015). Optimized enzymatic colorimetric assay for determination of hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging activity of plant extracts. *Methods X*, 2, 283-291.
- Ferrer, J. (2000). Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 71, S21-S27.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O.H., Andersen, P.S., Girardin, S.E. (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clinical and Experimental Immunology*, 147, 227-235.
- Fischer, U.A., Carle, R., Kammerer, D.R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and different produced juices by HPLC-DAD-EWSI/MSn. *Food Chemistry*, 127, 807-821.
- Fisher, G. (2012). Chronic vulvovaginal candidiasis: What we know and what we have yet to learn. *Australasian Journal of Dermatology*, 53, 247-254.
- Flora Argentina. (2018). <http://www.floraargentina.edu.ar/> (accessed 09.03.18).
- Floriano-Sánchez, E., Villanueva, C., Medina-Campos, O.N., Rocha, D., Sánchez-González, D.J., Cárdenas-Rodríguez, N., Pedraza-Chaverri, J. (2006).

- Nordihydroguaiaretic acid is a potent *in vitro* scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents *in vivo* ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radical Research*, 40(5), 523-533.
- Forbes, B, Sahn, D., Weissfeld, A. (2004). *Diagnóstico Microbiológico*. 11a ed. Buenos Aires. Editorial Medica Panamericana. 1063, 354-357.
- Fourie, R., Ells, R., Kemp, G., Sebolai, O.M., Albertyn, J., Pohl, C.H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* produces aspirin insensitive eicosanoids and contributes to the eicosanoid profile of polymicrobial biofilms with *Candida albicans*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 117, 36-46.
- França, E.J., Andrade, C.G., Furlaneto-Maia, L., Serpa, R., Oliveira, M.T., Quesada, R.M, Furlaneto, M.C. (2011). Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of a clinical strain of *Candida tropicalis* and biofilm formation by variant phenotypes. *Micron*, 42(7), 726-732.
- Gajer, P., Brotman, R.M., Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U.M., Zhong, X., Koenig, S.S., Fu, L., Ma, Z.S., Zhou, X., Abdo, Z., Forney, L.J., Ravel, J. (2012). Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Science Translational Medicine*, 4(132), 132ra52.
- Gálvez Lima, A. (2007). Efecto antiinflamatorio de los ácidos grasos omega-3. *Scientifica*, 5(5), 43-49.
- García, E., Beck, S.G. (2006). Puna. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andres, La Paz, 51-76.
- García, G.A, García Cardona, A. (2009). A2 phospholipases: extended families and mechanisms of action. *Medicina y Cirugía*, 18(4), 199-209.
- Gaucher, M., Dugé de Bernonville, T., Lohou, D., Guyot, S., Guillemette, T., Brisset, M.N., Dat, J.F. (2013). Histolocalization and physico-chemical characterization of dihydrochalcones: insight into the role of apple major flavonoids. *Phytochemistry*, 90, 78-89.
- Genin, D., Alzérreca, H. (2006). Campos nativos de pastoreo y producción animal en la puna semiárida y árida andina. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 17(1), 265-274.
- Ghannoum, M.A., Burns, G.R., Elteen, K.A., Radwan, S.S. (1986). Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* spp. to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 54(1), 189-193.

- Giammanco, G.M., Pignato, S., Salvo, S., Giammanco, G. (2000). Carbohydrate assimilation profiles of the first Italian *Candida dubliniensis* clinical isolates recovered from an HIV-infected individual. *Research in Microbiology*, 151(10), 889- 891.
- Gil, M., González, L., Mendoza, V., Ochoa, M., Castrülo, S., Sánchez, J., Briceño, A. (2017). Capacidad de formación de biopelículas en especies del género *Candida* de procedencia clínica. *Revista Médica de Risaralda*, 23(2), 4-9.
- Gil-Hernández, A. (2010). Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición, 9, 18, 19. Tomo II. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos, 7, 17.
- Gómez Quintero, C.H. (2010). Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol *Candida yeast's resistance to fluconazol*. *Infectio*, 14, 172-180.
- Gómez-Mascaraque, L.G., Ambrosio-Martín, J., Fabra, M.J., Pérez-Masiá, R., López-Rubio, A. (2016a). Novel nanoencapsulation structures for functional foods and nutraceutical applications. In: *Nanotechnology in Nutraceuticals: Production to Consumption*, edited by Shampa Sen and Yashwant Pathak and published by Taylor & Francis Group LLC (Boca Raton, FL, USA). Chapter 20, 375-398.
- Gómez-Mascaraque, L.G., Dhital, S., López-Rubio, A., Gidley, M. (2017). Dietary polyphenols bind to potato cells and cellular components. *Journal of Functional Foods*, 37, 283-292.
- Gomez-Mascaraque, L.G., Fabra M.J., Castro-Mayorga, L., Sánchez G., Martínez-Sanz, M., Lopez-Rubio, A. Nanostructuring biopolymers for improved food quality and safety. Chapter 2, 33-64. *Handbook of Food Bioengineering*, 20. Biopolymers for food design.
- Gómez-Mascaraque, L.G., Lagarón, J. M., López-Rubio, A. (2015). Electrospayed gelatin submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods. *Food Hydrocolloids*, 49, 42-52.
- Gómez-Mascaraque, L.G., Méndez, J. A., Fernández-Gutiérrez, M., Vázquez, B., San Román, J. (2014). Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: Application to hydrogels of agarose-chitosan. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 798-811.
- Gómez-Mascaraque, L.G., Sanchez, G., López-Rubio, A. (2016b). Impact of molecular weight on the formation of electrospayed chitosan microcapsules as delivery vehicles for bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, 150, 121-130.

- Gong, X., Luan, T., Wu, X., Li, G., Qiu, H., Kang, Y., Qin, B., Fang, Q., Cui, W., Qin, Y., Li, J., Zang, B. (2016). Invasive candidiasis in intensive care units in China: risk factors and prognoses of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* infections. *American Journal of Infection Control*, 44, e59–e63.
- Gozalbo, D., Roig, P., Villamón, E., Gil, M.L. (2004). *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. *Current Drug Targets- Infectious Disorders*, 4, 117-135.
- Granger, D.N., Senchenkova, E. (2010). Colloquium series in integrated systems physiology: from molecule to function. Inflammation and the microcirculation. Morgan & Claypool Life Sciences (Ed). Estados Unidos.
- Gregorí Valdés, B.S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1.
- Grzesik, M., Naparło, K., Bartosz, G., Sadowska-Bartosz, I. (2018). Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chemistry*, 241, 480-492.
- Guillermo Navarro, R.F. (2002). Comprobación del efecto cicatrizante de *Peperomia scutellaefolia* R.et. P, Aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico. Tesis para obtener el título profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Peru.
- Guiver, M., Levi, K., Oppenheim, B.A. (2001). Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *Journal of Clinical Pathology*, 54(5), 362-366.
- Guzmán-Beltrán, S., Espada, S., Orozco-Ibarra, M., Pedraza-Chaverri, J., Cuadrado, A. (2008). Nordihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress. *Neuroscience Letters*, 447, 167-171.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255.
- Hardman, W.E. (2014). Walnuts have potential for cancer prevention and treatment in mice. *The Journal of Nutrition*, 144(4), 555S–560S.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K., Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against diseases. *Phytomedicine*, 15, 639-652.
- Hernández-Rodríguez, S., Gutiérrez-Salinas, J., García-Ortíz, L., Mondragón-Terán, P., Ramírez García, S., Núñez-Ramos, N.R. (2014). Estrés oxidativo y nitrosativo

