



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Cátedra de Farmacobotánica

“Variación de los perfiles de polifenoles en *Ligaria cuneifolia*, su estudio mediante electroforesis capilar y su relación con la actividad farmacológica”



Tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Bioq. Cecilia Beatriz Dobrecky

Director: Prof. Dr. Marcelo L. Wagner

Co-Directora: Prof. Dra. Silvia E. Lucangioli

Año 2015

AGRADECIMIENTOS

Hago llegar mi gratitud a todos los que colaboraron para que este trabajo de tesis fuera posible.

En especial:

A las autoridades de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) por permitirme desarrollar mi trabajo de Tesis en esa casa de estudio.

A mis directores de tesis, los Dres. Marcelo L. Wagner y Silvia Lucangioli, que me guiaron durante el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros, docentes y no docentes, de la cátedra de Farmacobotánica, en especial, al Dr. Ángel Gurni por sus consejos y orientación; a la Dra. Beatriz Varela por sus valiosos aportes en la taxonomía y anatomía vegetal, a los Dres. Rafael Ricco, Ana Rugna y Graciela Bassols por sus consejos, apoyo y aportes y a Ezequiel Moreno por su colaboración.

A los docentes de la cátedra de Tecnología Farmacéutica, en especial, a los Dres. Diego Chiapetta, Marcela Moretton y Ezequiel Bernabeu por su colaboración, apoyo y valiosos consejos y, también, a mis compañeros Oriana Boscolo, Juan Pablo Cattalini y Maximiliano Cagel.

A la cátedra de Farmacognosia por permitirme realizar parte de mi trabajo experimental y en particular, a la Dra. Paula López por su colaboración en el análisis de los extractos por HPLC y su constante apoyo.

A los Dres. Albertina Moglioni y Lucas Fabian de la cátedra de Química Medicinal por su colaboración en la realización de los espectros de RMN, su tiempo y dedicación.

Al Dr. Pablo Evelson y a su grupo de investigación por su valiosa colaboración en el estudio de la capacidad antioxidante.

A la cátedra de Química Analítica, a la Prof. Dra. Irene Rezzano por abrirme las puertas de la cátedra y por sus valiosos aportes, al igual que a la Dras. Cristina Vescina, Paula Dabas y Nora Vizzioli. A los Dres. Sabrina Flor y Mario Contin por sus invaluable consejos y colaboración con la electroforesis capilar. A Manuela Martinefski, por su apoyo y colaboración.

Al Dr. César Fraga por sus observaciones críticas y aportes al trabajo experimental.

A la Dra. Clyde Carducci por sus siempre oportunas observaciones.

Y deseo agradecer muy especialmente:

A mi familia por el apoyo incondicional que me brindaron.

Y a Dios, por todo.

Los resultados de esta tesis dieron origen a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:

Capítulo de libro

Dobrecky C. (2015). *Capillary electrophoresis in the analysis of flavonoids* [capítulo 3: “Applications of Capillary Electrophoresis to Pharmaceutical and Biochemical Analysis”] en Christian Reed (ed.) *Capillary Electrophoresis (CE): Principles, Challenges and Applications*. Nanotechnology Science and Technology Series. Nova Publishers. NY.

Publicaciones

“Contenido de polifenoles en *Ligaria cuneifolia* y su relación con la capacidad antioxidante” Dobrecky C, Moreno E, Garcés M, Lucangioli S, Ricco R, Evelson P, Wagner M. *Dominguezia* 30(2): 35-39 (2014).

Participación en congresos con presentación de trabajos

- “*Estudio del contenido de polifenoles en Ligaria cuneifolia y su relación con la capacidad antioxidante*” Dobrecky C, Moreno D, Garcés M, Lucangioli S, Ricco R, Evelson P, Wagner L. XI Simposio Argentino y XIV Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. I Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales, 20-22 de Noviembre de 2013.
- “*Estandarización de extractos de Ligaria cuneifolia (Loranthaceae)*”. Breda B, Garcés M, Dobrecky C, Ranea F, Ricco R, Gurni A, Evelson P, Wagner M. X Simposio Argentino y XIII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. 24-26 de Noviembre de 2010.
- “*In vivo and in vitro antioxidant activity of Ligaria cuneifolia extracts*”. Marchini T, Magnani N, Dobrecky C, Ricco R, Gurni A, Llesuy S, Wagner M, Evelson P. SFRBM's 14th Annual Meeting. 14-18 Noviembre 2007.

- “*Evaluación in vitro e in vivo de la actividad antioxidante de extractos de Ligaria cuneifolia*”. Marchini T, Dobrecky C, Ricco R, Gurni A, Llesuy S, Wagner M, Evelson P. Congreso de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Noviembre 2006.

RESUMEN

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh. -Loranthaceae- es una especie hemiparásita que se desarrolla sobre diferentes hospedantes. Es vulgarmente conocida con el nombre de “muérdago criollo”, “liga” o “liguilla”. Esta especie es utilizada popularmente como agente hipotensor y, debido a su similitud morfológica, constituye el sustituto natural del muérdago europeo. Al igual que otras especies de la familia Loranthaceae, es rica en flavonoides, especialmente flavonoles que podrían ser determinantes de su actividad farmacológica. Debido a su amplia distribución y crecimiento sobre distintos hospedantes, se hace indispensable contar con una metodología eficiente que permita detectar los distintos compuestos presentes en los extractos con el fin de estandarizarlos.

La electroforesis capilar representa una alternativa atractiva ya que posee una alta eficiencia de separación, reducidos tiempos de análisis, bajo costo dado que el consumo de solvente es mínimo, así como también la cantidad de muestra empleada y el capilar requiere un cuidado simple para su utilización. En el presente trabajo de investigación se desarrolló y validó una metodología por electroforesis capilar con la cual se obtuvieron patrones cromatográficos específicos o *fingerprints* que permitieron caracterizar a los extractos y que puede ser utilizada en el análisis de rutina para el control de calidad. Por todo esto, presenta múltiples ventajas respecto a las técnicas cromatográficas tradicionales.

Se recolectaron ejemplares de la provincia de San Juan que se desarrollaron sobre Leguminosae: *Prosopis flexuosa* D.C., *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntzemend. Burkart (ex Fabaceae, subf. Mimosoidea) y *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart (ex Fabaceae). También se trabajó con una muestra comercial que se desarrolló sobre los mismos hospedantes. A fines comparativos, se obtuvieron ejemplares de la provincia de Catamarca, que se desarrollaron sobre *Olea europea* L. - Oleaceae- (“olivo”), *Bulnesia retama* (Gillies ex Hook. & Arn.) Griseb. (Zygophyllaceae) (“retamo”) y Leguminosae tales como *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz (“algarrobo”), y *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart (“chañar”).

En las muestras de San Juan, se trabajó con las hojas y los tallos herbáceos. Se realizaron extracciones con metanol y combinaciones de metanol-agua y luego se procedió a realizar la partición con acetato de etilo. Las fracciones así obtenidas se utilizaron para estudios posteriores. En el caso de las muestras de Catamarca se utilizó la planta entera y se trabajó con los extractos metanólicos.

Sobre ellos, se realizó la determinación del contenido de polifenoles por métodos espectroscópicos.

Se procedió a realizar el estudio de los flavonoles y los taninos condensados por TLC (cromatografía en capa delgada), EC (electroforesis capilar) y HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia).

Se trabajó con la fracción acetato de etilo de la hoja proveniente de San Juan, obtenida a partir de extracciones sucesivas con metanol y metanol-agua en distintas proporciones y se procedió a utilizar la cromatografía descendente en papel con distintas combinaciones de solventes para el aislamiento y purificación de los compuestos de interés.

Sobre las bandas purificadas se efectuaron corridas por TLC, EC y HPLC frente a testigos, comparación de espectros y co-cromatografía.

Para el análisis estructural se utilizó la espectroscopia UV-visible, HPLC acoplado a espectrometría de masa con fragmentación posterior y RMN. En las muestras de San Juan pudo verificarse la presencia de quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido, quercetina-3-O-ramnósido y catequina, compuestos previamente reportados en *L. cuneifolia*. Además, 4 compuestos pudieron ser identificados como quercetina-3-O- α -L-(3''-O-galoil) ramnósido, quercetina-3-O- α -L-(2''-O-galoil) ramnósido, quercetina-3-O- α -D-(2''-galoil)-arabinofuranósido y quercetina-3-O- α -L-(2''-O-galoil)-arabinopiranosido, los cuales son reportados por primera vez en *Ligaria cuneifolia*.

Para las muestras de Catamarca pudo verificarse la similitud en los perfiles cromatográficos con las muestras de San Juan y preliminarmente confirmar la presencia de quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido, quercetina-3-O-ramnósido, catequina y presumiblemente glicósidos de quercetina unidos a ácido gálico, similares a los encontrados en las muestras de San Juan.

Dado que los extractos son ricos en flavonoides, se procedió a realizar estudios de capacidad antioxidante *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Se trabajó con métodos espectroscópicos utilizando DPPH y ABTS. Los mayores valores correspondieron a las fracciones acetato de etilo y especialmente a la fracción “MeOH combinado-AE” (48,1 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para DPPH y 16279 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para ABTS). Entre las muestras de Catamarca, los valores más bajos correspondieron a los ejemplares desarrollados sobre “retama” (9,8 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para DPPH y 7229 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para ABTS) y los más altos a los ejemplares desarrollados sobre “chañar” (33,0 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para DPPH y 11354 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para ABTS). También se evaluó la capacidad antioxidante mediante autografía por TLC sobre la fracción “MeOH combinado-AE”.

El método desarrollado por electroforesis capilar para el análisis de los extractos fue empleado para evaluar la capacidad antioxidante, utilizando DPPH. La metodología probó ser eficiente para evaluar el comportamiento individual de los compuestos presentes en el extracto y estudiar la relación estructura-capacidad antioxidante. Se comprobó así que los glicósidos de flavonoles tienen menor capacidad que la aglicona. Los compuestos asociados a ácido gálico tuvieron mejor capacidad antioxidante que sus contrapartes no galoiladas.

En cuanto a los ensayos *ex vivo*, la fracción acetato de etilo inhibió la oxidación fosfolipídica en homogeneizados de hígado de ratas ($\text{IC}_{50}=14,5 \mu\text{g/ml}$), la auto-oxidación en homogeneizados de cerebro de ratas ($\text{IC}_{50}=0,27 \mu\text{g/ml}$), y en el daño al ADN inducido por H_2O_2 . Además, la aplicación tópica de la fracción acetato de etilo disminuyó en un 38 % la quimioluminiscencia en piel en un modelo *in vivo* en ratones expuestos a UVA (control: $49 \pm 5 \text{ cps/cm}^2$).

Estos resultados podrían explicar los efectos benéficos de *L. cuneifolia* empleada en medicina tradicional.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Muérdagos	1
1.1.1 Historia	1
1.1.2. Características generales	4
1.1.3. Familias	5
1.1.4. Especies: descripción morfológica	8
1.1.4.1 <i>Viscum album</i> L.....	8
1.1.4.2. <i>Ligaria cuneifolia</i>	10
1.1.5. Usos Medicinales.....	12
1.2. Flavonoides.....	17
1.2.1. Flavonoides en <i>L. cuneifolia</i>	19
1.3. Actividad antioxidante	20
1.3.1 Radicales libres	20
1.3.2 Toxicidad del O ₂	20
1.3.4 Estrés oxidativo.....	22
1.3.5. Sistemas de defensa antioxidante	22
1.3.5.1 Flavonoides.....	23
1.3.6. Métodos para determinar capacidad antioxidante	25
1.3.6.1. DPPH	25
1.3.6.2. TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)/ABTS.....	25
1.3.6.3. FRAP (Ferric reducing/antioxidant power).....	25
1.3.6.4. ORAC (Oxygen radical absorbance capacity).....	26
1.3.7 Actividad antioxidante en la familia Loranthaceae	26
1.3.7.1. Antecedentes en <i>Ligaria cuneifolia</i>	28
1.4. Electroforesis capilar.....	28
1.4.1 Principios básicos.....	29
1.4.2. Modalidades de la EC.....	34
1.4.2.1 Electroforesis Capilar zonal (ECZ)	35
1.4.2.2. Cromatografía electrocinética micelar (MEKC).....	42
1.4.3. Electroforesis capilar en el análisis de los flavonoides	49
1.4.3.1. Antecedentes	49
1.4.3.2. Control de calidad de extractos vegetales y <i>fingerprinting</i>	52
1.5. Análisis estructural.....	53
1.5.1. HPLC-masa	53
1.5.2. RMN.....	54
HIPÓTESIS	57
OBJETIVOS	57
2. MATERIALES Y MÉTODOS	58
2.1 Material vegetal	58
2.1.1 Recolección	58
2.1.2. Identificación del material recolectado	59
2.1.3. Muestreo y separación del material en estudio.....	60
2.1.4. Acondicionamiento	60
2.2. Obtención de los extractos	60
2.3. Determinación del contenido de polifenoles	63
2.3.1. Fenoles totales	63
2.3.2. Taninos condensados (o proantocianidinas)	64

