

Análisis de la fracción “no volátil” (flavonoides) y perfil de compuestos no polares de *Achyrocline satureioides*. Red marcela

Retta, D.^{1,2}; Guariniello, J.³; Suárez, S.A.⁴; Galli, M.C.⁵; Van Baren, M.C.^{1,2}

¹Universidad de Buenos Aires (UBA), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Farmacognosia. Correo electrónico: dretta@ffyb.uba.ar ²Universidad de Buenos Aires (UBA), Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA), CONICET. ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Genética “Ewald A. Favret”. ⁴Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. ⁵Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) San Luis, Agencia de Extensión Rural Concarán.

Objetivo

Evaluar el contenido de flavonoides y determinar el perfil de compuestos no polares en inflorescencias cosechadas de plantas ex vitro provenientes de un genotipo selecto de marcela (*Achyrocline satureioides*) cultivado en tres ambientes: Río Cuarto, Merlo y Castelar.

Materiales y métodos

A partir de un ejemplar de marcela originario de la localidad Dique Cruz de Piedra (San Luis) se obtuvieron individuos por multiplicación *in vitro*, utilizando un medio MS completo suplementado con 1 mg/l de BAP (Rosso *et al.*, 2015). La multibrotación se dio a partir de callo. Se recuperaron alrededor de 150 plantas, las que fueron aclimatadas y luego distribuidas a tres localidades: Río Cuarto, Merlo y Castelar para la realización de un ensayo en red (Galli *et al.*, 2016).

Las plantas se llevaron a campo a principios de la primavera de 2015. Y se implantaron a 45 cm entre plantas y 70 cm entre hileras. Se cosecharon a fines de febrero/principios de marzo de 2016 (1.^a cosecha, Río Cuarto, Merlo y Castelar) y principios/mediados de abril de 2017 (2.^a cosecha, Castelar) (Galli *et al.*, 2016).

Luego de evaluar el rendimiento de biomasa de inflorescencias en cada localidad se decidió estudiar el contenido de flavonoides en las muestras por HPLC y el perfil cromatográfico de los compuestos no polares por TLC.

Para ello se realizó una caracterización por TLC de la fracción no polar utilizando el sistema cromatográfico propuesto por Retta *et al.* (2010), siendo esta la fracción de interés aromático.

A partir de cada muestra remitida, se tomaron 2 g de material vegetal y se realizó una extracción por maceración en hexano, durante 40 min con agitador magnético. Se filtró por gravedad y se llevó a sequedad en evaporador rotatorio a presión reducida a una temperatura no mayor de 40 °C y se tomó el residuo con 10 ml de hexano.

Para los análisis por TLC se utilizaron placas de silica gel 60 F254 como fase estacionaria y tolueno: acetato de etilo: ácido acético glacial (9:1:III) como fase móvil. Las placas se revelaron con anisaldehído sulfúrico con posterior calentamiento.

También se realizó la valoración por HPLC de los compuestos quercetina-3-metil éter (Q3ME) y quercetina, marcadores de calidad medicinal de la especie. Para ello se pesaron 5,0 g de material vegetal seco y disgregado, se agregaron 150 ml de etanol 80 % y se extrajo a reflujo por 3 horas. Los extractos fueron filtrados y evaporados a presión reducida hasta sequedad y reconstituidos cuantitativamente con 50,0 ml de etanol 80 %.

Se empleó la metodología puesta a punto y validada por Retta (2014), incorporada recientemente a la monografía de marcela de la actual Farmacopea Argentina.

Resultados y discusión

Al primer año de cultivo se observaron diferencias significativas en el crecimiento y floración de los individuos, dentro y entre localidades. A cosecha, en Río Cuarto se produjo mayor rendimiento de inflorescencias (58,18 g) que en Merlo (11,03 g) y Castelar (8,92 g) ($p < 0,05$) (Galli *et al.*, 2016).

En cuanto a la caracterización de los compuestos no polares, no se observaron diferencias apreciables en los perfiles cromatográficos obtenidos entre las muestras provenientes de distintas zonas, ni con respecto a la planta madre (M1-5) (Figura 1).

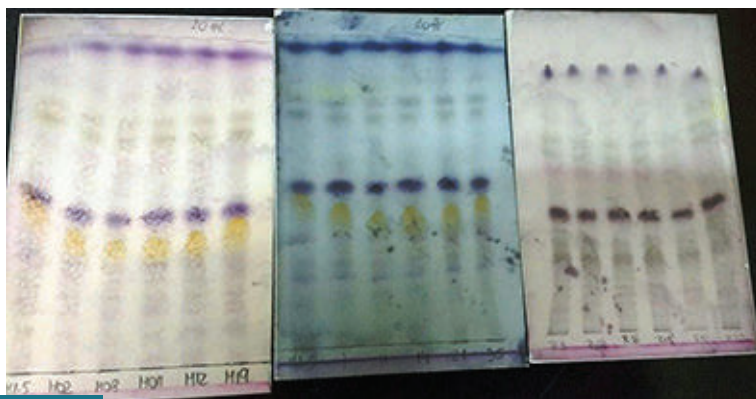


Figura 1. TLC de muestras provenientes de Merlo, Castelar y Río Cuarto, respectivamente. FE: silica gel 60 F254; FM: tolueno: acetato de etilo: ácido acético glacial (9:1:iii); Revelador: anisaldehído sulfúrico.

En cuanto a la valoración de los flavonoides por HPLC (Figura 2) se observaron diferencias en el porcentaje de quercetina entre los sitios ($P=0,0003$). Al comparar de a pares Castelar y Merlo difieren significativamente ($P < 0,001$) y Río Cuarto se diferencia de Merlo ($P > 0,05$), no así de Castelar (Figura 3A).