- como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. *Medicina Interna de México*, 30(3), 295-308.
- Hwang, J.H., Jin, Q., Woo, E.R., Lee, D.G. (2013). Antifungal property of hibicuslide C and its membrane-active mechanism in *Candida albicans*. *Biochimie*, 95, 1917-1922.
- Hwang, J.Y., Shue, Y.S., Chang, H.M. (2001). Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels. *Food Research International*, 34, 639-647.
- Harborne, J. (1973). *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall Ltd. (Ed). London, 1-50.
- Hart, M.N., Loeffler, A.G. (2012). *Introduction to human disease: pathophysiology for health professionals*. 5ta ed. Jones & Bartlett Learning (Ed). Estados Unidos.
- Hay, P. (2018). Vaginal discharge. *Medicine*, 46 (6), 319-324.
- Heimark, L., Shipkova, P., Greene, J., Munayyer, H., Yarosh- Tomaine, T., Di Domenico, B., Hare, R., Pramanik, B.N. (2002). Mechanism of azole antifungal activity as determined by liquid chromatographic/ mass spectrometric monitoring of ergosterol biosynthesis. *Journal of Mass Spectrometry*, 37(3), 265-269.
- Hernández-Damian, J., Anderica-Romero, A.C., Pedraza-Chaverri, J. (2014). Paradoxical cellular effects and biological role of the multifaceted compound nordihydroguaiaretic acid. *Archiv der Pharmazie (Weinheim)*, 347, 685-697.
- Herrero de Lucas, E., Cachafeiro Fuciños, L., Asensio Martín, M.J., Cáceres Giménez, N. (2018). Interacciones entre el huésped y la microbiota. *Medicine*, 12(52), 3059-65.
- Hospenthal, D.R., Beckius, M.L., Floyd, K.L., Horvath, L.L., Murray, C.K. (2006). Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5, 1.
- Hunziker, J.H., Palacios, R.A., Poggio, L., Naranjo, C.A., Yang, T.W. (1977). Geographic distribution, morphology, hybridization cytogenetics and evolution. In: Mabry, T.J., Hunziker, J., DiFeo Jr., D.R. (Eds.), *Creosotebush: Biology and Chemistry of Larrea in New World Deserts*, 48-91.
- Hunziker, J.H., Palacios, R.A., Valesi, A.G., Poggio, L. (1972). Species disjunction in *Larrea*: evidence from morphology, cytogenetics, phenolic compounds, and seed albumins. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 59, 224-233.

- Hwu, J.R., Hsu, C.I., Hsu, M.H., Liang, Y.C., Huang, R.C.C., Lee, Y.C. (2011). Glycosylated nordihydroguaiaretic acids as anti-cancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 380-382.
- Ibezim, E.C., Esimone, C.O., Nnamani, P.O., Onyishi, I.V., Brown, S.A., Obodo, C.E. (2006). *In vitro* study of the interaction between some fluoroquinolones and extracts of kola nitida seed. *African Journal of Biotechnology*, 5, 1781-1784.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables (Review). *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- Inoue, K.H., Hagerman, A.E. (1988). Determination of gallotannin with rhodanine. *Analytical Biochemistry*, 169, 363-369.
- Insuasty-Obando, B. (2016). Las chalconas y su uso como precursores en la síntesis de compuestos heterocíclicos nitrogenados. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(155), 234-243.
- Isla, M.I., Moreno, M.A., Nuño, G., Rodríguez, F., Carabajal, A., Alberto, M.R., Zampini, I.C. (2016). *Zuccagnia punctata*: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Natural Product Communications*, 11, 1-7.
- Jang, S.A., Park, D.W., Kwon, J.E., Song, H.S., Park, B., Jeon, H., Sohn, E.H., Koo, H.J., Kang, S.C. (2017). Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF- α -stimulated vascular smooth muscle cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96, 563-571.
- Jayatilake, J.A. (2011). A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. *Mycopathologia*, 171(4), 235-250.
- Jimenez, C.M., Sampietro, D.A., Sgariglia, M.A., Soberón, J.R., Vattuone, M.A. (2014) Isolation, identification and usefulness of antifungal compounds from *Zuccagnia punctata* for control of toxigenic ear rot pathogens. *Natural Product Communications*, 9, 1461-1464.
- Johnson, I.M. (1940). The floristic significance of shrubs common to North and South America. *Journal of the Arnold Arboretum*, 21, 356-363.
- Kamatou, G.P.P., Van Zyl, R.L., Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Tilney, P.M. (2006). Chemical composition, leaf trichome types and biological activities of four related *Salvia* species indigenous to Southern Africa. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 72-79.

- Kanafani, Z.A., Perfect, J.R. (2008). Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, 46, 120-128.
- Kanatt, S.R., Chander, R., Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100, 451-458.
- Kandikattu, H.K., Rachitha, P., Krupashree, K., Jayashree, G.V., Abhishek, V., Khanum, F. (2015). LC-ESI-MS/MS analysis of total oligomeric flavonoid fraction of *Cyperus rotundus* and its antioxidant, damage protective and antihemolytic effects. *Pathophysiology*, 22(4), 165-173.
- Karimi-Sales, E., Mohaddes, G., Alipour, M.R. (2018). Chalcones as putative hepatoprotective agents: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Pharmacological Research*, 129, 177-187.
- Khan, H., Khan, Z., Amin, S., Mabkhot, Y.N., Mubarak, M.S., Hadda, T.B., Maione, F. (2017). Plant bioactive molecules bearing glycosides as lead compounds for the treatment of fungal infection: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 498-509.
- Khanbabaee, K., Van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports*, 18(6), 641-649.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 229-245.
- Kim, E.O., Min, K.J., Kwon, T.K., Um, B.H., Moreau, R.A., Choi, S.W. (2012). Antiinflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1309-1316.
- Kim, K.W., Thomas, R.L., Lee, C., Park, H.J. (2003). Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan and O-carboxymethylated chitosan. *Journal of Food Protection*, 66, 1495-1498.
- Kim, J., Lee, K.W., Lee, H.J. (2014). Polyphenols suppress and modulate inflammation: possible roles in health and disease. In: Watson, R., Preedy, V.R., Zibadi, S., editors. *Polyphenols in Human Health and Disease*. San Diego, CA: Elsevier Inc, 29, 393-408.
- Knapczyk, J., Macura, A.B., Pawlik, B. (1992). Simple tests demonstrating the antimycotic effect of chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, 80, 33-38.