2.3.3. Flavonoides totales.....	64
2.3.4. Ácidos hidroxicinámicos	65
2.3.5. Taninos totales	66
2.4. Estudio de los flavonoides	67
2.4.1. Cromatografía en capa delgada (TLC)	67
2.4.1.1. Flavonoles	67
2.4.1.2. Taninos condensados (o proantocianidinas)	72
2.4.2. Electroforesis capilar (EC)	75
2.4.3. HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia)	81
2.5. Análisis estructural.....	84
2.5.1. Espectroscopia UV- visible	84
2.5.2. HPLC-masa	84
2.5.3. RMN.....	86
2.6. Actividad antioxidante	86
2.6.1. Autografía por TLC	86
2.6.2. Métodos espectroscópicos	87
2.6.2.1. DPPH	87
2.6.2.2. ABTS.....	88
2.6.3. Electroforesis capilar.....	89
2.6.4. Ensayos <i>ex vivo</i>	93
2.6.4.1. Homogeneizados del tejido	93
2.6.4.2. Inhibición de la oxidación fosfolipídica	93
2.6.4.3. Inhibición de la quimoluminiscencia (QL) en homogeneizados de cerebro	94
2.6.4.4. Inhibición del daño oxidativo al ADN inducido por H ₂ O ₂	94
2.6.5. Inhibición de la QL <i>in vivo</i> en la piel irradiada con la luz UVA	95
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
3.1. Obtención de los extractos	97
3.2. Determinación del contenido de polifenoles.....	98
3.2.1. Fenoles totales	98
3.2.2. Taninos condensados (o proantocianidinas)	99
3.2.3. Flavonoides totales.....	100
3.2.4. Ácidos hidroxicinámicos	101
3.2.5. Taninos totales	102
3.3. Estudio de los flavonoides	103
3.3.1. Cromatografía en capa delgada (TLC)	103
3.3.1.1. Flavonoles	103
3.3.1.2. Taninos condensados (o proantocianidinas)	114
3.3.2. Electroforesis capilar.....	119
3.3.3. HPLC	144
3.4. Análisis estructural.....	172
3.4.1. Espectroscopia UV-Visible	172
3.4.2. HPLC-masa	172
3.4.3. RMN.....	178
3.5. Actividad antioxidante	196
3.5.1. Autografía por TLC	196
3.5.2. Métodos espectroscópicos	197
3.5.2.1 DPPH	198
3.5.2.2. ABTS.....	199
3.5.3. Electroforesis capilar.....	201
3.5.4. Ensayos <i>ex vivo</i>	214

3.5.4.1. Homogeneizados de tejido.....	214
3.5.4.2. Inhibición de daño al ADN inducido por H ₂ O ₂	216
3.5.5. Inhibición de la QL <i>in vivo</i> en piel	216
4. DISCUSIÓN FINAL	218
4.1 Aspectos generales	218
4.2. Obtención de extractos.....	219
4.3. Determinación del contenido de polifenoles.....	220
4.4. Estudio de los flavonoides	222
4.4.1. Cromatografía en capa delgada (TLC)	222
4.4.1.1. Flavonoles	222
4.4.1.2. Taninos condensados (o proantocianidinas)	224
4.4.2. Electroforesis capilar.....	225
4.4.3. HPLC	229
4.4.4. Comparación de técnicas cromatográficas	231
4.5. Análisis estructural.....	236
4.5.1. HPLC-masa.....	236
4.5.2. RMN.....	237
4.6. Actividad antioxidante	238
4.6.1. Autografía por TLC	238
4.6.2. Métodos espectroscópicos	239
4.6.2.1. DPPH	239
4.6.2.2. ABTS.....	240
4.6.3. Electroforesis capilar.....	241
4.6.4. Ensayos <i>ex vivo</i>	243
4.6.4.1. Homogeneizados de tejido.....	244
4.6.4.2. Inhibición de daño al ADN inducido por H ₂ O ₂	244
4.6.5. Inhibición de la QL <i>in vivo</i> en piel	244
5. CONCLUSIONES	246
BIBLIOGRAFÍA	248

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas de la familia Loranthaceae (*sensu latu*) son conocidas con el nombre genérico de muérdagos y debido a que son hemiparásitas dependen, en parte, del hospedante para vivir.

En la Argentina, al igual que en el resto del mundo, la palabra “muérdago” es aplicada a las plantas con un estilo de vida similar a *Viscum album* L. -Santalaceae- (de acuerdo con clasificaciones más recientes, [www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/.](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/)) y con cierto grado de relación taxonómica. *V. album* es una especie europea que no crece en el continente americano y que es empleada principalmente por su acción sobre el sistema cardiovascular y su acción citotóxica sobre células tumorales (Becker, 1986; Fernández y col., 2000).

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh. -Loranthaceae- es una especie hemiparásita que se desarrolla sobre diferentes hospedantes. Es vulgarmente conocida con el nombre de “muérdago criollo”, “liga” o “liguilla”. Esta especie es utilizada popularmente como agente hipotensor y, debido a su similitud morfológica, constituye el sustituto natural del muérdago europeo (Varela y col., 2001).

1.1 Muérdagos

1.1.1 Historia

Las plantas de la familia Loranthaceae (*sensu latu*) han sido reconocidas como hierbas terapéuticas desde tiempos ancestrales. Ya en la Farmacopea del Divino Granjero (Shen-Nong Ben-cao Jing, herbal Medical Classic 2710 a. C.), que fuera compilada antes de la segunda centuria (206 a. C.- 220 d. C.), se describe a *Loranthus parasiticus* Merr. como una hierba superior para un elixir de vida que produce gran longevidad. El "parásito del sauce" ya está presente en la Gran Farmacopea de Ly Shi-zhen en 1578. El muérdago europeo es citado por Dioscórides usado en forma oral y tópica para el tratamiento de apostemas, induraciones y tumores (Font Quer, 1992), y también aparece en el "Antidotario de Reichman" del siglo IX (Hartwell, 1982).

Los muérdagos eran sagrados para los europeos en la antigüedad y desde tiempos ancestrales han sido considerados una de las plantas más mágicas, misteriosas y

sagradas del folklore europeo. El muérdago, *Viscum album* L. -Santalaceae-, es conocido desde épocas muy remotas a través de las leyendas, la mitología y las prácticas religiosas y por su amplio uso en la medicina popular (Prior, 1939). El nombre del género es el viejo nombre latino usado por Virgilio y por Plinio; significa viscoso y le fue asignado por el jugo glutinoso de sus bayas. El nombre inglés *-mistletoe-*, parece derivar del anglosajón “*misteltan*” (*tan*: rama; *mist*: liga, en holandés antiguo) (Grieve, [en línea]).

Según la mitología griega, cuando Júpiter descendía desde el paraíso, residía en una mata de muérdago. La sacerdotisa Medea usaba el jugo de la planta en pociones mágicas. Los registros persas, griegos y romanos y la mitología de los noruegos también fueron testigos de la veneración que se tenía a esta planta.

Era la planta sagrada de los antiguos galos, los sacerdotes celtas (druidas) y otros grupos paganos del Norte de Europa le adjudicaban poderes mágicos y propiedades medicinales. Traía felicidad, seguridad y buena suerte mientras no tocara el suelo (de allí se supone que viene la costumbre de colgar ramas de muérdago en el día de Navidad). Es así que la etimología de la palabra “druida” aparece asociada a la que ofrece Plinio el Viejo (Historia Natural, XVI, 249), en un pasaje célebre en el que habla de la veneración de los druidas por el muérdago y el árbol al que está ligado, es decir el roble (*Quercus robur* L. -Fagaceae-). Añade Plinio: “No cumplirán ningún rito sin la presencia de una rama de ese árbol, hasta el punto que parece posible que los druidas deriven su nombre del griego”. Se ha concluido entonces que la palabra druida provenía del griego *drus*, “roble”. El roble, “representación visible de la divinidad”, según Máximo de Tiro (Disertaciones, VIII, 8) que atribuye esa creencia a los celtas, es en cualquier caso símbolo de la ciencia y el poder y es el soporte del muérdago. Los druidas eran considerados sacerdotes pero, además, tenían otra función social importante son, en efecto, médicos y no cabe duda que la parte más importante de su terapéutica fue la medicación por plantas. El ritual del muérdago nos es conocido gracias a Plinio. “Los druidas tienen por lo más sagrado al muérdago y al árbol en que crece, suponiendo siempre que este árbol sea un roble” (Historia Natural, XVI, 249). Su recolección se efectuaba “el sexto día lunar”. Los sacerdotes druidas lo utilizaban en sus sacrificios a los dioses. El muérdago que crecía en los robles por ser más escaso era muy venerado y se le recolectaba en una ceremonia especial, en condiciones muy

precisas. El relato de Plinio en su Historia Natural durante su estadía en la Galia, constituye la referencia más antigua que se conoce de esta ceremonia. Los sacerdotes con túnicas blancas cosechaban los muérdagos que crecían en los robles sagrados en el solsticio de invierno. Se cortaba con una hoz de oro y sus ramas debían recogerse en un paño blanco, antes de tocar el suelo para que no perdiera sus poderes. Una vez recolectado, en el mismo lugar, se sacrificaban dos toros blancos como señal de agradecimiento. Las ramas eran repartidas entre el pueblo quienes las colgaban sobre las puertas de entrada en sus hogares para su protección. Los celtas le atribuían poderes curativos y milagrosos. De hecho en el lenguaje celta significa "cura todo". No sólo se le creía capaz de curar todas las enfermedades sino también de transformar en inofensivos a los venenos, asegurar la fertilidad a los humanos y a los animales, y proferir protección contra los espíritus y las brujerías. El famoso pasaje en el que Plinio el Viejo describe la recolección del muérdago, es bastante explícito a este respecto: “Creen que el muérdago, tomado en infusión, concede la fecundidad a los animales estériles y constituye un remedio contra todos los venenos” (Historia Natural, XVI, 249). El muérdago habría tenido valor de panacea universal, de verdadera “poción mágica” (Markale, 1989). Debido a todo esto su posesión aseguraba buena fortuna. El muérdago era considerado símbolo de paz y amor en los pueblos nórdicos, donde existía una tradición por la cual si los enemigos se encontraban debajo de un muérdago debían deponer sus armas y decretar una tregua hasta el día siguiente. Se relaciona al muérdago con el dios Balder, hijo de Odín. Era un dios sabio y amable y también invulnerable. Lo único capaz de dañarlo fue una flecha construida con una rama de muérdago que sus enemigos le arrojaron a partir de lo cual, la consideraron una planta con poderes especiales. Los griegos también le atribuían poderes mágicos y así, a través de los siglos, ha permanecido asociado al folklore de diferentes pueblos. Se convirtió en señal de buen augurio y se creía que protegía contra el fuego, alejaba los malos espíritus, promovía la fertilidad, daba suerte a los cazadores, protegía contra las heridas en el combate, prevenía las pesadillas y daba refugio a los espíritus del bosque durante el invierno (creían que el muérdago, siempre verde, mantenía vivo al huésped sagrado en el invierno). Las virtudes mágicas atribuidas a la planta son variadas y numerosas. Todo surge de la creencia de que hay algo sobrenatural en esta planta al crecer y florecer sin tener raíces en la tierra y que a su vez era el espíritu del árbol sobre el cual crecía. La tradición llega hasta nuestros días en que es profusamente utilizado junto con el acebo (*Ilex aquifolium* L. -Aquifoliaceae-) en los adornos navideños. Esta tradición europea se

traslada a América con los inmigrantes y el muérdago europeo es reemplazado por *Phoradendron leucarpum* (Raf.) Reveal & M.C. Johnst. (ex *Ph. flavescens* (Pursh) Nutt. Ex A. Gray) en Estados Unidos y por *Ligaria cuneifolia* en la Argentina en especial en lo que refiere a sus usos medicinales. Aquí no existe la tradición de colgar el muérdago y este fue sustituido por el acebo en los adornos navideños, al cual erróneamente, se lo llama “muérdago”.

1.1.2. Características generales

Dentro del reino vegetal, la División Angiospermas o Magnoliophyta cuenta con plantas parásitas que comprenden dos categorías:

- holoparásitos. Estas plantas no fotosintetizan y deben obtener su materia orgánica, además de agua y nutrientes, a expensas de otro individuo.
- hemiparásitos. Son plantas que producen sus propios hidratos de carbono, vía fotosíntesis, y toman agua y sales de otros vegetales denominados “huéspedes”. Dependen del hospedante para vivir y se desarrollan sobre vástagos leñosos. En general, están desprovistas de raíces. El embrión posee dos cotiledones y cuando germina forma un disco de adhesión para aferrarse a las ramas o troncos de las plantas leñosas que parasita.

Las propiedades generales de estas plantas son las siguientes:

1. Los nutrientes y el agua son transportados a través de **haustorios** (cono de penetración).
2. El parásito conecta su sistema vascular al del huésped.
3. De la planta parasitada obtienen agua y nutrientes minerales, en especial nitrógeno. Por ello, presentan una alta tasa de transpiración como un mecanismo para acumular nitrógeno.
4. Pueden desarrollarse en la superficie del huésped (epiparásito) o dentro del huésped (endoparásito) (Parasitic plants, en línea)

Esta particular relación parásito - hospedante determina la existencia de complejas interacciones que son causa de variación fitoquímica en los compuestos producidos por las especies parásitas, lo cual ha sido objeto de numerosos estudios ecobotánicos (Wagner, 1993; Varela y col., 2001).

1.1.3. Familias

El orden **SANTALALES** es el más importante y con mayor número de especies dentro de las hemiparásitas. Comprende árboles, arbustos, lianas leñosas o hierbas, la mayoría hemiparásitas de raíces o tallos de otras plantas (Takhtajan, 1997).

A todas las plantas con flores que crecen como parásitos en las ramas de los árboles o arbustos se les llama, en forma generalizada, “muérdagos”. Representan aproximadamente, las tres cuartas partes del total de plantas parásitas (Feuer y Kuijt, 1978).

La gran familia de los muérdagos ha sido desde hace mucho tiempo una fuente de dificultad taxonómica.