También se observaron diferencias en el porcentaje de quercetina-3-metil éter entre los sitios ($P=0,0003$). Al comparar de a pares existen diferencias entre Castelar y Merlo ($P < 0,001$), Castelar y Río Cuarto ($P < 0,01$), y Río Cuarto y Merlo ($P < 0,05$). Todos los análisis se realizaron por duplicado (Figura 3B).

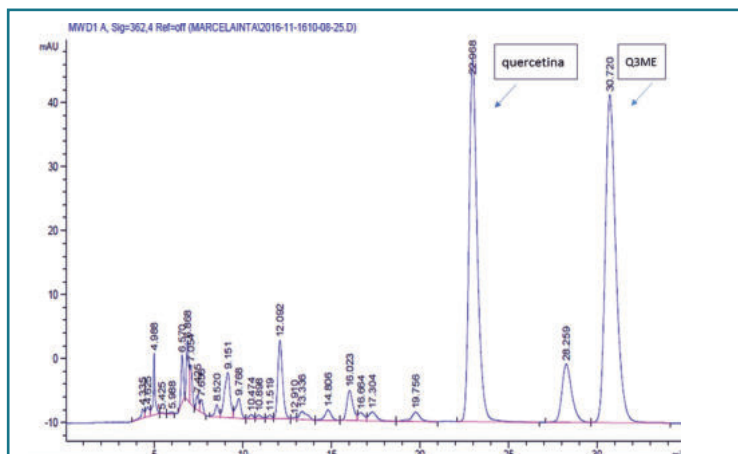
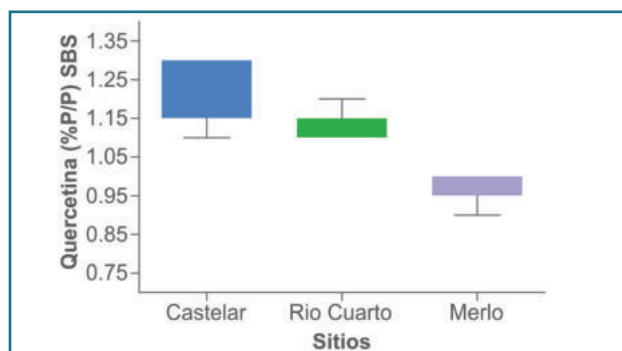
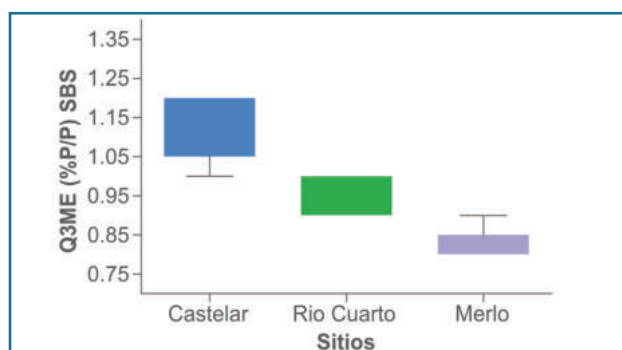


Figura 2. Perfil cromatográfico* obtenido por HPLC para la valoración de quercetina y quercetina-3-metil éter (Q3ME) en muestras provenientes de Merlo, Castelar y Río Cuarto.

* columna Phenomenex Luna 2-C18 -250 mm × 4.6 mm × 5 μm-a 362 nm.



(A) Valoración de quercetina



(B) Valoración de quercetina-3-metil éter (Q3ME)

Figura 3. Valoración de quercetina (A) y quercetina-3-metil éter (Q3ME) (B) mediante HPLC de muestras provenientes de Merlo, Castelar y Río Cuarto. Box plot. Aún no se realizó la cuantificación de flavonoides del segundo año de cosecha.

Conclusiones

Considerando que los metabolitos secundarios quercetina y quercetina 3-metil éter se producen en respuesta al ambiente, en aquellos sitios donde las plantas estuvieron sometidas a condiciones más estresantes (presentaron menor ajuste a las condiciones ambientales), los porcentajes de metabolitos secundarios fueron mayores. Es por ello que en Merlo (ambiente de procedencia de las plantas madres) se observaron los menores valores de referencia.

Bibliografía

- GALLI, M.C.; RISSO, O.A.; BARBERO, I.L.; GUARINIELLO, J.; OVIEDO, A.L.; ROSSO, C.; SUÁREZ, S.A.; ESCANDÓN, A.S. 2016. Evaluación del crecimiento y rendimiento de “marcela” provenientes de micropropagación en tres ambientes: Merlo, Río Cuarto y Castelar. XXXIX Congreso Argentino de Horticultura. Santa Fe.
- RETTA, D.S. 2014. Determinación de calidad de “marcela” *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae). Parámetros fitoquímicos. Compendio de tesis. Dominguezia 30(2), 5-17
- RETTA, D.S.; FERNANEZ PENUTO, R.; CORREA, M.; GATTUSO, M.; GATTUSO, S.; BANDONI, A. 2010. Diferenciación de las especies *Achyrocline satureioides*, *A. flaccida* y *Gnaphalium gaudichaudianum* por sus perfiles cromatográficos. BLACPMA 9(2), 93-99.
- ROSSO, C.; IANNICELLI, J.; ESCANDÓN, A.S. 2015. Ajuste de la micropropagación *in vitro* de marcela. Segundas Jornadas Rioplatenses de Flora Nativa, diálogos, integración y tendencias. Buenos Aires.