- Knežević, S., Blažeković, B., Štefan, M.B., Babac, M. (2012). Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. En: *Phytochemicals as Nutraceuticals-Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, ed. Dr Rao, 9, 155-180.
- Kumar, V., Abbas, K.A., Fausto, N., Mitchell, R.N. (2008). Robbins. *Patología Humana*. 8va ed. Elsevier Saunders (Ed). España.
- Kwon, D.J., Bae, Y.S., Ju, S.M., Goh, A.R., Choi, S.Y., Park, J. (2011). Casuarinin suppresses TNF- α -induced ICAM-1 expression via blockade of NF- κ B activation in HaCaT cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409, 780-785.
- Lahtchev, K.L., Batovska, D.I., Parushev, S.P., Ubiyvovk, V.M., Sibirny, A.A. (2008) Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 2220-2228.
- Laport, R.G., Ramsey, J. (2015). Morphometric analysis of the North American creosotebush (*Larrea tridentata* Zygophyllaceae) and the microspatial distribution of its chromosome races. *Plant Systematics and Evolution*, 301, 1581-1599.
- Le Bourvellec, C., Renard, C.M.G.C. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(3), 213-248.
- Le Bourvellec, C., Guyot, S., Renard, C.M. (2004). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1672(3), 192-202.
- Lee, C.H., Jang, Y.S., Her, S.J., Moon, Y.M., Baek, S.J., Eling, T. (2003). Nordihydroguaiaretic acid, an antioxidant, inhibits transforming growth factor- β activity through the inhibition of Smad signaling pathway. *Experimental Cell Research*, 289, 335-341.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 21-33.
- Leroy, O., Gangneux, J.P., Montravers, P., Mira, J.P., Gouin, F., Sollet, J.P., Carlet, J., Reynes, J., Rosenheim, M., Regnier, B., Lortholary, O., AmarCand Study Group. (2009). Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Critical Care Medicine*, 37(5), 1612-1618.

- Lersten, N.R., Curtis, J.D. (1996). Survey of leaf anatomy, especially secretory structures, of tribe *Caesalpinieae* (*Leguminosae*, *Caesalpinioideae*). *Plant Systematic Evolution*, 200, 1-39.
- Leyva, E., Navarro-Tovar, G., Loredó-Carrillo, S.E., Santos Díaz, M.S. (2011). Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides. *Boletín de la Sociedad Química de México*, 5, 35-43.
- Li, F., Sun, X.Y., Li, X.W., Yang, T., Qi, L.W. (2017). Enrichment and separation of quercetin-3-O- β -d-glucuronide from lotus leaves (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) and evaluation of its anti-inflammatory effect. *Journal of Chromatography B*, 1040, 186-191.
- Li, Q.Q., Li, Q., Jia, J.N., Liu, Z.Q., Zhou, H.H., Mao, X.Y. (2018). 12/15 lipoxygenase: A crucial enzyme in diverse types of cell death. *Neurochemistry International*, 118, 34-41.
- Li, X., Jiang, J., Chen, Q., Xiao, S., Li, C., Gu, H., Zhang, H., Hu, J.L., Yao, F.H., Li, Q.G. (2013). Synthesis of nordihydroguaiaretic acid derivatives and their bioactivities on *S. pombe* and K562 cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 605-613.
- Li, X., Jin, L.J., Lu, Y.N., Zhen, Y.H., Li, S.Y., Wang, L.H., Xu, Y.P. (2009). Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): effects of chitosan concentration. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159(3), 778-787.
- Li, Y., Maciel, D., Rodrigues, J, Shi, X., Tomás, H. (2015). Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery. *Chemical Review*, 115, 8564-8608.
- Li, Y., Xiao, Y., Liu, C. (2017). The horizon of materiobiology: A perspective on material-guided cell behaviors and tissue engineering. *Chemical Review*, 117(5), 4376-4421.
- Lia, V.V., Confalonieri, V.A., Comas, C.I., Hunziker, J.H. (2001). Molecular phylogeny of *Larrea* and its allies (*Zygophyllaceae*): reticulate evolution and the probable time of creosote bush arrival to North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21, 309-320.
- Liébana-Ureña, J. (2002). *Microbiología oral*. 2da ed. Madrid: McGraw-Hill, Interamericana de España.

- Lin, L.Z., Sun, J., Chen, P., Monagas, M.J., Harnly, J.M. (2014). UHPLC-PDA-ESI/HRMS profiling method to identify and quantify oligomeric proanthocyanidins in plant products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9387-9400.
- Lipińska, L., Klewicka, E., Sójka, M. (2014). The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13, 289-299.
- Liu, Y., Filler, S.G. (2011). *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell*, 10(2), 168-73.
- Liu, Y., Zhao, Y., Guo, D., Liu, W., Liu, Y. (2017). Synergistic antimicrobial activity of berberine hydrochloride, baicalein and borneol against *Candida albicans*. *Chinese Herbal Medicines*, 9, 353-357.
- Logemann, H.E. (2000). *Manual Práctico de Micología Médica*. Guatemala: Editorial Universitaria, 227, 40-45.
- 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.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M.A., Portolés, A. (2008). Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. 18a ed. Panamericana (Ed). Buenos Aires, Argentina.
- Lu, J.M., Nurko, J., Weakley, S.M., Jiang, J., Koungias, P., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C. (2010). Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: an update. *Medical Science Monitor*, 16, RA93-R100.
- Lu, M., Yu, C., Cui, X., Shi, J., Yuan, L., Sun, S. (2018). Gentamicin synergises with azoles against drug-resistant *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51.
- Luessen, H.L., de Leeuw, B.J., Langemeyer, M.W., de Boer, A.B., Verhoef, J.C., Junginger, H.E. (1996). Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery: VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin in vivo. *Archives of Pharmacal Research*, 13, 1668-1672.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990). *Fruit Phenolics*. Boca Raton, USA: CRC Press.

- Mansuri, S., Kesharwani, P., Jain, K., Tekade, R.K., Jain, N.K. (2016). Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers*, 100, 151-172.
- Marciello, M., Silvia, R., Caramella, C., Remuñan-López, C. (2017). Freeze-dried cylinders carrying chitosan nanoparticles for vaginal peptide delivery. *Carbohydrate Polymers*, 170, 43-51.
- Marinova, E.M., Toneva, A., Yanishlieva, N. (2009). Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. *Food Chemistry*, 114, 1498-1502.
- Maron, D.M., Ames, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113, 173-215.
- Marotte, C., Zeni, S.N. (2013). Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(4), 661-674.
- Martin, R., Soberon, N., Vazquez, F., Suarez, J.E. (2008). Vaginal microbiota: composition, protective role, associated pathologies, and therapeutic perspectives, 26(3), 160-167.
- Martins, N., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R. (2016). *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 1-12.
- Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. (2015). Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*, 74, 648-670.
- Martínez, E., Garrido, O. (2013). Farmacocinética: antiulcerosos y antiinflamatorios. *Revista del Hospital Juárez de México*, 80(1), 41-53.
- Martínez Peña, M.D., Castro Escarpulli, G., Aguilera Arreola, M.G. (2012). Microbiota vaginal normal: los lactobacilos. *MedLab*, 4(1), 17-25.
- Martínez, S., Mollinedo, P., Almanza, G., Terrazas, E. (2011). Estudio *in vitro* de la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre *Candida albicans*. *Revista Boliviana de Química*, 28(1), 35-40.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17, 271-278.
- Martino, R., Arcos, M.L.B., Alonso, R., Sülsen, V., Cremaschi, G., Anesini, C. (2016). Polyphenol-rich fraction from *Larrea divaricata* and its main flavonoid quercetin-3-methyl ether induce apoptosis in lymphoma cells through nitrosative stress.