En 1935 Engel y Krause determinaban 1300 especies diferentes de muérdagos distribuidas preferentemente en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. A estos géneros los agrupaban en dos subfamilias: Loranthoideae y Viscoideae y el conjunto constituía la familia Loranthaceae Don. (Engler y col, 1935; Wettstein, 1944; Abbiatti, 1946). Barlow elevó a las dos subfamilias a la categoría de familias y partió a las Loranthaceae “*sensu latu*” (s. l.) en Loranthaceae Don. “*sensu strictu*” (s. s.) y Viscaceae Miq. (Barlow, 1964). Los trabajos de Kuijt rescataron de la familia Viscaceae a la tribu Eremolepideae Tiegh y la elevaron a la categoría de familia con el nombre de Eremolepidaceae Kuijt (Kuijt, 1988). Los taxónomos consideraban, por lo tanto, que los muérdagos se encontraban agrupados en tres familias: Loranthaceae (75 géneros), Eremolepidaceae (3 géneros) y Viscaceae (7 géneros) (Barlow y cols., 1989). Sin embargo, muchos investigadores mantienen la tradición de referirse a los muérdagos como pertenecientes a Loranthaceae en sentido amplio s.l. De acuerdo con los criterios actuales de la APG (del inglés *Angiosperm Phylogeny Group*), las familias Eremolepidaceae y Viscaceae no existen como tales sino que se encuentran incluidas en Santalaceae (APG III www.mobot.org/MOBOT/research/APweb). Los géneros *Phoradendron*, *Eubrachion* y *Viscum* (antes en Viscaceae) pertenecen a la familia Santalaceae.

Según Abbiatti (Abbiatti, 1946), existen 23 especies de muérdagos que crecen en las distintas regiones fitogeográficas de la Argentina, con excepción de la estepa pampeana y los desiertos patagónico y andino. La región fitogeográfica más afectada es la denominada Formación del Monte, donde abundan las leguminosas arbóreas, que son las plantas que preferentemente infectan los muérdagos.

Desde el punto de vista taxonómico, los muérdagos argentinos se distribuyen en las tres familias en que fue dividida Loranthaceae s.l. (Tabla 1.1), de acuerdo con el criterio de clasificación de las plantas vasculares del cono sur (Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur, en línea)

Tabla 1.1.- Muérdagos que crecen en la República Argentina (Abbiatti, 1946; Subils, 1984; Wagner, 1993; Varela, 2003; Plantas vasculares del Conosur, 2015).

Eremolepidaceae Tiegh.		<i>Eubrachion</i> Hook. f. <i>E. ambiguum</i> (H.et A.) Engler [= <i>E. andalgalense</i> Abbiatti]
Loranthaceae D. Don	<i>Ligaria</i> Tiegh.	<i>L. cuneifolia</i> (Ruiz et Pav.) Tiegh
	<i>Psittacanthus</i> Mart.	<i>P. cordatus</i> (Hoffmans) Blume
	<i>Struthanthus</i> Mart	<i>S. acuminatus</i> (Ruiz et Pav.) Blume
		<i>S. uraguensis</i> (Hook. et Arn.) G. Don
	<i>Tripodanthus</i> (Eichl.) Tiegh. [= Phrygillanthus Eichl.]	<i>T. flagellaris</i> (Cham. et Schlecht) Tiegh. <i>T. acutifolius</i> (Ruiz et Pav.) Tiegh.
<i>Tristerix</i> Mart.	<i>Trx. corymbosus</i> (L.) Kuijt <i>Trx. verticillatus</i> (Ruiz et Pav.) Barlow et Wiens	
Viscaceae Miq. Nutt.	<i>Phoradendron</i>	<i>Ph. affine</i> (Pohl ex DC) Engl. & Krause
		<i>Ph. argentinum</i> Urb
		<i>Ph. bathoryctum</i> Eichler
		<i>Ph. coriaceum</i> Mart.
		<i>Ph. dipterum</i> Eichler
		<i>Ph. falcifrons</i> (Hook. & Arn.) Eichler
		<i>Ph. interruptum</i> (DC.) B.D. Jacks
		<i>Ph. liga</i> (Gill.) Eichl.
		<i>Ph. mucronatum</i> (D.C.) Krug et Urb.
		<i>Ph. obtusissimum</i> (Miq.) Eichler
		<i>Ph. paraguari</i> Kuijt
		<i>Ph. piperoides</i> (Kunth) Trel.
		<i>Ph. quadrangulare</i> (Kunth) Griseb
<i>Ph. reductum</i> Trel.		
<i>Ph. tucumanensis</i> Urb.		

1.1.4. Especies: descripción morfológica

1.1.4.1 *Viscum album* L.

El muérdago europeo, *Viscum album* (Figura 1.1), se distribuye desde el norte de Europa al noroeste de África y desde Irlanda a través del sudoeste y centro de Asia hasta el Japón. En el norte de China y Corea se encuentra *Viscum album* subsp. *coloratum* Kom. (Viscaceae) y en el sur de China crece *Loranthus parasiticus* Merr. (Loranthaceae). También se encuentra en una franja oriental de Australia.

Figura 1.1.- *Viscum album*

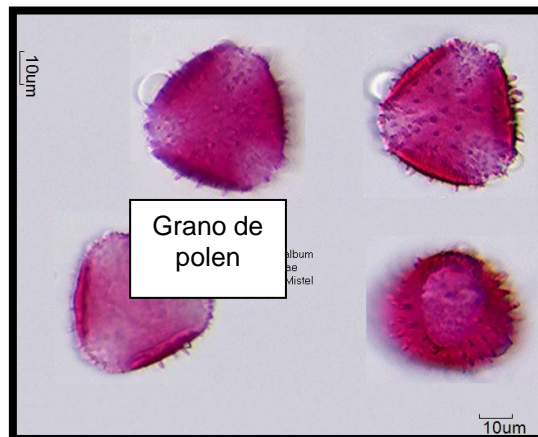


Es un arbusto hemiparásito siempre verde, con ramas dicotómicas articuladas, con entrenudos delgados, de 3 mm de diámetro, ensanchados en los extremos. La corteza es verde-amarillenta y no forma capa suberosa. Hojas opuestas, verde-amarillentas, coriáceas, glabras, de 5-7 cm long. x 1-2 cm de ancho, oblongas u obovado-lanceoladas, sésiles, de ápice redondeado; basinervadas, con 5 nervaduras paralelas, visibles. Inflorescencias espiciformes, con las flores en las bifurcaciones superiores de las ramas. Flores unisexuales, en plantas separadas (dioicas), 4-meras, verde-amarillentas, pequeñas. Estambres, 4; polen esferoidal a ovalado, tricolpado, con numerosas espículas. Ovario ínfero con óvulos sin tegumento. Fruto bayas, blancas cuando maduran, algo rugosas, uniseminadas, con una capa pegajosa de viscina. Semillas endospermadas con 1-2 embriones clorofiláceos (Roques, 1837; The British Pharmaceutical Codex, 1934; Prior, 1939; Pahlow, 1985)

Florece de marzo a abril y los frutos maduran en diciembre. Esta especie es nativa de Europa (la única especie de *Viscum* que crece). Desarrolla en forma de arbusto redondeado, de hasta 1 m de diámetro. Se encuentra al menos sobre 22 hospedantes diferentes, los más comunes son: “arce” (*Acer spp.* -Sapindaceae-), “álamo” (*Populus spp.* -Salicaceae-), “manzano” (*Malus domestica* Borkh. -Rosaceae-), “sauce” (*Salix spp.* L. -Salicaceae-), *Robinia spp.*, entre otros (Hawksworth y Scharpf, 1984).

Las especies de *Viscum* que crecen en el sur de África presentan hojas más pequeñas como adaptación al clima seco a diferencia de, por ejemplo, las variedades australianas las que se caracterizan por tener gran profusión de hojas.

Figura 1.2.- Grano de polen de *Viscum album*



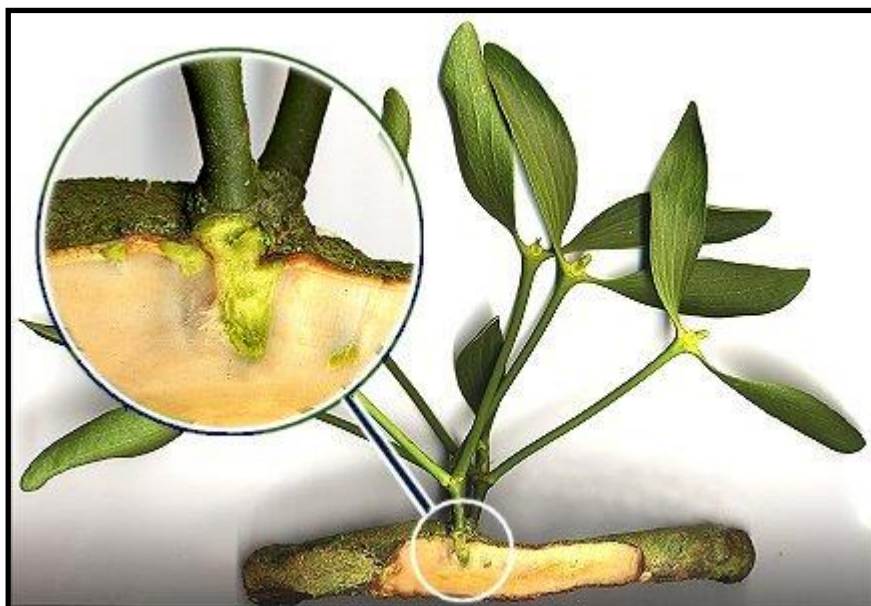
La polinización puede ser anemófila o entomófila y la dispersión de las semillas es realizada por pájaros. En la figura 1.2 se observa el grano de polen. Las variedades que presentan flores llamativas y fragantes son polinizadas por los pájaros. En América son los colibríes y en África los pájaros conocidos como "pájaros de los muérdagos". Por el contrario cuando los muérdagos presentan flores poco atractivas y pequeñas pero con nectarios, los agentes polinizantes son las moscas y abejas.

En cuanto a la dispersión, hay, además, ejemplares que tienen frutos explosivos en los cuales las semillas son lanzadas a gran distancia.

V. album se fija al hospedante por un solo punto (haustorio primario) del cual se originan, una vez en el interior del huésped, haustorios secundarios y una serie de

órganos succionadores en forma de cordón que se desarrollan sincrónicamente con la actividad cambial del huésped. Todo ese sistema de órganos especiales se denomina “sistema endofítico” o “endofito” (Figura 1.3) (Becker, 1986).

Figura 1.3.- Haustorio de *Viscum album*



1.1.4.2. *Ligaria cuneifolia*

Ligaria cuneifolia (Ruiz et Pav.) Tiegh. -Loranthaceae- es una especie hemiparásita desprovista de raíces aéreas que se desarrolla sobre diferentes hospedantes, con preferencia en leguminosas arborescentes tales como “chañar” (*Geoffroea decorticans* (Gill. ex Hook. & Arn.) Burkart -Fabaceae-), “algarrobo” (*Prosopis spp.*-Fabaceae-), “churqui” (*Acacia caven* (Molina) Molina -Fabaceae-), *Acacia spp.*, *Robinia spp.*, “horco-cebil” (*Piptadenia excelsa* (Griseb) Lillo -Fabaceae-), pero también sobre talas, molles, quebrachos y plantas cultivadas como manzanos, perales, durazneros, granados, olivos, tipas, entre otros. Presenta una amplia distribución geográfica ya que se extiende, en la Argentina, desde Salta y Jujuy en el norte hasta La Pampa en el sur y desde Entre Ríos y el noreste de Buenos Aires hasta la precordillera andina (Abbiatti, 1946). El nombre *Ligaria* deriva del término liga, en alusión a la capacidad de sus frutos de “ligar” o atrapar pájaros. En tanto, *cuneifolia* se refiere al aspecto en forma de cuña de sus hojas. Posee tallos enteros, sin entrenudos, glabros; ramas adultas cilíndricas, las jóvenes subcomprimidas; ambas rugoso-estriadas. Hojas alternas, subsésiles,

cuneiformes (Sanzin, 1918), lineares, lanceoladas o linear-espatuladas; de 1,5-6,5 cm de largo por 4-15 mm de ancho; obtusas o agudas; carnosas o coriáceas, rugosas; basinervadas, nervaduras poco visibles o 3-nervadas; ápice con una callosidad negruzca al secar. Racimos axilares 1-floros (por excepción 2-floros); pedúnculos florales de 5-15 mm de largo; cúpula subfloral tridentada con dientes más o menos profundos. Flores 6-meras, rojas, anaranjadas o a veces amarillas, de 3,5-5,5 cm de largo; piezas del perigonio libres o soldadas en su base; tépalos linear-espatulados. En general, las flores de los ejemplares que crecen en la Argentina son de color rojo, si bien hacia el este del país sus flores adquieren una coloración amarilla (Figura 1.4). Estambres alternadamente desiguales; filamentos soldados a los tépalos en su mitad inferior, la región basal forma una lígula o uña basal (Subils, 1984); anteras versátiles de dehiscencia longitudinal; polen trilobulado con exina de ornamentación granulada (Castro y Tellería, 1995). Receptáculo obovoide, ovario ínfero con un disco lobulado. Baya globosa o aovada, negruzca, coronada por el cálculo tubuloso. Embrión con 2 cotiledones; semillas con endosperma (Subils, 1984; Ulibarri, 1987). La floración es máxima en primavera y se prolonga hasta el otoño.

Figura 1.4.- Flores y frutos de *Ligaria cuneifolia*



1.1.5. Usos Medicinales

El uso medicinal del muérdago se remonta al siglo V a.C.. En el 300 a.C. se lo mencionaba como una panacea. Plinio, en el siglo I d.C., comentaba las virtudes como emoliente, resolutorio de tumores, desecante en soriasis, como antiinflamatorio y para el tratamiento de las heridas. Fue usado directamente sobre la parte afectada o como decocciones de la planta. Se usó en el tratamiento de la epilepsia, mordeduras de serpientes y otros animales salvajes, dolor de muelas, picaduras, visión débil, resfriados, úlceras, fiebre, dolor de cabeza, y para favorecer la fertilidad (Barlow, 1987).

Antiguamente, con los frutos se preparaba “liga” y se aplicaba como parche sobre las heridas y llagas (Youngken, 1951). Muy posteriormente, en el siglo XVI, se utilizó la pomada de muérdago para curar las úlceras y las heridas purulentas (Pahlow, 1985; Grieve, [en línea]). Los extractos de *V. album* resultaron efectivos para aumentar la producción de orina (propiedades diuréticas), tonificar el músculo cardíaco y controlar las hemorragias (propiedades hemostáticas) (Roques, 1837; Bertotto, 1949).