- Phytotherapy Research, 30, 1128-1136.
- Martin-Villena, M.J., Fernandez-Campos, F., Calpena-Campmany, A.C., Bozal-de Febrer, N., Ruiz-Martinez, M.A., Clares-Naveros, B. (2013). Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: development and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 94, 1-11.
- Marzouk, M.S., Moharram, F.A., Mohamed, M.A., Gamal-Eldeen, A.M., Aboutabl, E.A. (2007). Anticancer and antioxidant tannins from *Pimenta dioica* leaves. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(7-8), 526-36.
- Meirer, K., Steinhilber, D., Proschak, E. (2014). Inhibitors of the arachidonic acid cascade: interfering with multiple pathways. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 114, 83-91.
- Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J.L. (2002). Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20(10), 523-530.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., Carvalho, M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2285-2291.
- Mercado, M.I., Ruiz, A.I., Zampini, I.C., Nuño, G., Cuello, S., Isla, M.I., Ponessa, G.I. (2013). Arquitectura y morfoanatomía foliar y caulinar de *Zuccagnia punctata* (Fabaceae). Histolocalización de compuestos bioactivos. *Lilloa*, 50(2), 58-68.
- Mercado-Mercado, G., Rosa, L.A. de la, Wall-Medrano, A., López Díaz, J.A., Alvarez-Parrilla, E. (2013). Revisión compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), 36-46.
- Metcalfe, C., Chalk, L. (1972). *Anatomy of the Dicotyledons, II*. Clarendon Press, Oxford.
- Meyer, R.E., Meola, S.M. (1978). Morphological characteristics of leaves and stems of selected Texas woody plants. United States Department of Agriculture. Technical Bulletin, 1564, 1-204.
- Milan, J.D. (1978). Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería: Descripción de Plantas Cultivadas. 3ra ed. ACME S.A.C.I. (Ed.). Buenos Aires, Argentina. Tomo 1, 1, 440.
- Modrzewska, B., Kurnatowski, P. (2015). Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Annals of Parasitology*, 61(1), 3-9.

- Mohandas, V., Ballal, M. (2011). Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. *Journal of global infectious diseases*, 3(1), 4-8.
- Mojab, F., Kamalinejad, M., Ghaderi, N., Vahidipour, H.R. (2003). Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2(2), 77-82.
- Mondolot-Cosson, L., Andary, C., Guang-Hui, D., Roussel, J.L. (1997). Histolocalisation de substances phénoliques intervenant lors d'interactions plante-pathogène chez le tournesol et la vigne. *Acta Botanica Gallica*, 144, 353-362.
- Moody, J. (2007). Antimicrobial susceptibility testing. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed., section 5 (5.12). ASM Press, Washington DC. USA.
- Morace, G., Perdoni, F., Borghi, E. (2014). Antifungal drug resistance in *Candida* species. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2, 254-259.
- Morán Vieyra, F., Boggetti, H., Zampini, I., Ordoñez, R., Isla, M., Alvarez, R., De Rosso, V., Mercadante, A., Borsarelli, C. (2009) Singlet oxygen quenching and radical scavenging capacities of structurally related flavonoids present in *Zuccagnia punctata* Cav. *Free Radical Research*, 43, 553-564.
- Morello, J. (1958). La Provincia Fitogeográfica del Monte. *Opera Lilloana*, 2, 5-115.
- Moreno, A., Nuño, G., Cuello, S., Sayago, J., Alberto, M.R., Zampini, C., Isla, M.I. (2015). Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activity characterization and toxicity studies of flowers of "Jarilla", a medicinal shrub from Argentina. *Natural Product Communications*, 6, 991-994.
- Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 29-60.
- Mundhe, N.A., Kumar, P., Ahmed, S., Jamdade, V., Mundhe, S., Lahkar, M. (2015). Nordihydroguaiaretic acid ameliorates cisplatin induced nephrotoxicity and potentiates its anti-tumor activity in DMBA induced breast cancer in female Sprague-Dawley rats. *International Immunopharmacology*, 28, 634-642.
- Murakami, M., Yamamoto, K., Miki, Y., Murase, R., Sato, H., Taketomi, Y. (2016). The roles of the secreted phospholipase A2 gene family in immunology. *Advances in Immunology*, 132, 91-134.

- Nagashima, M., Yamagishi, Y., Mikamo, H. (2016). Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from the patients with vaginal candidiasis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22, 124-126.
- Nathiya, S., Durga, M., Devasena, T. (2014). Quercetin, encapsulated quercetin and its application- a review. *Analgesia*, 10, 11.
- Negrón, M. (1999). *Microbiología estomatológica: Fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires, Madrid. Medica Panamericana, 400.
- Neu, R. (1957). A new reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms. *Naturwissenschaften*, 43, 147-156.
- Nieva Moreno, M.I., Isla, M.I., Cudmani, N.G., Vattuone, M.A., Sampietro, A.R. (1999). Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 97-102.
- Niimi, M., Firth, N.A., Cannon, R.D. (2010). Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology*, 98(1), 15-25.
- Nobile, C.J., Johnson, A.D. (2015). *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annual Review of Microbiology*, 69, 71-92.
- Nuño, G. (2015). Tesis Doctoral. Aislamiento y caracterización de biomoléculas producidas por especies vegetales que crecen en ecosistemas semiáridos. Universidad Nacional de Tucumán.
- Nuño, G., Alberto, M.R., Arena, M.E., Zampini, I.C., Isla, M.I. (2016). Effect of *Zuccagnia punctata* Cav. (Fabaceae) extract on pro-inflammatory enzymes and on planktonic cells and biofilm from *Staphylococcus aureus*. Toxicity studies. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Nuño, G., Alberto, M., Zampini, I., Cuello, S., Ordoñez, R., Sayago, J., Baroni, V., Wunderlin, D., Isla, M.I. (2014). The effect of *Zuccagnia punctata* Cav, an Argentina medicinal plant, on virulence factors from *Candida* species. *Natural Product Communications*, 9, 933-936.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.
- Oliva, M. de las M., Gallucci, M.N., Carezzano, M.E., Demo, M.S. (2013). Natural products as alternative treatments for *Candida* species resistant to conventional chemotherapeutics. In *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 31-43.

- Olivas-Aguirre, F.J., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G.A., López-Díaz, J.A., Álvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L.A., Ramos-Jiménez, A. (2015). Taninos hidrolizables: bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 55-66.
- Onwukaeme, D.N., Ikuegbvweha, T.B., Asonye, C.C. (2007). Evaluation of phytochemical constituents, antibacterial activities and effect of exudate of *Pycanthus angolensis* Weld Warb (Myristicaceae) on corneal ulcers in rabbits. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6(2), 725-730.
- Ordoñez, A.A., Gomez, D., Vattuone, M.A., Isla, M.I. (2006). Antioxidant activity of *Sechium edule* (Jacq) Swartzll. *Food Chemistry*, 97(3), 452-458.
- Orqueda, M.E., Rivas, M., Zampini, I.C., Alberto, M.R., Torres, S., Cuello, S., Sayago, J., Thomas-Valdes, S., Jiménez-Aspee, F., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I. (2017). Chemical and functional characterization of seed pulp and skin powder from chilito (*Solanum betaceum*), an Argentine native fruit. Phenolic fractions affect key enzymes involved in metabolic syndrome and oxidative stress. *Food Chemistry*, 216, 70-79.
- Ortega, C., María, O., Gianello, J. (2000). Chemical components and biological activity of *Bidens subalternans*, *B. aurea* (Astereaceae) and *Zuccagnia punctata* (Fabaceae). *Molecules*, 5(3), 465-467.
- Ortiz, M.I., Ramirez-Montiel, M.L., Gonzalez-Garcia, M.P., Ponce-Monter, H.A., Castaneda-Hernandez, G., Carino-Cortes, R. (2010). The combination of naproxen and citral reduces nociception and gastric damage in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 33, 1691-1697.
- Ortiz-Barrera, E., Macías-Carranza, V., Cabello-Pasini, A. (2015). Precipitación de polifenoles de vino utilizando colágeno de piel y vejiga natatoria de peces, *CyTA- Journal of Food*, 13(4), 597-602.
- Otoo, H.N., Kyeng, G.L., Qiu, W., Lipke, P.N. (2008). *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences. *Eukaryot Cell*, 7(5), 776-82.
- Ozçelik, B., Kartal, M., Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, 49, 396-402.
- Oztürk, R.H., Ayar-Kayali, L. (2008). Tarhan Characterization of the antioxidant properties of seeds and skins in selected Turkish grapes. *Asian Journal of Chemistry*, 20(5), 3750-3762.

- Palmeira-de-Oliveira, A., Ramos, A.R., Gaspar, C., Palmeira-de-Oliveira, R., Gouveia, P., Martinez-de-Oliveira, J. (2012). *In vitro* anti-*Candida* activity of lidocaine and nitroglycerin: alone and combined. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 727248.
- Palmeira-de-Oliveira, R., Palmeira-de-Oliveira, A., Martinez-de-Oliveira, J. (2015). New strategies for local treatment of vaginal infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 92, 105-122.
- Pardi Célis, G., Guilarte, G.C., Cardozo, E.I. (2008). Detección de *Candida albicans* en pacientes con candidiasis pseudomembranosa. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*, 20(3), 228-36.
- Pederiva, R., Giordano, O. (1984). 3,7-Dihydroxy-8-methoxyflavone from *Zuccagnia punctata*. *Phytochemistry*, 23, 1340-1341.
- Pederiva, R., Kavka, J., D'Arcangelo, A.T. (1975). Chalconas y flavanonas aisladas de *Larrea nitida* Cav. *Annales de la Asociación Química Argentina*, 63, 85-90.
- Pedernera, A.M., Guardia, T., Calderon, C.G., Rotelli, A.E., de la Rocha, N.E., Genaro, S.D., Pelzer, L.E. (2006). Anti-ulcerogenic and anti-inflammatory activity of the methanolic extract of *Larrea divaricata* Cav. in rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 415-420.
- Peixoto, C.M., Dias, M.I., Alves, M.J., Calhelha, R.C., Barros, L., Pinho, S.P., Ferreira, I.C.F.R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, 253, 132-138.
- Peñarrieta, J.M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J.L., Bravo, J.A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
- Pérez, M.J., Cuello, A.S., Zampini, I.C., Ordoñez, R.M., Alberto, M.R., Quispe, C. Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I. (2014). Polyphenolic compounds and anthocyanin content of *Prosopis nigra* and *Prosopis alba* pods flour and their antioxidant and anti-inflammatory capacity. *Food Research International*, 762-771.
- Perlin, D.S. (2009). Antifungal drug resistance: Do molecular methods provide a way forward? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22, 568-573.
- Perioli, L., Amrogi, V., Pagano, C., Massetti, E., Rossi, C. (2011). New solid mucoadhesive systems for benzydamine vaginal administration. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 84, 413-420.

- Petrova, M.I., van den Broek M., Balzarini, J., Vanderleyden, J., Lebeer, S. (2013). FEMS Microbiology Reviews, 37, 762-792.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Jones, R.N. (2002). Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from the pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program. Journal of Clinical Microbiology, 40, 852-856.
- Pfaller, M. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. The American Journal of Medicine, 125(1), S3-13.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J. (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. Critical Reviews in Microbiology, 36(1), 1-53.
- Pierce, C.G., Lopez-Ribot, J.L. (2013). Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. Expert Opinion on Drug Discovery, 8(9), 1117-1126.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). Antioxidants in food. Practical applications, 3, 21-22.
- Polacheck, I., Strahilevitz, J., Sullivan, D., Donnelly, S., Salkin, I.F., Coleman, D.C. (2000). Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus infected patients in Israel. Journal of Clinical Microbiology, 38(1), 170-174.
- Porras, M., Madrigal, S., Vega, J. (2012). Síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano funcionalizadas con extractos de la mora (*Rubus glaucus*) y su evaluación preliminar como agentes antimicrobianos. Revista Científica, 22, 81-91.
- Preedy, V.R. (2015). Coffee in health and disease prevention. London: Elsevier.
- Prior, R.L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M.J., Reed, J. (2010). Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90, 1473-1478.
- Pyykko, M. (1966). The leaf anatomy of East Patagonian xeromorphic plants. Annales Botanici Fennici, 3, 453-622.
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hospitalaria, 27(1), 76-89.
- Quiroga, E.M., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. (2001). Screening antifungal activities of selected medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 74, 89-96.
- Ragonese, A.M. (1960). Estudio anatómico de las especies argentinas de *Larrea* (Zygophyllaceae). Revista de Investigaciones Agrícolas, 14, 355-370.

- Ramage, G., Vandewalle, K., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L. (2001). Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18, 163-70.
- Ramírez, M., Barajas, L., Pérez, C., Sáenz, A., Silva, S. (2012). Síntesis y actividad biológica de chalconas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(4), 7-14.
- Ratera, E.L., Ratera, M. (1980). *Plantas de la Flora Argentina empleadas en medicina popular*. 1st ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Hemisferio Sur Sociedad Anónima.
- Rautemaa, R., Ramage, G. (2011). Oral candidosis- clinical challenges of a biofilm disease. *Critical Reviews in Microbiology*, 37, 328-336.
- Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F., Firuzi, O. (2013). Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, 20, 4436-4450.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9/10), 1231-1237.
- Redhu, N.S., Saleh, A., Halayko, A.J., Ali, A.S., Gounni, A.S. (2011). Essential role of NF- κ B and AP-1 transcription factors in TNF- α -induced TSLP expression in human airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(3), L479-L485.
- Reiche, K. (1896). *Zygophyllaceae. Flora de Chile, I, Parte 2*. Imprenta Cervantes, Santiago de Chile.
- Reid, G., Bruce, A.W. (2003). Urogenital infections in women: can probiotics help? *Postgraduate Medical Journal*, 79(934), 428-32.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 1603-1616.
- Rhen, T., Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids- new mechanisms for old drugs. *The New England Journal of Medicine*, 353, 1711-1723.
- Ribeiro, D., Freitas, M., Tomé, S.M., Silva, A.M.S., Porto, G., Cabrita, E.J., Marques, M.M.B., Fernandes, E. (2014). Inhibition of LOX by flavonoids: a structure-activity relationship study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 72, 137-145.
- Rice, A., ElWerdany, M., Hadoura, E., Mahmood, T. (2016). Vaginal discharge. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*, 26(11), 317-323.