Los estudios etnofarmacológicos le atribuyen a *V. album* propiedades antiespasmódicas, tónicas y narcóticas. Tuvo gran reputación al ser utilizada para tratar la epilepsia y otros desórdenes convulsivos aliviando los espasmos producidos. En una publicación sobre remedios domésticos, llamada "*gui de chene*" (muérdago del roble) aparecida en Francia en 1682 (Grieve, [en línea]), cita su gran poder curativo en epilepsia y Sir John Colbatch publicó en 1720 un folleto sobre el tratamiento de la epilepsia con el muérdago ("The Treatment of Epilepsy by Mistletoe") considerándolo específico para dicha enfermedad (Grieve, [en línea]). Fue utilizado en convulsiones, delirio, neuralgia debilidad nerviosa, y muchas otras enfermedades del sistema nervioso como también en afecciones urinarias y cardíacas. Se le ha usado para fortalecer el hígado, los huesos y los tendones, expeler patógenos relacionados con la artritis, estabilizar el crecimiento del feto y provocar lactogénesis.

Se dice que también disminuye el impulso cardíaco y alivia el dolor precordial, efectos debidos probablemente a la dilatación de los vasos periféricos. Es administrado como extracto blando, infusión o tintura (1: 8) (The British Pharmaceutical Codex, 1934). La

infusión de la planta se utiliza contra los trastornos circulatorios y cardíacos leves de origen nervioso (dos cucharaditas en un cuarto litro de agua, 2 tazas por día) (Pahlow, 1985).

V. album disfruta de gran reputación como hipotensor en la medicina popular y en 1907 aparecían las primeras publicaciones que se refieren a estos efectos (Gaultier y col. 1907), registrándose asimismo algunos trabajos algo más recientes acerca de sus efectos sobre la presión arterial. Johansen y col. (1940) dieron a conocer la existencia de dos sustancias, una actuaría sobre el corazón y la otra sobre la presión. Esta última por vía parasimpática sobre las terminaciones nerviosas periféricas. Esas sustancias resultan inactivas cuando se administran por vía gástrica, en cambio, los extractos administrados por vía intravenosa son activos (Youngken, 1951; Font Quer, 1992; Paris, y col., 1981). Se ha indicado también una acción sobre el sistema cardiovascular (Benigni y col., 1964; Wagner y col., 1986). En las últimas décadas se ha incrementado el interés en su estudio sobre la base de las diferentes actividades biológicas encontradas para el muérdago europeo que incluyen, además de los efectos cardiovasculares, actividades antivirales, antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Cabe destacar que desde 1920 se ha hecho popular en Europa el uso de los extractos de *V. album* como un tratamiento no convencional para el cáncer, encontrándose actualmente diversas preparaciones medicinales en venta en Europa (Helixor®, Iscador®, Plenosol®, etc.). Estas preparaciones ejercerían un efecto cancerostático e inmunoestimulador (Maldacker, 2006).

Se han publicado muchos estudios en lo que respecta a los efectos biológicos ejercidos por extractos acuosos o acuosos fermentados de muérdagos y de algunos productos purificados, como lectinas y viscotoxinas, presentes en varias especies de *Viscum*, principalmente el *V. album*. A través de décadas de estudio se han aislado lectinas, viscotoxinas y otras proteínas y, además, oligosacáridos, alcaloides y flavonoides. Muchos de los productos no han sido aún estudiados en detalle en parte por la escasez del producto purificado obtenido.

El uso que la población realiza de los muérdagos americanos es muy variado, dependiendo de la etnia y de la región geográfica.

En la Argentina, el muérdago criollo, *L. cuneifolia* var. *cuneifolia*, es la especie que más se emplea como sustituto del muérdago europeo, aunque los botánicos las ubican en dos familias diferentes. Los inmigrantes europeos y sus descendientes encontraron que esta especie poseía un hábitat y una morfología similar al *V. album*, razón por la cual la tomaron como un sustituto natural de éste (Nájera, 1983; Wagner, 1993) y comenzaron a utilizar las infusiones de las hojas y los tallos, ocasionalmente acompañadas por flores, como agentes terapéuticos para disminuir la presión arterial. Es así como se puede encontrar en las herboristerías, bajo el nombre de muérdago, material desecado de *L. cuneifolia*. Hieronymus (1882) mencionaba que las hojas trituradas se empleaban en cataplasmas para las fracturas de los huesos, propiedad que también se atribuía al extracto gomoso de los frutos. La goma se empleaba popularmente para cazar pájaros e insectos (Hieronymus, 1882; Toursarkissian, 1980). En "Contribuciones a la Materia Médica" de Juan A. Domínguez aparecen los primeros estudios farmacológicos y fitoquímicos sobre los muérdagos argentinos. Estos estudios se realizaron con ejemplares de *Psittacanthus cuneifolius* (Ruiz et Pav.) Engl. (sinonimia de *L. cuneifolia*) y *Phrygilanthus flagellaris* (Cham. et Schltld.) Eicher (sinonimia de *Tripodanthus flagellaris* (Cham. et Schltld.) Tiegh. y se observó que la acción hipotensora se verificaba en ejemplares que parasitaban especies de *Prosopis* mientras que aquellos recogidos sobre *Aspidosperma* actuaban como adrenérgicos hipertensores. Algo semejante fue observado con especies de *Ph. flavescens* de Estados Unidos (Domínguez, 1928). En "Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular" (Ratera, 1980) se menciona la acción hipotensora del muérdago criollo (*L. cuneifolia*) que parasita leguminosas y se advierte que sobre otros hospedantes (Apocynaceae, por ejemplo) puede ejercer acción adrenérgica hipertensiva por vasoconstricción periférica y su acción se manifiesta por un descenso temporario y ligero de la presión seguido de una fuerte hipertensión persistente, acompañada de aceleración cardíaca.

En su compilación sobre "700 hierbas medicinales" de Argentina; Burgstaller (1984) menciona para liga o para muérdago su acción hipotensora e incluye además su utilización en arteriosclerosis, saturnismo, menopausia, glaucoma y para la esterilidad.

Las hojas, los tallos tiernos y las flores se usaban en cocimiento al 20-25 %. Se les atribuyen propiedades diuréticas y tónico-cardíacas, pero sobre todo en la hipertensión. El energéteno o zumo de muérdago tiene propiedades de hipotensor y antiescleroso (34 gotas de zumo corresponden a 1g del vegetal). Se prepara también el extracto acuoso de hojas y ramas jóvenes (100 g en 600 g de agua) (González Torres, 1992).

La infusión de las hojas se utilizaba contra los vómitos de la sangre, la tuberculosis y la metrorrea. El cocimiento de tallos es vomitivo. La infusión de frutos como bebida para las afecciones de los riñones y la vejiga (De Lucca y Zalles, 1992).

Se empleaba la infusión de las hojas y los frutos como antihemorrágico y contra la arteriosclerosis. Constituye un excelente alimento para el ganado en épocas de sequía (Pöll, 1984; Castellón, 1998).

Es excitante de las contracciones peristálticas y del tono uterino en las mujeres embarazadas. También se cita como astringente. La solución de viscina, por su gran poder aglutinante, se ha recomendado para la fabricación de emplastos y medicamentos dermatológicos (Domínguez, 1928; Ratera y Ratera, 1980; Ragonese y Milano, 1984; Marzocca, 1997).

Recientemente, Scarpa y col. (2011) realizó un estudio sobre la etnobotánica médica de las “ligas” (Loranthaceae *s. l.*) entre los indígenas y criollos de la Argentina. El objetivo de esta contribución es efectuar una compilación de las aplicaciones medicinales de las “ligas” por parte de 14 grupos humanos argentinos (7 grupos criollos y 7 indígenas), incluyendo tanto datos bibliográficos como inéditos, con una comparación intercultural entre los usos criollos e indígenas. Entre las aplicaciones específicas de *L. cuneifolia* se mencionan las siguientes.

- Acción hipotensora, en forma de decocción ingerida entre los criollos y los grupos indígenas collas de la prepuna.
- Acción antihemorrágica, en forma de decocción ingerida, utilizada por los criollos en Córdoba y los valles interandinos.
- Acción abortiva, en forma de decocción ingerida, utilizada por los criollos en Córdoba.

- Acción emenagoga, como decocción ingerida, utilizada por los criollos de los valles interandinos.
- Acción oxitócica, como decocción ingerida, utilizada por los criollos en Córdoba.
- Para las fracturas, sus hojas molidas se colocan en forma de cataplasma sobre la afección. Utilizada por los criollos de los valles interandinos.
- Cefalgias, gastralgias, como decocción ingerida, utilizada por los criollos de los valles interandinos.
- Para normalizar la presión, como infusión ingerida, en el caso de los criollos de San Juan.
- Dolor de garganta, como decocción ingerida, en el caso de criollos-collas Yungas-Noroeste .
- Hipotermia, en forma de baños y vapores calientes, utilizado por criollos-collas Yungas-Noroeste .

A partir de diferentes ejemplares de muérdagos argentinos se han aislado y caracterizado diferentes compuestos como colina, acetilcolina y tiramina, las que tienen efecto sobre la presión sanguínea y el músculo cardíaco (Taira y col., 1994; Vazquez y col., 1989).

En cuanto a la acción farmacológica de los extractos, se estableció que éstos poseen efectos sobre el sistema cardiovascular y acciones citostáticas e inmunomoduladoras (Taira y col., 1994 y 2004; Fernández y col., 1998 y 2000; Wagner y col., 1998; Cerdá Zolezzi y col., 2005). Los extractos acuosos de *L. cuneifolia* producen inhibición en el crecimiento de las células linfoides activadas. Esta inhibición estaría mediada por la inducción de la muerte celular a través de un mecanismo apoptótico. Además, estos extractos pueden modular la actividad de las células macrofágicas a través de la inducción en la producción de óxido nítrico. Una lectina galactósido-específica presente en el extracto acuoso inhibe la proliferación de las células tumorales LB. La lectina galactósido-específica es el primer componente aislado responsable de una acción biológica en esta especie (Varela y col., 2001; Fernández y col., 2003; Cerdá Zolezzi y col., 2005). Los efectos cardiovasculares observados indican que la infusión de *L. cuneifolia* produce, según el hospedante, un efecto presor acompañado o no, de

vasodilatación y un efecto cardíaco variable (Taira y col., 1994 y 2004; Fernández y col., 2000). Esta diversidad de efectos podría deberse a las diferencias cuali-cuantitativas de los polifenoles presentes. El tratamiento de ratas con extracto crudo de *L. cuneifolia* por vía intraperitoneal produce aumento de la viscosidad sanguínea, disminución del colesterol plasmático y aumento de la excreción biliar (Dominighini y col., 2004). Se comprobó que la fracción metanólica tiene acción sobre el contenido lipídico de la membrana eritrocitaria lo cual produce una disminución en la deformabilidad del glóbulo rojo y un cambio de forma. Ambos fenómenos tienen efecto sobre la viscosidad sanguínea (Ferrero y col., 2007; Dominighini y col., 2015),

También fueron aislados en esta especie dos compuestos mayoritarios caracterizados como triterpenos pentacíclicos del grupo del lupeol: betulina y ácido betulínico (Fusco y col., 2004). Datos informados en la literatura (Siddiqui y col., 1988) demuestran la actividad anticancerígena y anti-VIH del ácido betulínico y antiinflamatoria de betulina. Además, se da cuenta de estudios farmacognósticos (Deng y col., 2002) que avalan esta propiedad, manifestada en una fuerte inhibición de las células tumorales *in vitro* (Cui y col., 1994).

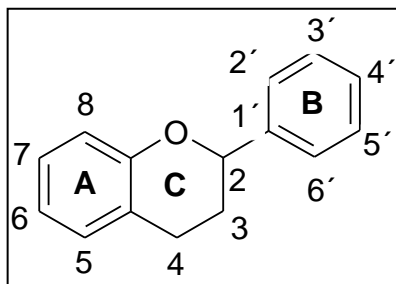
Soberón y col. (2014) realizaron un estudio de la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* y *Jodina rhombifolia*. Un fraccionamiento guiado llevó al aislamiento e identificación de compuestos con actividad contra fitopatógenos y cepas de referencia. En *L. cuneifolia* los principios activos fueron identificados como derivados de los flavonoides.

1.2. Flavonoides

Los flavonoides son productos del metabolismo secundario de las plantas y derivan de dos vías biosintéticas principales: la del shikimato y la del acetato, ambas provienen del metabolismo de la glucosa. La estructura común de los flavonoides es la de los difenilpropanos (C6-C3-C6) y consisten en dos anillos aromáticos unidos a través de 3 C que usualmente forman un heterociclo oxigenado (Figura 1.5). Biogenéticamente, el anillo A habitualmente deriva de una molécula de resorcinol o floriglucinol sintetizados por la vía del acetato mientras que el anillo B deriva de la vía del shikimato (Bravo, 1998). Esta estructura puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones

de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos.

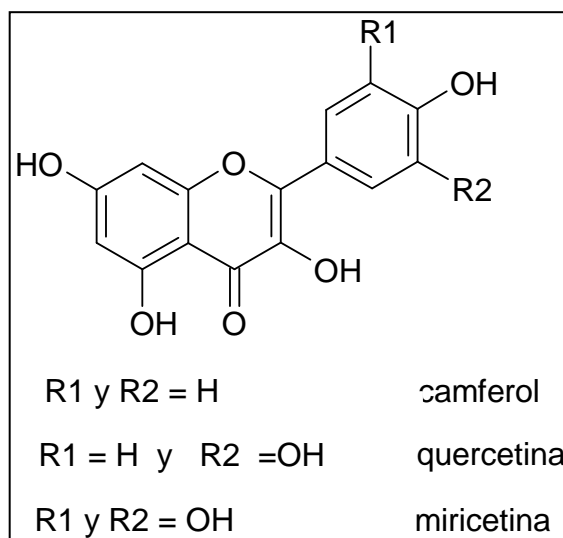
Figura 1.5.- Estructura general de los flavonoides



Las flavonas (apigenina, luteolina, diosmentina) y los flavonoles (camferol, quercetina, miricetina) y sus glicósidos constituyen los compuestos más comunes.