- Rider, P., Carmi, Y., Cohen, I. (2016). Biologics for targeting inflammatory cytokines: clinical uses, and limitations. *International Journal of Cell Biology*, 9259646.
- Riera, F.O., Caeiro, J.P., Denning, D.W. (2018). Burden of serious fungal infections in Argentina. *Journal of Fungi*, 4(2), 51.
- Riviere, C. (2016). Dihydrochalcones: Occurrence in the plant kingdom, chemistry and biological activities. In *Studies in Natural Products Chemistry*. Atta-ur-Rahman, Ed. Elsevier: Amsterdam, Netherlands. Chapter 7, 51, 253-381.
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Nuevo León: Omniascience.
- Roco, J., Alarcon, G., Sierra, L., Zampini, C., Isla, M.I., Jerez, S. (2017). Beneficial effects of hydroalcoholic extract and flavonoids from *Zuccagnia punctata* in a rabbit model of vascular dysfunction induced by high cholesterol diet. *Medicinal Chemistry Research*, 26, 2336-2344.
- Roco, J., Alarcon, G., Medina, M., Zampini, C., Isla, M.I., Jerez, S. (2018). Oral administration of *Zuccagnia punctata* extract improves lipid profile, reduces oxidative stress and prevents vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Phytomedicine*, in press.
- Rodrigues da Silva, L., Martins, V.L., Bantim Felicio Calou, I., Meireles de Deus, M., Ferreira, P., Peron, A.P. (2015). Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. *Acta Toxicológica Argentina*, 23(1), 36-43.
- Rodrigues, F., Costa, J., Coutinho, H. (2009). Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine*, 16, 1052-1055.
- Rodríguez, H.N., Valderrama, N.A., Alarcón, C.H., López, M.A. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76, 336-354.
- Roig, F.A., Rossi, B. (2001). Flora y vegetación de la reserva. In: Claver, S., Roig-Juñent, S. (Eds.). *El desierto del Monte: La Reserva de Biosfera de Ñacuñán*. IADIZA-MAB-UNESCO, Córdoba.
- Roig, F.A., Roig-Juñent, S., Corbalán, V. (2009). Biogeography of the Monte Desert. *Journal of Arid Environments*, 73, 164-172.
- Rojas-Espinosa, O., Arce-Paredes, P. (2004). Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Tercera parte. *Bioquímica*, 29(2), 55-67.

- Roleira, F.M.F., Tavares-Da-Silva, E.J., Varela, C.L., Costa, S.C., Silva, T., Garrido, J., Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*, 183, 235-258.
- Roleira, F.M.F., Varela, C.L., Costa, S.C., Tavares-da-Silva, E.J. (2018). Phenolic derivatives from medicinal herbs and plant extracts: anticancer effects and synthetic approaches to modulate biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 57, 115-156.
- Rossoni, R.D., Barros, P.P., Freire, F., Santos, J.D.D., Jorge, A.O.C., Junqueira, J.C. (2017). Study of microbial interaction formed by “*Candida krusei*” and “*Candida glabrata*”: “*In vitro*” and “*in vivo*” studies. *Brazilian Dental Journal*, 28, 669-674.
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M.V., Valentin, E., Sentandreu, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity; *FEMS Yeast Research*, 6, 14-29.
- Sáez, V., Hernández, E., Angulo, L.S. (2004). Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales poliméricos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5, 55-70.
- Sandhu, A.K., Gu, L. (2010). Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4681-4692.
- Sardi, J.C.O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M., Giannini, M.M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 10-24.
- Saric, S., Sivamani, R.K. (2016). Polyphenols and Sunburn. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1521.
- Satake, H., Shiraishi, A., Koyama, T., Matsumoto, E., Morimoto, K., Bahabadi, S.E., Ono, E., Murata, J. (2017). Lignan biosynthesis for food bioengineering. *Food Biosynthesis*, 1, 1st ed. Chapter 12, 351-379.
- Sawant, B., Khan, T. (2017). Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 1478-1490.
- Schelz, Z., Molnar, J, Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77, 279-285.

- Schmidt, T.J., Rzeppa, S., Kaiser, M., Brun, R. (2012). *Larrea tridentata*- absolute configuration of its epoxyignans and investigations on its antiprotozoal activity, *Phytochemistry Letters*, 5, 632-638.
- Schurink, M. (2007). Peptides as inhibitors of lipoxygenase and tyrosinase. PhD thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., Heber, D. (2005). *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 360-367.
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A.-M., Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, S310-S329.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterápicos*. Editor: Pinzón S.R. Área de Ciencia y Tecnología del Convenio Andrés Bello y Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos, Subprograma X CYTED. Colombia.
- Sher, A. (2009). Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. *Gomal Journal of Medical Sciences*, 7(1), 72-8.
- Shahidi, F., Yeo, J. (2018). Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1573.
- Shirumalla, R.K., Naruganahalli, K.S., Dastidar, S.G., Sattigeri, V., Kaur, G., Deb, C., Gupta, J.B., Salman, M., Ray, A. (2006). RBx 7796: a novel inhibitor of lipoxygenase. *Inflammation Research*, 12, 517-527.
- Sieniawska, E., Baj, T. (2017). Tannins. *Plant Metabolites: Their Chemistry*. Medical University of Lublin, Lublin, Poland. Chapter 10.
- Sifuentes, N.I. (2011). *Elaboración y caracterización de películas conformadas por biomoléculas y nanopartículas*. Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, IPN. México.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288-305.

- Silva, V.V., Díaz, J.M.C., Febré, N, Red de Diagnóstico en Micología Médica. (2002) Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Revista Chilena de Infectología*, 19(2), 149-156.
- Silva, V., Cabrera, M., Diaz, M.C., Abarca, C., Hermosilla, G. (2003). Prevalence of *Candida albicans* serotypes in blood isolates in Chile, and first report of *Candida dubliniensis* candidemia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20(2), 46-51.
- Simpson, B.B., Neff, J.L., Moldenke, A.R. (1977). Reproductive systems of *Larrea*. In: Mabry, T.J., Hunziker, J., DiFeo Jr., D.R. (Eds.), *Creosotebush: Biology and Chemistry of Larrea in New World Deserts*. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, PA, 92-114.
- Singh, I., Pawar, P., Sanusi, E.A., Odeku, O.A. (2017). Mucoadhesive polymers for drug delivery systems. In: *Adhesion in Pharmaceutical, Biomedical and Dental Fields* (eds K. Mittal and F. Etzler).
- Singh R.P., Chidambara Murthy, K.N., Jayaprakasha, G.K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 81-86.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sivakumar, T., Srinivasan, K., Rajavel, R., Vasudevan, M., Ganesh, M., Kamalakannan, K., Mallika, P. (2009). Isolation of chemical constituents from *Prosopis juliflora* bark and anti-inflammatory activity of its methanolic extracts, 2(3), 551-556.
- Sivam, A.S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C.O., Waterhouse, G.I.N. (2012). Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; A FTIR and HPLC investigation. *Food Chemistry*, 131(3), 802-810.
- Smyth, E.M., FitzGerald, G.A. (2010). Prostaglandin mediators. Chapter 150, in *Handbook of Cell Signaling*, 3(2), 1219-1228.
- Smyth, J., Mullen, C.C., Jack, L., Collier, A., Bal, A.M. (2018). Diabetes, malignancy and age as predictors of *Candida glabrata* bloodstream infection: A re-evaluation of the risk factors. *Journal De Mycologie Medicale*, in press.
- Sobel, J.D. (2007). Vulvovaginal candidiasis. *Lancet*, 369, 1961-1971.
- Sobel, J.D. (2016). Recurrent vulvovaginal candidiasis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 214, 15-21.

- Soll, D. R. (1990). Dimorphism and high frequency switching in *Candida albicans*. The Genetics of *Candida*, eds. Kirsch, D.R., Kelly, R. Kurtz, M.B. (CRC Press, Boca Raton, FL), 147-176.
- Solorzano, E.R., Bortolini, C., Bogialli, S., Di Gangi, I.M., Favaro, G., Maldonado, L., Pastore, P. (2017). Use of a LC-DAD-QTOF system for the characterization of the phenolic profile of the argentinean plant *Zuccagnia punctata* and of the related propolis: new biomarkers. *Journal of Functional Foods*, 33, 425-435.
- Sosnik, A., Das Neves, J., Sarmiento, B. (2014). Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. *Progress in Polymer Science*, 39, 2030-2075.
- Spagnuolo, C., Moccia, S., Russo, G.L. (2018). Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 153, 105-115.
- Spampinato, C., Leonardi, D. (2013). *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Research International*, 13.
- Stege, P.W., Davicino, R.C., Vega, A.E., Casali, Y.A., Correa, S., Micalizzi, B. (2006). Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*. *Phytomedicine*, 13(9-10), 724-727.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358, 135-138.
- Suárez-Medina, K., Coy-Barrera, E. (2016). Diversity of bioactive naturally-occurring organic compounds: a singularity expressed by the secondary metabolism plasticity. *Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 252-269.
- Sugimoto, K., Takei, Y. (2017). Pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatology Research*, 47(1), 70-9.
- Sun, L., Liao, K., Hang, C. (2018). Caffeic acid phenethyl ester synergistically enhances the antifungal activity of fluconazole against resistant *Candida albicans*. *Phytomedicine*, 40, 55-58.
- Sun, W., Wang, D., Yu, C., Huang, X., Li, X., Sun, S. (2017). Strong synergism of dexamethasone in combination with fluconazole against resistant *Candida albicans* mediated by inhibiting drug efflux and reducing virulence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50, 399-405.

- Svetaz, L., Agüero, M.B., Alvarez, S., Luna, L., Feresin, G., Derita, M., Tapia, A., Zacchino, S. (2007). Antifungal activity of chalcones from *Zuccagnia punctata* Cav. acting against clinically important fungi and studies of mechanism of action. *Planta Medica*, 73, 1074-1080.
- Svetaz, L., Tapia, A., López, S., Furlán, R., Petenatti, E., Pioli, R., Schmeda-Hirschmann, G., Zacchino, S. (2004). Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3297-3300.
- Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., Cechinel Filho, V., Giménez, A., Pinzón, R., Zacchino, S.A., Gupta, M. (2010). Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 137-158.
- Tamayo, R.P., Cordella, L. (2007). *Principios de Patología*. 4a ed. Mexico D.F. Panamericana.
- Tangarife-Castaño, V., Correa-Royero, J., Zapata-Londono, B., Durán, C., Stanshenko, E., Mesa-Arango, A.C. (2011). Anti *Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infection*, 15, 160-167.
- Taofiq, O., González-Paramás, A., Barreiro, M., Ferreira, I. (2017). Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. *Molecules*, 22, 281.
- Tardif, K.D., Schlaberg, R. (2017). Development of a Real-Time PCR assay for the direct detection of *Candida* species causing vulvovaginal candidiasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(1), 39-40.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J., Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed Research International*, 251754.
- Teke, G.N., Kuate, J.R., Kueté, V., Teponno, R.B., Tapondjou, L.A., Tane, P., Giacinti, G., Vilarem, G. (2010). Bio-guided isolation of potential antimicrobial and antioxidant agents from the stem bark of *Trilepisium madagascariense*. *South African Journal of Botany*, 77, 319-327.

- Thomas, E., Vandebroek, I., Sanca, S., Van Damme, P. (2009). Cultural significance of medicinal plant families and species among Quechua farmers in Apillapampa, Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 60-67.
- Tibaldi, C., Cappello, N., Latino, M.A., Masuelli, G., Marini, S., Benedetto, C. (2009). Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic non-pregnant females: risk factors and rates of occurrence. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(7), 670-679.
- Tiwari, P., Sangwan, R.S., Sangwan, N.S. (2016). Plant secondary metabolism linked glycosyltransferases: an update on expanding knowledge and scopes. *Biotechnology Advances*, 34, 714-739.
- Tobar, A.E., Silva, O.F., Olivares, C. R., Gaete, G.P., Luppi, N.M. (2011). Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Revista chilena de infectología*, 28(1), 41-49.
- Torres Carro, R., Isla, M.I., Ríos, J.L., Giner, R.M., Alberto, M.R. (2015). Antiinflammatory properties of hydroalcoholic extracts of Argentina Puna plants. *Food Research International*, 67, 230-237.
- Torres Carro, R., Isla, M.I., Thomas-Valdes, S., Jiménez-Aspee, F., Schmeda-Hirschmann, G., Alberto, M.R. (2017). Inhibition of pro-inflammatory enzymes by medicinal plants from the Argentinean highlands (Puna). *Journal of Ethnopharmacology*, 205, 57-68.
- Torres, C.A., Pérez Zamora, C.M., Nuñez, M.B., Gonzalez, A.M. (2018). *In vitro* antioxidant, antilipoxygenase and antimicrobial activities of extracts from seven climbing plants belonging to the Bignoniaceae. *Journal of Integrative Medicine*, 16, 255-262.
- Torres, R., Urbina, F., Morales, C., Modak, B., Delle Monache, F. (2003). Antioxidant properties of lignans and ferulic acid from the resinous exudate of *Larrea nitida*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 48, 61-63.
- Toursarkissian, M. (1980). Plantas medicinales de la Argentina; sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica. Hemisferio Sur, S.A. (Ed), Buenos Aires, Argentina.
- Turán, H., Demirbilek, M. (2018). Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 62-69.

- Ulibarri, E.A. (1994). Leguminosae, en R. Kiesling, M. Múlgura y E. Ulibarri (eds.), Flora de San Juan, 1, 257-231.
- Ulibarri, E.A. (2005). *Zuccagnia punctata* (Leguminosae): nuevo o viejo endemismo argentino? Darwiniana, 43, 212-215.
- Ulibarri, E.A. (2008). Los géneros de Caesalpinioideae (Leguminosae) presentes en Sudamérica. Darwiniana, 46(1), 69-163.
- Usenko, C.Y., Harper, S.L., Tanguay, R.L. (2008). Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. Toxicology and Applied Pharmacology, 229, 44-55.
- Valdes Rodríguez, Y.C., Bilbao Díaz, M., León Álvarez, J.L., Merchan González, F. (2002). Origen e importancia de la fosfolipasa A2 de secreción. Revista Cubana de Farmacia, 36(2), 121-128.
- Valenta, C. (2005). The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 57, 1692-1712.
- Valesi, A., Rodriguez, E., Vander Velde, G., Mabry, T. (1972). Methylated flavonoids in *Larrea cuneifolia*. Phytochemistry, 11, 2821-2826.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39, 44-84.
- Van Burik, J.A., Magee, P.T. (2001). Aspects of fungal pathogenesis in humans. Annual Reviews of Microbiology, 55, 743-772.
- Van Der Pol, B. (2010). Diagnosing vaginal infections: It's Time to Join the 21st Century. Current Infectious Disease Reports, 12(3), 225-30.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., Coste, A.T. (2012). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. International Journal of Microbiology, 713687.
- Vargas-Sánchez, R.D., Mendoza-Wilson, A.M., Balandrán-Quintana, R.R., Torrescano-Urrutia, G.R., Sánchez-Escalante, A. (2015). Study of the molecular structure and chemical reactivity of pinocembrin by DFT calculations. Computational and Theoretical Chemistry, 1058, 21-27.
- Vázquez-Flores, A.A., Álvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J.A., Wall-Medrano, A., de la Rosa, L.A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: Naturaleza química, ventajas y desventajas de consumo. Tecnociencia, 6(2), 84-93.