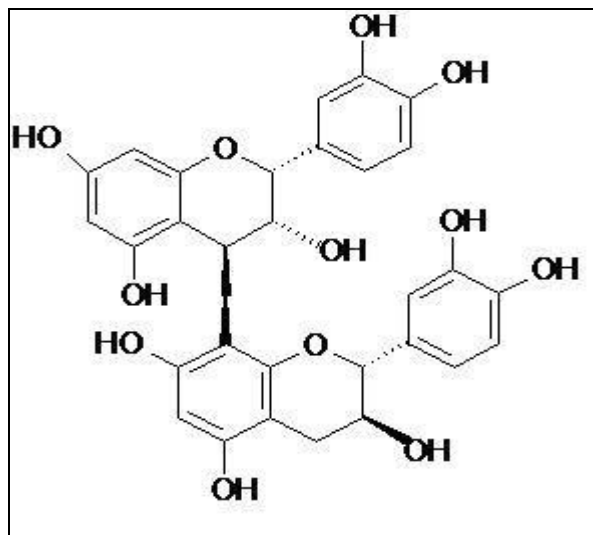
Los flavonoles se caracterizan por tener 3,5,7-trihidroxiavona y el anillo B puede tener uno más hidroxilos (Figura 1.6), ocasionalmente se encuentran como aglicones pero más comúnmente se hallan como derivados glicosilados. Los flavonoles ocurren como O-glicósidos pero las flavonas O y C-glicosiladas son muy comunes. Estas últimas poseen un enlace C-C entre el carbono anomérico de la molécula del azúcar y el C6 ó C8 del núcleo flavonoide. A diferencia de los O-glicósidos, los C-glicósidos no son clivados por tratamiento ácido (Bravo, 1998). Los enlaces glicosídicos se encuentran localizados normalmente en las posiciones 3 ó 7 y los azúcares asociados pueden ser ramnosa, glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa (Williams, 2006).

Figura 1.6.- Estructura de los flavonoles más comunes



Otro grupo igualmente importante, dentro de los flavonoides, son los taninos condensados o proantocianidinas. Existen como oligómeros solubles, de 2 a 6 núcleos fenólicos (flavan-3-ol con un flavan-3,4-diol o más), o como polímeros insolubles (Figura 1.7).

Figura 1.7.- Estructura de la proantocianidina B1



Los flavonoides tales como catequina, epicatequina, galocatequina, constituyen las unidades monoméricas de los taninos condensados, aunque también existen como monómeros libres (Bravo, 1998). Las catequinas (y las epicatequinas) con 3 grupos OH en el anillo B son las galocatequinas y las esterificadas con ácido gálico en la posición 3-OH del anillo C son los catequin-galatos.

1.2.1. Flavonoides en *L. cuneifolia*

Wagner (1993) reporta el hallazgo de los siguientes flavonoides: quercetina libre y sus derivados 3-O-glicosilados con xilosa, ramnosa y arabinosa, catequina, epicatequina y proantocianidinas en distinto grado de polimerización. Soberón y col., (2014) informan los siguientes principios activos: mono y diglicósidos de flavonoles tales como quercetina y camferol (rutina y nicotiflorina; quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-glucósido y quercetina-3-O-ramnósido) y ácido gálico.

1.3. Actividad antioxidante

1.3.1 Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas que poseen un número impar de electrones y son capaces de existir en forma independiente. El número impar de electrones se debe a la presencia de uno o más electrones desapareados en sus orbitales más externos. Un electrón desapareado es aquel que ocupa un orbital atómico o molecular por sí mismo. La presencia de dichos electrones le confiere a los radicales libres un carácter paramagnético, es decir, son atraídos débilmente por campos magnéticos. Además, en la mayoría de los casos, son altamente reactivos y poseen una vida media corta (Pryor, 1976).

Los radicales libres en sistemas biológicos pueden ser generados por diversas vías metabólicas. La conversión de ciertas moléculas en radicales libres en el organismo involucra tanto el metabolismo de compuestos endógenos como exógenos. Entre los radicales libres de mayor relevancia en sistemas biológicos se encuentran los centrados en el oxígeno (O). También adquieren relevancia los centrados en nitrógeno (N), azufre (S) y aquellos que se generan por acción de los metales de transición (Halliwell y Gutteridge, 2007).

1.3.2 Toxicidad del O₂

Si bien la utilización del oxígeno es un requerimiento esencial para la función y el desarrollo de la vida, cuando se encuentra en concentraciones mayores que las presentes en la atmósfera (21 % V/V; presión parcial 21 kPa), resulta tóxico para los organismos vivos (Ernster, 1986). Además, algunos productos que derivan del proceso fisiológico normal del metabolismo del O₂ producen alteraciones de la homeostasis celular. Estos productos son llamados especies reactivas del O₂ y son capaces de provocar daño a diversos componentes celulares.

1.3.3 Especies activas del O₂

Comprenden una familia de moléculas y radicales libres derivados de la reducción parcial del O₂ molecular. En su estado natural puede considerarse un radical libre. Si

bien posee un número par de electrones, dos de ellos se encuentran desapareados y se ubican en un orbital molecular antienlazante diferente. Estos electrones poseen espines paralelos. Cuando la molécula de O_2 adquiere esa configuración, se encuentra en su estado energético más estable, llamado triplete basal. El O_2 es un agente oxidante, en consecuencia se reduce por ganancia de electrones, los cuales deberán poseer un espín antiparalelo a los electrones desapareados del O_2 . La ganancia de electrones, en la reducción del O_2 , ocurrirá de a un electrón por vez, dando lugar a la formación de distintos intermediarios.

Si el O_2 molecular en su estado basal acepta un electrón, el producto obtenido será el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), especie química que solo posee un electrón desapareado. Se trata de una especie poco reactiva en soluciones acuosas y la carga negativa que posee, impide su difusión a través de las membranas biológicas. La incorporación de un segundo electrón dará lugar a la formación del ion peróxido (O_2^{2-}), que no es un radical pues no posee electrones desapareados. Sin embargo, esta molécula es considerada una especie activa del O_2 debido a que la unión O-O es relativamente débil por lo que la adición de otros dos electrones hará que se produzca una ruptura de la unión entre los dos átomos de O presentes en el O_2^{2-} , generando dos aniones óxido (O^{2-}). El H_2O_2 es generado directamente por reducción divalente del O_2 o indirectamente por la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$, catalizada por la enzima superóxido dismutasa. Es el más estable de los intermediarios de reducción del O_2 , a pesar de presentar la unión peróxido. Puede actuar como agente oxidante y reductor y su reactividad en soluciones acuosas es limitada y puede atravesar las membranas biológicas por procesos de difusión. El H_2O_2 puede descomponerse dando lugar a la formación del radical hidroxilo (HO^{\bullet}), el cual es el más reactivo de los radicales libres del O_2 . Reacciona inmediatamente en o cerca de su lugar de generación con azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, bases de ADN y ácidos orgánicos. Es entonces que el $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y HO^{\bullet} , junto con el O_2 singulete (1O_2), un estado excitado del O_2 , conforman el grupo de especies activas del oxígeno.

1.3.4 Estrés oxidativo

La formación de especies activas del oxígeno es parte de un proceso fisiológico que tiene lugar en la cadena respiratoria mitocondrial, la fagocitosis, el citocromo P450, la xantino oxidasa, el metabolismo del ácido araquidónico y la óxido nítrico sintasa. De acuerdo con la definición de Sies (1985), el estrés oxidativo es una situación en la cual las concentraciones intracelulares de las especies activas del oxígeno se encuentran incrementadas por sobre valores fisiológicos. Esto puede producirse por un aumento en la velocidad de producción de las especies oxidantes, una disminución en los niveles de antioxidantes o una combinación de ambas situaciones. Debido al desequilibrio entre la producción de especies activas del O_2 y el sistema de defensa antioxidante, se alcanza el mencionado aumento sostenido de sus concentraciones en estado estacionario y, en consecuencia, al daño oxidativo.

1.3.5. Sistemas de defensa antioxidante

En la célula existen sistemas de defensa específicos encargados de metabolizar las especies activas del oxígeno. Son denominados sistemas de defensa antioxidante y se clasifican en dos grupos: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los primeros se encuentran, principalmente, la superóxido dismutasa, las catalasas y las peroxidasas. La superóxido dismutasa es una enzima que cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 y O_2 molecular. La catalasa es una hemoproteína compuesta por cuatro subunidades. Posee una actividad específica para el H_2O_2 . La distribución de la glutatión peroxidasa es complementaria a la de la catalasa y ambas son responsables de la detoxificación del H_2O_2 y presentan diferentes afinidades por su sustrato. Así, la catalasa actuaría principalmente a altas concentraciones de H_2O_2 , mientras que la glutatión peroxidasa lo hace a bajas concentraciones. Dentro de los sistemas no enzimáticos se encuentran los antioxidantes hidrosolubles, tales como el glutatión, el ácido ascórbico y el úrico, entre otros, y los liposolubles, como la vitamina E, la coenzima Q10 y los carotenos. Otros compuestos de gran importancia son los polifenoles, especialmente los flavonoides.

1.3.5.1 Flavonoides

Las propiedades químicas de los flavonoides en términos de la habilidad de los hidrógenos fenólicos como atrapadores de radicales libres permiten predecir su capacidad antioxidante. Para que un flavonoide sea considerado antioxidante debe satisfacer dos condiciones básicas: 1) cuando está presente en bajas concentraciones en relación al sustrato que será oxidado puede demorar o prevenir la auto-oxidación o la oxidación mediada por radicales libres (Halliwell, 1990) y 2) el radical resultante luego del atrapamiento debe ser estable, a través de la formación de enlaces de hidrógeno por oxidación posterior (Shahidi y col., 1992). La química de los flavonoides es predictiva en cuanto a su capacidad atrapadora de radicales libres debido a que los potenciales de reducción son menores que los de los radicales alquil peroxilos y superóxido, lo cual implica que los flavonoides pueden inactivar estas especies y prevenir las consecuencias deletéreas de estas reacciones (Rice-Evans, 1996). Su actividad antioxidante también es reportada como atrapadores del radical superóxido y peroxilo, efectos inhibitorios sobre la peroxidación lipídica, inhibición de la oxidación de las LDL mediada por iones de cobre y macrófagos.

En cuanto a la relación estructura-actividad, las siguientes características son determinantes (Rice-Evans y col., 1996):

- La insaturación en el anillo C le confiere al radical aril-oxilo resultante una mayor estabilidad al permitir la deslocalización electrónica en la molécula.
- El doble enlace en 2,3 en conjugación con la función 4-oxo del anillo C es responsable de la deslocalización electrónica del anillo B. Es por ello que la glicosilación de los flavonoides reduce su actividad en comparación con los aglicones (Shahidi y col., 1992). El bloqueo del grupo 3-OH en el anillo C de la quercetina con un glicósido como en el caso de la rutina o la remoción del grupo 3-OH como ocurre con la luteolina, reduce la capacidad antioxidante.
- La importancia de la adyacencia de dos grupos oxhidrilos en la estructura orto difenólica en el anillo B que confiere mayor estabilidad al radical y participa en la deslocalización electrónica.

- Los grupos OH en posición 3 y 5 con la función 4-oxo en los anillos A y C son requeridos para la máxima capacidad antioxidante.
- La importancia de la hidroxilación en el anillo B de las flavonas y los flavanoles. También se ha demostrado la relevancia de la hidroxilación en el anillo A, en ausencia de la estructura dihidroxi en el anillo B.
- A mayor número de OH en los anillos, mayor capacidad antioxidante.

En consecuencia, la quercetina que satisface todos los requerimientos mencionados, exhibe una mayor capacidad antioxidante en comparación con los flavanoles (por ejemplo, catequina). En este último caso, dado que no hay deslocalización electrónica entre los anillos A y B debido a la saturación del anillo heterocíclico, el poder antioxidante está determinado por el número de grupos OH.

Las catequinas (incluyendo la epicatequina) esterificadas en posición 3-OH del anillo C con ácido gálico constituyen los catequín galatos y aquellas con 3 grupos OH en el anillo B son las galocatequinas. Estos reflejan la contribución del ácido gálico a la capacidad antioxidante de la catequina. En el caso de los flavanoles, el incremento del número de OH como los orto-difenoles o trifenoles, como en el caso de los ésteres de ácido gálico o las galocatequinas, incrementan su capacidad antioxidante.

La presencia de ácido gálico unido a la molécula del glicósido representa un incremento en la capacidad antioxidante respecto a su contraparte. Estudios previos han demostrado que el radical galoilo es una especie altamente reactiva que puede participar en una variedad de reacciones para generar dímeros a través de uniones C-C y C-O, determinando así la finalización de la reacción en cadena radicalaria (Yokozawa y col., 1998). Comparaciones entre glicósidos de quercetina y sus contrapartes no galoiladas demuestran que la presencia de ácido gálico en la molécula, incrementa el potencial antioxidante (Okamura y col., 1993).

1.3.6. Métodos para determinar capacidad antioxidante

Dentro de los métodos *in vitro* para determinación de capacidad antioxidante en extractos vegetales se cuentan los siguientes (Alam y col., 2013):

1.3.6.1. DPPH

Es quizás el método más utilizado, debido a su simplicidad y rapidez, y a su relativo bajo costo en comparación con los otros métodos. Consiste en medir el consumo de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidracilo) espectrofotométricamente a través de la disminución de absorbancia a 515 nm. El DPPH es un radical estable, debido a la deslocalización del electrón desapareado en la molécula. Tiene un color violeta oscuro el cual, al reaccionar con un sustrato capaz de donar un átomo de H, se decolora (Sánchez-Moreno y col., 1998). Se realiza una curva de calibración con Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), un análogo de la vitamina E, soluble en agua (utilizado como estándar).

1.3.6.2. TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)/ABTS

Este método es aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos. Consiste en generar radicales del ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), que poseen color azul, por reacción con ABAP (2,2-azo-bis (2-amidinopropano) hidrocloreto) (Campos y col., 1997). Este compuesto genera radicales peroxilo por descomposición térmica y es muy soluble en agua. El consumo de los radicales del ABTS se mide espectrofotométricamente a través de la disminución de la absorbancia a 734 nm. También se realiza una curva de calibración utilizando Trolox como estándar y una dilución adecuada del extracto a estudiar.

1.3.6.3. FRAP (Ferric reducing/antioxidant power)

Este método mide la habilidad de los antioxidantes de reducir el catión férrico (III) a ferroso (II) (Benzie y col., 1996). Se basa en la reducción del complejo del catión férrico y el TPTZ (2,3,5-trifenil-1,3,4-triazo-2-azoniaciclopenta-1,4-dieno cloruro) a su forma ferrosa, a bajos pH. Se monitorea midiendo los cambios de absorbancia a 593 nm.

1.3.6.4. ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

Se basa en la generación de radicales peroxilo utilizando AAPH (2,2-azobis 2-amidopropano dihidrocloruro) como generador de los radicales y mide la disminución de la fluorescencia en presencia de los compuestos atrapadores de radicales libres. La molécula blanco puede ser β -ficoeritrina o fluoresceína y utiliza Trolox como estándar. Existen variantes del método en la literatura (Dávalos y col., 2004; Prior y col., 2003; Ou y col., 2002).

1.3.7 Actividad antioxidante en la familia Loranthaceae

Gran parte de los estudios de la actividad antioxidante en la familia Loranthaceae han sido realizados sobre *Viscum album*. Los compuestos antioxidantes presentes en *V. album* se encuentran representados por flavonoides (quercetina y quercetina metil éter, acumulados en la superficie de la planta, ocasionalmente también el flavonol camferol y sus metil derivados, y raramente naringenina) (Haas y col., 2003) y ácidos fenólicos, tales como los ácidos digálico u o-cumárico, en sus formas libres o glicosiladas (Luczkiewicz y col., 2001). A fin de evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de las plantas, se han desarrollado numerosos métodos *in vitro*. ORAC (oxygen radical absorbance capacity), capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC), capacidad antioxidante total atrapadora de radicales (TRAP), y habilidad reductora del férrico (FRAP) se encuentran entre los métodos más populares que han sido utilizados (Wu y col., 2004).

Las investigaciones en los extractos crudos metanólicos sobre distintos hospedantes (*Tilia tometosa* Moench. -Tiliaceae-, *Acer campestre* L. -Aceraceae-, *Robinia pseudoacacia* L. -Fabaceae-) demuestran que éstos poseen un efecto atrapador de radicales libres y ejercen una acción protectora sobre la generación de daño oxidativo. Los métodos utilizados comprenden los mencionados en el párrafo anterior y aquellos que indican el daño oxidativo a distintas macromoléculas biológicas (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), por ejemplo). La capacidad antioxidante es dependiente de la época de la recolección, así como también del hospedante. Se verificó además que el extracto de *V. album* puede actuar como antioxidante primario y/o secundario (Önay-Uçar y col., 2006). En otro estudio (Vicaş y col., 2009), se investigó la capacidad antioxidante en las hojas y los tallos, sobre distintos hospedantes (*Acer campestre*, *Malus domestica* Borkh. -Rosaceae-, *Fraxinus excelsior* L. -Oleaceae- ,

Populus nigra L. -Salicaceae- y *Robinia pseudoacacia*) de las fracciones hidrofílicas y lipofílicas, representadas por el contenido fenólico (ácidos fenólicos y flavonoides) y carotenoide, respectivamente, mediante el método FRAP. No se detectaron diferencias significativas entre los valores de actividad antioxidante en la fracción hidrofílica de las hojas y los tallos, pero los extractos derivados de las hojas de “muérdago” sobre los hospedantes *Malus domestica* y *Fraxinus excelsior* y todos los extractos de los tallos tienen la máxima capacidad antioxidante ($0,14 \pm 0,12$ y $0,13 \pm 0,11$ mg/l equivalentes de vitamina C / g de hojas frescas). La capacidad antioxidante hidrofílica se correlaciona con el contenido de fenoles totales, determinados por el método de Folin-Ciocalteu, tanto en las hojas como en los tallos. Las hojas de “muérdago” provenientes de *Acer campestre*, seguidas por *Malus domestica* y *Fraxinus excelsior* muestran mayores concentraciones de fenoles. Estas últimas exhiben mayores valores de actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica.

Posteriormente (Vicaş y col., 2011), se realizó un estudio más exhaustivo de las propiedades antioxidantes de *V. album*. Además de investigar la influencia de los distintos hospedantes (*Acer campestre*, *Fraxinus excelsior*, *Populus nigra*, *Malus domestica* y *Robinia pseudoacacia*) en la composición química y la actividad antioxidante de las hojas y los tallos de *V. album*, se examinó el efecto del solvente de extracción (agua y etanol). HPLC-DAD (cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos) se utiliza para el análisis de compuestos bioactivos de las hojas y los tallos de “muérdago” sobre cinco hospedantes distintos. Los métodos usados comprenden DPPH, ORAC y TEAC, los cuales se compararon con la cuantificación de los fenoles totales por Folin - Ciocalteu. *V. album* en *Fraxinus excelsior*, registró el mayor nivel de fenoles totales mientras que en *Malus domestica* se dieron los valores más bajos, lo cual confirma los hallazgos previos sobre la influencia del hospedante y de la época de recolección. En general, la actividad antioxidante es mayor en el extracto alcohólico y en las hojas. Entre los compuestos investigados por HPLC se encuentran un triterpeno pentacíclico (ácido betulínico), 12 compuestos fenólicos (ácidos gálico, protocatéquico, gentísico, clorogénico, p-OH benzoico, cafeico, siríngico, salicílico, p-cumarico, ferúlico, sinápico y trans-cinámico) y 4 polifenoles (naringenina, quercetina, camferol y ácido rosmarínico). Se encontraron diferencias en la composición química de los extractos entre distintos hospedantes y entre las hojas y los tallos. Los ácidos fenólicos representan la mayor fracción de compuestos bioactivos.

Estudios de la actividad antioxidante realizados sobre otras especies de la familia Loranthaceae incluyen *Dendrophthoe falcata* L. F, *Plicosepalus acacia* (Zucc.) Wiens & Polhill, *Plicosepalus curviflorus* (Oliv.) Tiegh., *Phragmanthera austroarabica* A.G. Mill. & J. Nyberg, *Loranthus micranthus* L., entre otros. Los métodos utilizados comprenden DPPH, peroxidación lípidica y óxido nítrico.

1.3.7.1. Antecedentes en *Ligaria cuneifolia*

Borneo y cols. (2009 y 2013) han realizado un *screening* de la actividad antioxidante sobre especies presentes en la provincia de Córdoba. Se determinó el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante por el método FRAP, en 41 plantas. Los resultados obtenidos demostraron que *L. cuneifolia* posee el contenido más alto de fenoles totales y exhibe la mayor capacidad antioxidante. También se han realizado estudios sobre la dinámica de polifenoles en las fracciones acetato de etilo, butanólica y acuosa de ejemplares provenientes de San Juan y su relación con la capacidad antioxidante por medio de los métodos de ABTS y DPPH (Dobrecky y col., 2014).

1.4. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (EC) es una poderosa técnica analítica que se ha desarrollado en las últimas décadas. La historia de la EC puede remontarse a 1970 cuando Jorgenson y Lukacs (1981) lograron 4.000.000 de platos teóricos para la separación de aminoácidos derivatizados en menos de 25 minutos utilizando capilares de 75 µm i.d., 550 µm o.d. y largo de 80-100 cm con un voltaje aplicado +30 kV. Desde ese momento, la electroforesis capilar ha evolucionado favorablemente utilizando el conocimiento acumulado en el desarrollo de la cromatografía líquida y el entendimiento del funcionamiento de las columnas.

Desde sus comienzos, la EC ha sido presentada como una herramienta complementaria y alternativa a los métodos cromatográficos tradicionales. La EC constituye especialmente un método de elección para el análisis de iones, compuestos quirales, moléculas de alto peso molecular, mezclas complejas y el análisis simultáneo de compuestos de muy distinta hidrofobicidad, tanto en matrices simples como complejas (Wallingford y col., 1989).

Entre sus numerosas ventajas se cuentan el menor consumo de reactivos y solventes, y por lo tanto, menor costo e impacto ambiental, así como alta eficiencia, posibilidad de análisis simultáneo de compuestos con características físico-químicas diferentes y la oportunidad que ofrece de estudiar distintas reacciones de manera rutinaria con mínima cantidad de muestra.

Asimismo, la EC es una poderosa técnica útil para la determinación de numerosas propiedades físico-químicas, como son las constantes de disociación (Ishihama y col., 1994; Mrestani y col., 1998), constantes de asociación proteína-ligando (Kraak y col., 1992), constantes de agregación (Mrestani y col., 2002; Poša y col., 2007), concentración micelar crítica y parámetros termodinámicos como cambios en la entropía y la entalpía (Mrestani y col., 2001 y 2002; Poša y col., 2007; Reis y col., 2004).

1.4.1 Principios básicos

La EC comprende una familia de técnicas basadas en la separación de compuestos mediante la aplicación de un campo eléctrico. Este proceso de separación ocurre dentro de la estrecha luz de un tubo capilar de sílica (Blanc, 1997).

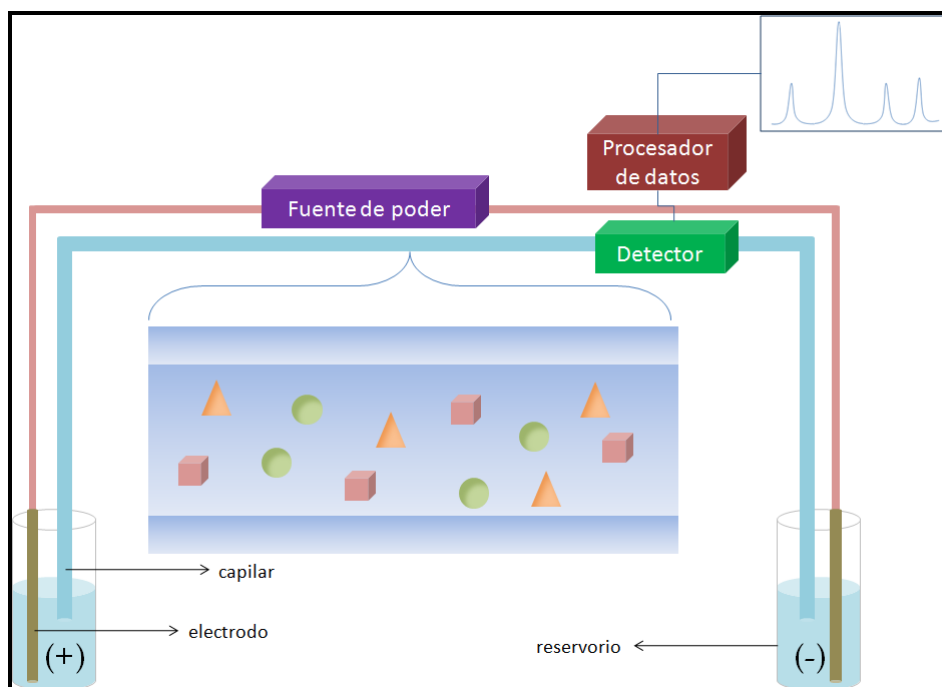
El diseño básico de un equipo de EC consta de los siguientes componentes (Figura 1.8):

- capilar de sílica fundida, teflón o vidrio, el cual posee un recubrimiento de poliimida que lo hace resistente;
- fuente de poder: suministra la diferencia de potencial (0-30 kV);
- electrodos de platino;
- reservorios, se coloca el electrolito soporte (background electrolyte, BGE) donde se sumergen ambos extremos del capilar y los electrodos de platino para cerrar el circuito;
- sistema de detección, la celda es el propio capilar. En ese tramo se elimina el recubrimiento de poliimida, para facilitar la detección. Acoplados al equipo de

EC pueden utilizarse distintos tipos de detectores UV-visible, fluorescencia, espectrómetro de masa, entre otros;

- sistema de introducción de muestra. Existen distintos modos de introducción de la muestra al extremo del capilar como son: hidrostática, por vacío y por presión positiva o electrocinética. Generalmente, los equipos modernos cuentan con un sistema de introducción de muestra automático.

Figura 1.8.- Esquema de un equipo de EC



A diferencia del HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia), en la electroforesis capilar el movimiento del fluido dentro del capilar no se genera mecánicamente sino que se genera eléctricamente. Esto resulta en una dramática reducción en la banda de dispersión lo que genera una eficiencia mucho mayor en la separación (Karger, 1993).

Los capilares utilizados son de sílica fundida recubiertos de una poliimida que les confiere flexibilidad. Poseen diámetros y largos variables que van desde 50-150 μm y 10-100 cm, respectivamente (Blanc, 1997). La utilización de los capilares de pequeño diámetro disipa la corriente térmica convectiva generada por la circulación de cargas

(efecto Joule¹), de esta manera se previenen desestabilizaciones en la separación que producen una falta de precisión en los resultados.

Principio de migración electroforética

El electrolito *background* o soporte (BGE) es en general una solución buffer o amortiguadora de variada molaridad usada como medio líquido para la separación electroforética. El BGE debe asegurar, a lo largo de toda la corrida, condiciones constantes como son la fuerza iónica y el pH. La elección del buffer también debe tener en cuenta la conductividad de la solución que debe ser baja para que se generen pequeñas corrientes y mantener al mínimo el efecto Joule resultante.