- Venkat-Ratnam, D., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Ravi, M.N.V. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective (Review). *Journal of Controlled Release*, 113, 189-207.
- Verri, W., Vicentini, F., Baracat, M., Georgetti, S., Cardoso, R., Cunha, T., Ferreira, S., Cunha, F., Fonseca, M., Casagrande, R. (2012). Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. *Studies in Bioactive Natural Products*, 36, 297-330.
- Vizcaíno, R., Macias-Tomei, C., Márquez S.J.C., Morales, A., Torres, N. (2016). Usos clínicos de los probióticos. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 79(1), 029-040.
- Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Štefan, M. B., Alegro, A., Koszegi, T., Petrik, J. (2011). Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. *Molecules*, 16(2), 1454-1470.
- Vogt, V., Cifuentes, D., Tonn, C., Sabini, L., Rosas, S. (2013). Antifungal activity in vitro and in vivo of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus. *Industrial Crops and Products*, 42, 583-586.
- Wagner, H., Blatt, S., Zgainsky, E. (1984). *Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography*. Berlín: Springer-Verlag, 320.
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16, 97-110.
- Wang, L., Tang, X. (2008). A novel ketoconazole bioadhesive effervescent tablet for vaginal delivery: design, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 350, 181-187.
- Wang, L.L., Zhang, Z.C., Hassan, W., Li, Y., Liu, J., Shang, J. (2016). Amelioration of free fatty acid-induced fatty liver by quercetin-3-O- β -d-glucuronide through modulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α /sterol regulatory element-binding protein-1c signaling. *Hepatology Research*, 46, 225-238.
- Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., Gao, Y. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 21-38.
- Wang, Z.Y., Agarwal, R., Zhou, Z.C., Bickers, D.R., Mukhtar, H. (1991). Antimutagenic and antitumorigenic activities of nordihydroguaiaretic acid. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 261, 153-162.

- Waterman, C., Smith, R., Pontiggia, L., DerMarderosian, A. (2010). Anthelmintic screening of Sub-Saharan African plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 755-759.
- Waterman, P.G. (1994). Costs and benefits of secondary metabolites to the Leguminose. J.I. Sprent y D. McKey (eds.). *Advances in Legume Systematics 5: The Nitrogen Factor*, 129-149. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Whiteway, M., Bachewich, C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Reviews of Microbiology*, 61, 529-553.
- Williams, D.J., Edwards, D., Hamernig, I., Jian, L., James, A.P., Johnson, S.K., Tapsell, L.C. (2013). Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. *Food Research International*, 52(1), 323-333.
- Winn, W. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. 6a ed. Buenos Aires. Editorial Medica Panamericana, 1382, 795-796.
- Wisastra, R., Dekker, F.J. (2014). Inflammation, cancer and oxidative lipoxygenase activity are intimately linked. *Cancers*, 6, 1500-21.
- Woisky, R.G., Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99-105.
- Wolska, K.I., Grzes, K., Kurek, A. (2012). Synergy between novel antimicrobials and conventional antibiotics or bacteriocins. *Polish Journal of Microbiology*, 61(2), 95-104.
- Wong, T.W., Dhanawat, M., Rathbone, M.J. (2014). Vaginal drug delivery: strategies and concerns in polymeric nanoparticle development. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(9), 1419-1434.
- Wu, Y.M., Huang, P.Y., Lu, J.J., Shie, S.S., Ye, J.J., Wu, T.S., Huang, C.T. (2018). Risk factors and outcomes of candidemia caused by *Candida parapsilosis* complex in a medical center in northern Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 90, 44-49.
- Yang, T.W., Hunziker, J.H., Poggio, L., Naranjo, C.A. (1977). Hybridization between South American jarilla and North American diploid creosote bush (*Larrea*, Zygophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 126, 331-346.
- Yang, Z., Wang, Q., Ma, K., Shi, P., Liu, W., Huang, Z. (2018). Fluconazole inhibits cellular ergosterol synthesis to confer synergism with berberine against yeast cells. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 18, 125-130.

- Yoder, S.C., Lancaster, S.M., Hullar, M.A.J., Lampe, J.W. (2015). Chapter 7. Gut microbial metabolism of plant lignans: influence on human health A2. Rio, Kieran TuohyDaniele Del. In: Diet-Microbe Interactions in the Gut. Academic Press: San Diego, 103-117.
- Zaidi, K.U., Shah, F., Parmar, R., Thawani, V. (2018). Anticandidal synergistic activity of *Ocimum sanctum* and fluconazole of azole resistance strains of clinical isolates. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(2), 289-293.
- Zampini, I.C., Cudmani, N., Isla, M.I. (2007). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41, 385-393.
- Zampini, I.C., Cuello, S., Alberto, M.R., Ordoñez, R.M., D'Almeida, R., Solorzano, E., Isla, M.I. (2009). Antimicrobial activity of selected plant species from the Argentine Puna against sensitive and multi-resistant bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 499-505.
- Zampini, I.C., Vattuone, M., Isla, M.I. (2005). Antibacterial activity against antibiotic-resistant Gram negative human pathogenic bacteria of hydroxychalcone isolated from *Zuccagnia punctata* Cav. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 450-456.
- Zampini, I.C., Villena, J., Salva, S., Herrera, M., Isla, M.I., Alvarez, S. (2012). Potentiality of standardized extract and isolated flavonoids from *Zuccagnia punctata* for the treatment of respiratory infections by *Streptococcus pneumoniae*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 140, 287-292.
- Zampini, I., Meson Gana, J., Ordoñez, R., Sayazo, J., Nieva Moreno, M., Isla, M.I. (2008). Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of plant species from the Argentine Puna Antofagasta, Catamarca. *Recent Progress in Medicinal Plants*, 21, 89-103.
- Zarlavsky, G.E. (2014). *Histología vegetal: técnicas simples y complejas*. 1a ed. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires.
- Zhang, J., Wu, Y., Zhao, X., Luo, F., Li, X., Zhu, H., Sun, C., Chen, K. (2014). Chemopreventive effect of flavonoids from Ougan (*Citrus reticulata* cv. *Suavissima*) fruit against cancer cell proliferation and migration. *Journal of Functional Foods*, 10, 511-519.
- Zhang, L., Lokeshwar, B.L. (2012). Medicinal properties of the Jamaican pepper plant *Pimenta dioica* and Allspice. *Current Drug Targets*, 13, 1900-06.

- Zida, A., Bamba, S., Yacouba, A., Ouedraogo-Traore, R., Guiguemdé, R.T. (2017). Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal De Mycologie Médicale*, 27, 1-19.
- Zoecklein, B.W., Fuelsang, K.C., Gump, B.H., Nury, F.S. (1990). Phenolic compounds and wine color. *Production wine analysis*. Van Nostrand Reinhold. New York, Estados Unidos, 129-168.
- Zorrilla García, A.E., Eirez Izquierdo, M., Izquierdo Expósito, M. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 23(1), 51-57
- Zuloaga, F.O., Morrone, O. (1999). Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. Fabaceae-Zygophyllaceae (Dicotyledoneae). *Monography Systematic Botany*, 74, 623-1269.