Cuando se aplica una diferencia de potencial a ambos extremos de un capilar, se genera un campo eléctrico proporcional al voltaje aplicado e inversamente proporcional al largo del capilar (Ecuación 1.1).

Ecuación 1.1.-

$$E = \frac{V}{L}$$

Donde V es el voltaje aplicado, L el largo total del capilar y E el campo eléctrico.

Dentro del campo eléctrico generado (E) las especies iónicas son sometidas a una fuerza electrostática (F_e) que es proporcional al campo y a la carga del ion (q) (Ecuación 1.2).

Ecuación 1.2.-

$$F_e = qE$$

La fuerza electrostática (F_e) causa la aceleración de los iones hacia el electrodo de carga opuesta. A medida que la velocidad aumenta aparece una fuerza de oposición debida a la fricción (F_r) causada por el medio que lo rodea que le hace reducir su velocidad. Asumiendo que la molécula posea una forma esférica de radio r podemos definir la fuerza de fricción en términos de la ley de Stokes (Ecuación 1.3).

Ecuación 1.3.-

$$F_r = 6\eta\pi r v$$

Donde r es el radio, η la viscosidad del medio, v la velocidad.

¹ Efecto Joule: Aumento de temperatura dentro de la solución debido a la circulación de cargas dentro del capilar.

Cuando se alcanza el estado de equilibrio los iones se mueven con una velocidad (v) constante y proporcional al campo eléctrico aplicado (Ecuación 1.4)

Ecuación 1.4.-

$$v = \mu E$$

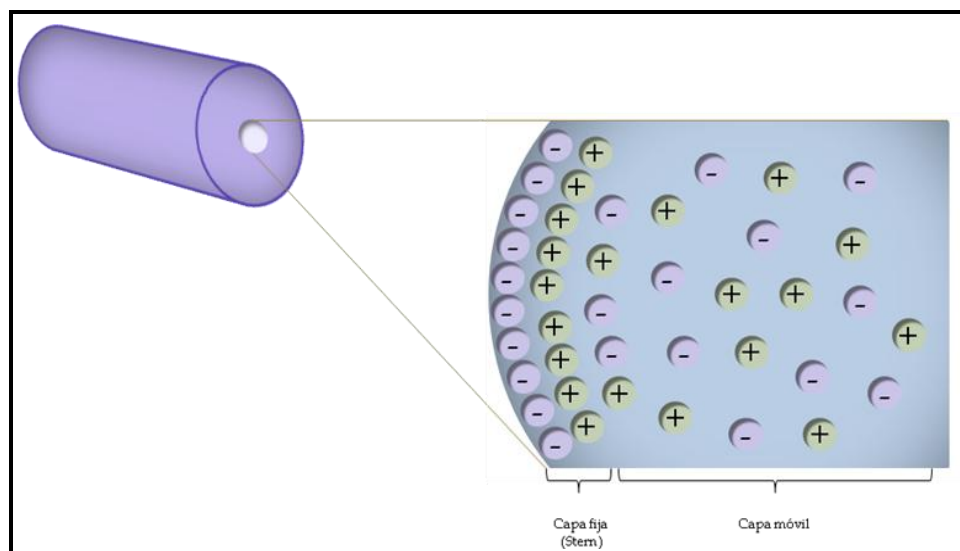
Donde la constante de proporcionalidad μ es denominada movilidad electroforética y es una propiedad característica de cada ion, en un determinado medio y a una determinada temperatura.

Flujo electroendosmótico (EOF)

El término flujo electroendosmótico (*electroendosmotic flow*, EOF) define el movimiento de fluido a través del capilar, cuando un determinado voltaje es aplicado.

Cuando el pH dentro del capilar es mayor a 3, los silanos de la pared comienzan a ionizarse generando cargas negativas fijas sobre la pared del capilar (Figura 1.9). A mayor valor de pH, mayor será el grado de ionización de la pared. Estas cargas negativas sobre la pared del capilar atraen las cargas positivas presentes en la solución provocando un aumento de las cargas positivas en la interfase entre la pared y el buffer. A menor distancia, mayor es la fuerza de atracción. Por lo tanto, las cargas positivas más cercanas formarán una capa interna fuertemente unida, denominada capa de Stern o fija, mientras que las cargas positivas más alejadas de la pared formarán una segunda capa de cargas donde la atracción es más lábil. Es la denominada capa móvil (Karger, 1993; Blanc, 1997).

Figura 1.9.- Representación del interior del capilar



Estas dos capas constituyen una doble capa difusa de cargas conocida como capa de Debye. Entre las dos capas se genera una diferencia de potencial, conocida como Potencial Z.

Cuando se aplica un campo eléctrico, las cargas positivas migrarán hacia el cátodo rodeadas de su esfera de hidratación, arrastrando consigo al fluido dentro del capilar. La velocidad del flujo está dada por la ecuación 1.5.

Ecuación 1.5.-

$$V_{eof} = \frac{-\varepsilon\zeta}{\eta E}$$

donde

η = viscosidad

ε = constante dieléctrica

ζ = potencial Z

E= campo eléctrico aplicado

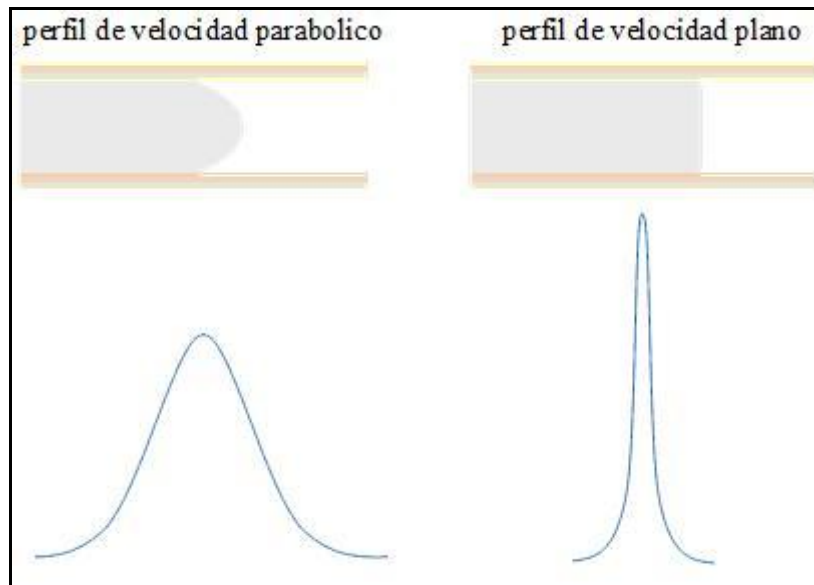
La movilidad electroforética del EOF viene dada por

Ecuación 1.6.-

$$\mu_{eof} = \frac{-\varepsilon\zeta}{\eta}$$

Una característica fundamental que posee el EOF es el perfil de la velocidad del fluido impulsado el cual es plano a diferencia del perfil de velocidad parabólico generado por una bomba neumática obtenido en HPLC (Figura 1.10).

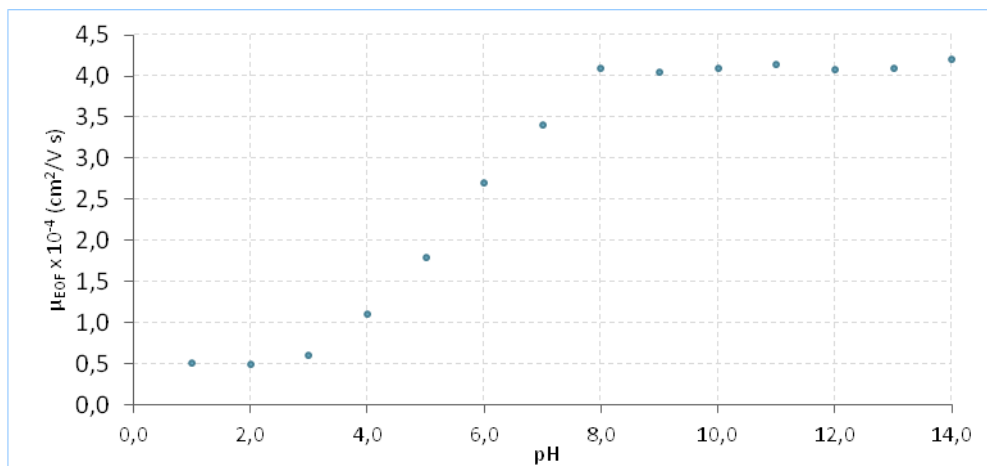
Figura 1.10.- Esquema de los perfiles de velocidad



Dependencia del EOF con el pH

A mayor pH, mayor grado de ionización de los grupos silanoles de la pared. Por lo tanto, mayor será el potencial Z y por ende, mayor será el EOF (Karger, 1993).

Figura 1.11.- Influencia del pH sobre el EOF



1.4.2. Modalidades de la EC

Si bien no es la única clasificación posible, las modalidades de la EC podrían agruparse de la siguiente manera:

- Modalidad electroforética o no-partición
 - Electroforesis capilar zonal (*capillary zone electrophoresis, CZE*)
 - Isoelectroenfoque capilar
 - Electroforesis capilar en gel

Isotacoforesis

- Modalidad cromatográfica o de partición

Cromatografía electrocinética (*electrokinetic chromatography*, EKC)

Micelar (*micelar electrokinetic chromatography*, MEKC)

Microemulsiones (*microemulsion electrokinetic chromatography*, MEEKC)

Polímeros

1.4.2.1 Electroforesis Capilar zonal (ECZ)

Principios básicos

La ECZ es uno de los modos más utilizados de la electroforesis capilar. Se caracteriza por la utilización de un capilar generalmente de sílica fundida o teflón con un electrolito soporte (BGE) como medio conductor. El electrolito soporte generalmente es un buffer. El principio de separación en este modo está basado en la movilidad electroforética de cada analito sumado a la influencia del EOF. La movilidad observada del analito ($\mu_{observada}$) debe ser expresada como la suma entre la movilidad efectiva del analito (μ_{ef}) y la movilidad del EOF (μ_{eof}).

Ecuación 1.7.-

$$\mu_{observada} = \mu_{ef} + \mu_{eof}$$

Las movilidades electroforéticas, así como la selectividad y resolución son influenciadas por el buffer soporte (tipo, fuerza iónica y pH).

Buffer

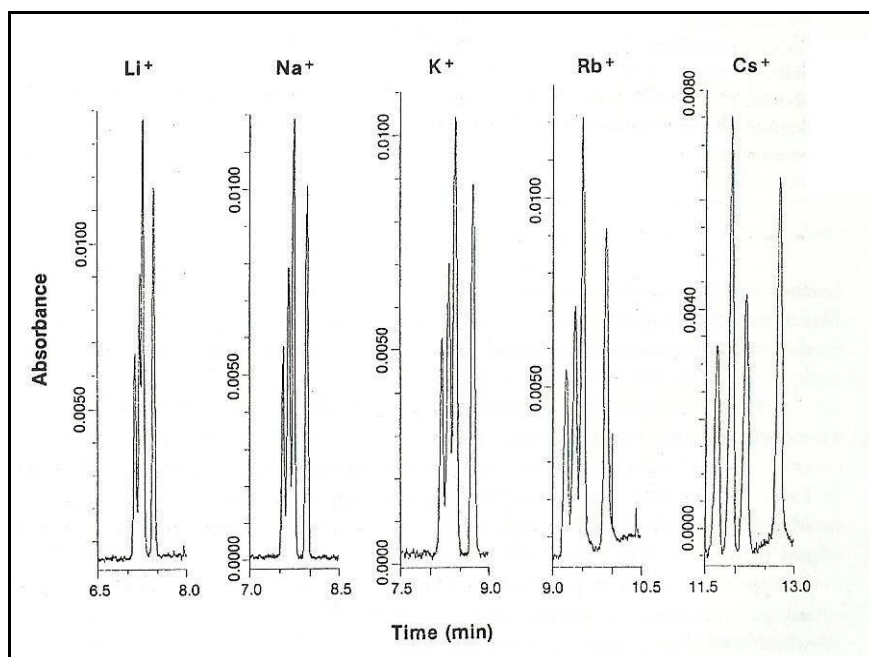
Los buffers inorgánicos están constituidos por 2 partes: un catión (ion metálico) y un anión cuya naturaleza influye directamente en la separación (Janini, 1993).

Rol del catión

El factor que mayor influencia ejerce sobre la movilidad electroforética de un ión es la relación carga/radio. Sin embargo, la movilidad electroforética también es dependiente del tipo y concentración del buffer ya que la presencia de una doble capa apantalla al ión y reduce su carga efectiva. Para demostrar el efecto del catión del buffer en la movilidad electroforética, Isaaq y col. (Atamna y col., 1990a) evaluaron el efecto de la

naturaleza del catión en los tiempos de migración y resolución de una mezcla de 4 aminoácidos dansilados (Figura 1.12).

Figura 1.12.- Efecto de la naturaleza del catión del buffer en el tiempo de migración y resolución de 4 aminoácidos dansilados (leucina, prolina, metionina y alanina)



Los resultados obtenidos demostraron que la movilidad de los analitos disminuye conforme aumenta el radio cristalino del catión y, por lo tanto, la selección del catión influye tanto en la movilidad electroforética, así como en los tiempos de migración y la resolución.

Rol del anión

Asimismo, Isaaq y col. (Atamna y col. 1990b) estudiaron la influencia del anión del buffer. Para ello, utilizaron 7 soluciones buffers compuestas por distintas sales de sodio de igual concentración, ajustadas a un mismo pH en idénticas condiciones cromatográficas. Aquí se demostró que la corriente resultante en el sistema varía ampliamente de acuerdo con el anión.

También se estudió el efecto del anión sobre la movilidad electroforética y el factor de selectividad (α) entre distintos pares de aminoácidos.

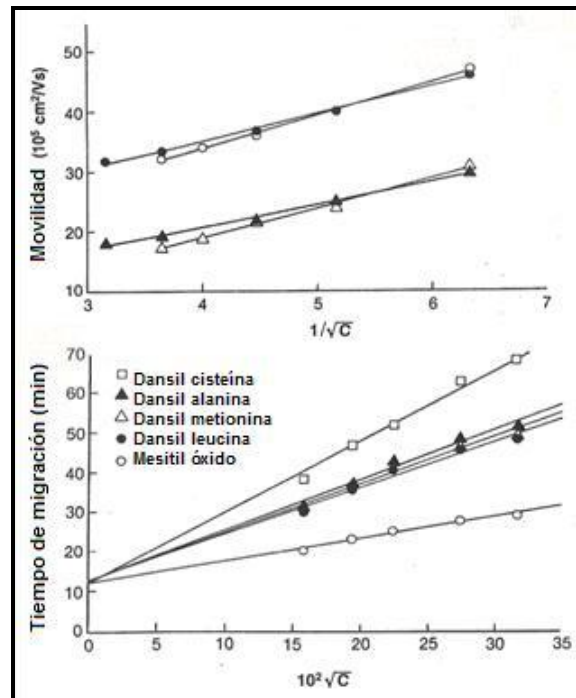
Los resultados mostraron que el anión del buffer influye no sólo en el flujo electroendosmótico y la movilidad sino también en la resolución, la selectividad y la potencia producida para el voltaje aplicado. Es por esto que debe prestarse especial atención a la selección del buffer para producir óptimos resultados y generar el mínimo de calor.

Concentración del buffer

Muchos investigadores han demostrado el efecto de la concentración del buffer utilizado en la movilidad electroforética a través de distintos trabajos. En ellos se ha observado que la movilidad electroforética efectiva (μ_{ef}) es inversamente proporcional a la concentración del buffer (Altria y col., 1987; Bruin y col., 1989). Sin embargo, no es sino hasta 1975, cuando Wieme y sus colaboradores, dan un sustento teórico a estas observaciones, proponiendo que la movilidad electroforética y la movilidad del flujo electroendosmótico (μ_{eof}) deberían ser proporcionales a la inversa de la \sqrt{C} (siendo C la fuerza iónica). Para evaluar la validez de esta teoría, Isaaq y col. (1991) determinan la movilidad electroforética de la dansilalanina utilizando distintas concentraciones de un buffer (Figura 1.13).

De acuerdo con estos resultados y teniendo en cuenta la relación entre el tiempo de migración (t_m), μ_{ef} y μ_{eof} , puede establecerse que existe una relación lineal entre t_m vs. $1/\sqrt{C}$. Se llega entonces a la conclusión que a mayor concentración del buffer, la movilidad electroforética se ve reducida por lo que el tiempo de migración de cualquier soluto aumenta y, por lo tanto, también lo hace α (factor de selectividad).

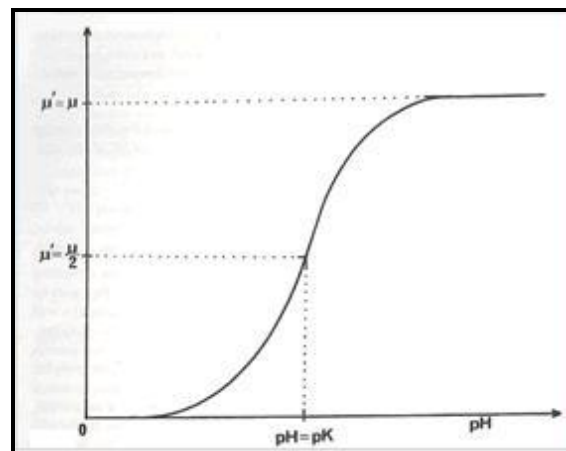
Figura 1.13.- Relación entre el tiempo de migración de cada aminoácido y la fuerza iónica del buffer presente en el electrolito



Efecto del pH

Uno de los parámetros fundamentales en la preparación del buffer es el pH. Es un parámetro crítico ya que influye de forma directa en el grado de ionización de la pared del capilar y por lo tanto el EOF, y afectará el grado de ionización de los analitos en función de su pKa. La variación en el pH modificará la carga del analito y por lo tanto su movilidad (Karger, 1993) (Figura 1.14).

Figura 1.14.- Efecto del pH sobre la movilidad electroforética



Modificadores

En la ECZ, el electrolito soporte o BGE puede contener una variedad de aditivos y modificadores para mejorar la eficiencia en la separación.

Solventes Orgánicos

Los solventes orgánicos son ampliamente utilizados en electroforesis capilar con múltiples fines. Para la aplicación de esos solventes, sus propiedades son fundamentales. Una de ellas es la solubilidad del solvente orgánico en agua. Los solventes orgánicos son utilizados para mejorar la solubilidad de los analitos en el BGE, influir en su movilidad efectiva, ya sea modificando su movilidad absoluta o su valor de pKa, para lograr una buena resolución. También se utilizan para ajustar la selectividad y el factor de retención (Masselter, 1995). El porcentaje del solvente utilizado varía entre un 5 y un 40 %.

En la tabla 1.2 se observan los solventes orgánicos más utilizados en EC y sus propiedades fisicoquímicas.

Tabla 1.2.- Propiedades físico-químicas de los solventes más utilizados en EC.

Solvente	Peso molecular	P.E. (° C)	F.P. (° C)	ρ (g/cm ³)	ϵ	η (cP)	μ (debye)
Agua	18,02	100,0	0,0	0,9971	78,30	0,8903	1,85
Metanol	32,04	64,6	-97,8	0,7866	32,7	0,5445	1,70
Etanol	46,07	78,3	-114,5	0,7851	24,55	1,089	1,69
Acetonitrilo	41,05	81,6	-44,9	0,7768	35,95	0,3409	3,92
N,N-Dimetilformamida	73,10	153	-61	0,9443	36,71	0,796	3,86
Dimetil sulfóxido	78,13	189	18,5	1,0958	46,7	1,96	3,96
Acetona	58,08	56,2	-94,6	0,7850	20,7	0,3040	2,88
1,4-Dioxano	88,11	101,3	11,8	1,0269	2,209	1,196	0,45
Tetrahidrofurano	72,11	66	-108,5	0,8811	7,58	0,460	1,75

P.E. punto de ebullición, F.P. punto de fusión, ρ densidad, ϵ constante dieléctrica, η coeficiente de viscosidad, μ momento dipolar. Valores a 25 °C. (Covington, 1973)

Aditivos

Son sustancias que se adicionan al BGE para inhibir competitivamente la interacción entre los analitos y la pared del capilar. Por ejemplo, altas concentraciones de sales pueden agregarse al BGE para mejorar la forma de los picos. Asimismo, los cationes de

las sales compiten con los analitos por las cargas negativas de la pared aumentando la eficiencia de la separación. Los aditivos zwitterionicos a altas concentraciones y las aminas divalentes a bajas concentraciones también son utilizadas para mejorar la eficiencia de la separación pero sin incrementar considerablemente la corriente (Marsh, 2004).

Inversores de flujo

El agregado de surfactantes catiónicos en concentraciones en el orden de 0,1-1,5 mM, atenúa las cargas negativas de la pared del capilar (Figura 1.15a). La cabeza catiónica de estos surfactantes se asocia electrostáticamente a la pared del capilar cargada negativamente, a valores de pH superiores a 3. Esto hace que las colas hidrofóbicas se orienten hacia la luz del capilar. Con la concentración adecuada, no existe un exceso de cargas y se elimina el EOF (Figura 1.15b).

Figura 1.15a.- Representación esquemática del capilar a pH mayor a 3

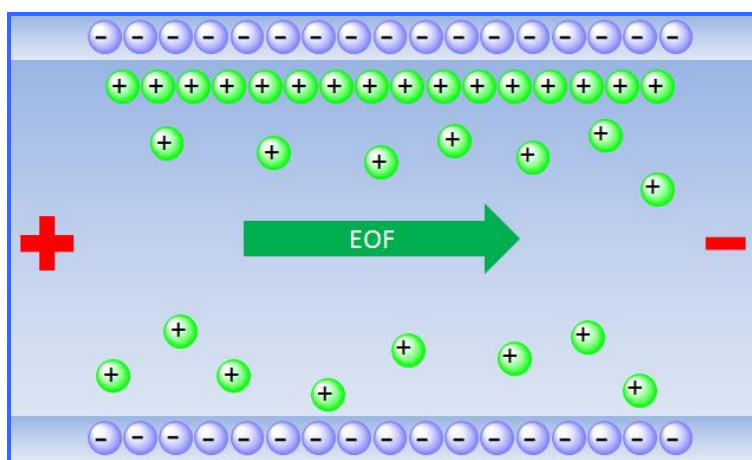
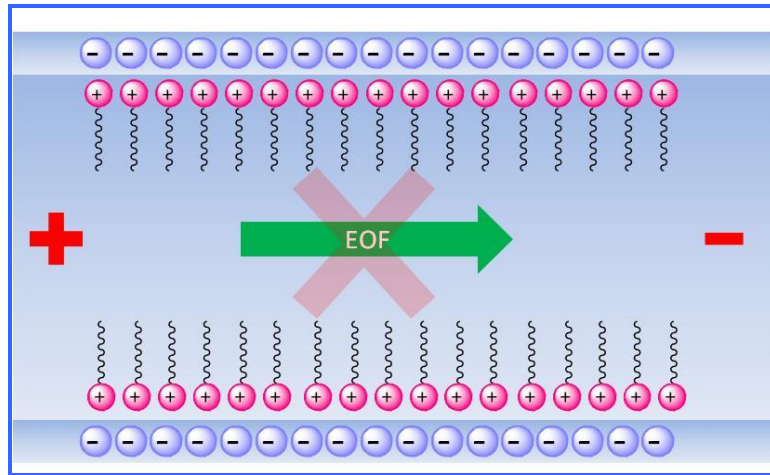
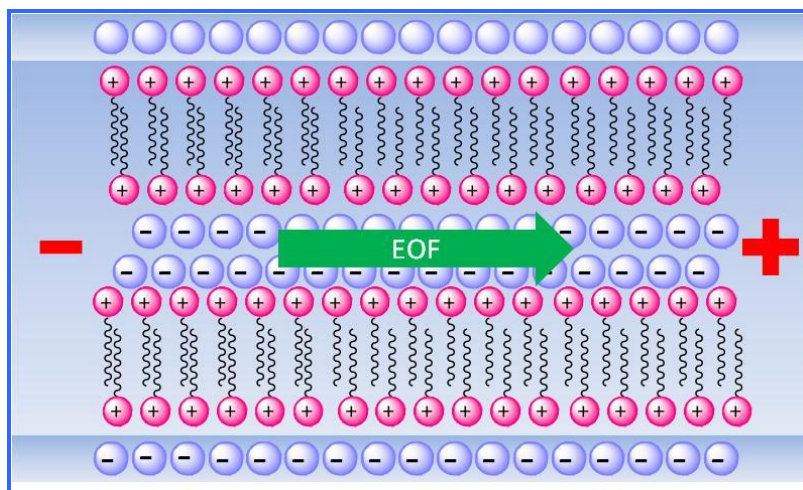


Figura 15b.- Representación esquemática del capilar a pH mayor a 3 con el agregado de un inversor de flujo



Si la concentración del tensioactivo aumenta (Figura 1.16), el exceso de moléculas del surfactante se asociará a través de interacciones hidrofóbicas con las colas de aquellas moléculas de tensioactivo asociadas electrostáticamente a la pared. De esta manera, se deja expuesta hacia el interior del capilar la carga positiva del tensioactivo. La dirección del flujo en un capilar cargado positivamente es inversa. Entre los inversores de flujo más conocidos se encuentran el bromuro de dodeciltrimetilamonio (CTAB) y el bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTAB).

Figura 1.16.- Representación esquemática del capilar a $\text{pH} > 3$ con un exceso de moléculas de tensioactivo

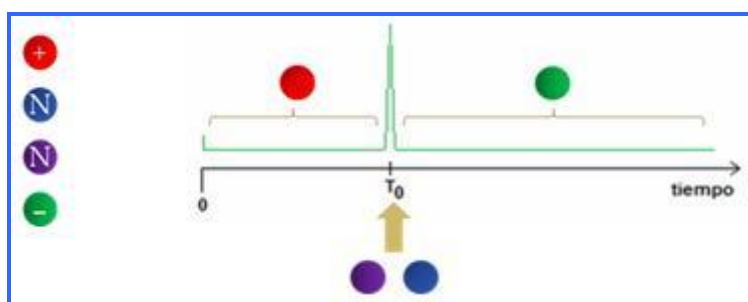


1.4.2.2. Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)

Principios básicos

Si bien la ECZ posee un alto poder separativo, su aplicabilidad se limita a analitos que posean carga neta, ya que los analitos neutros no presentan movilidad electroforética propia (Figura 1.17).

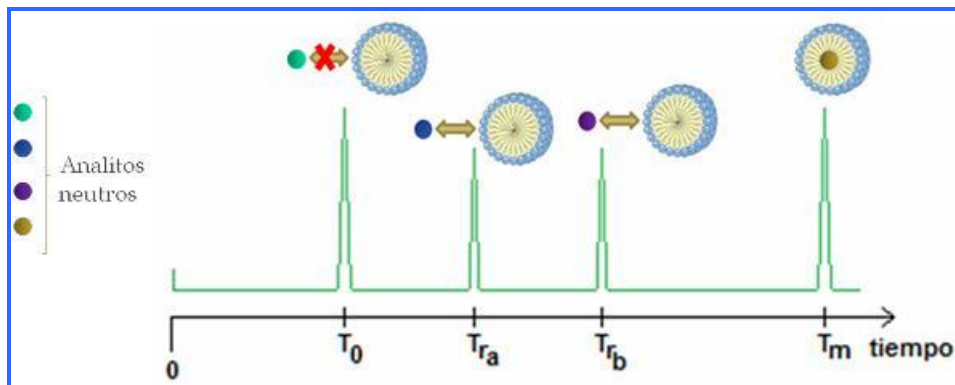
Figura 1.17.- Movilidad electroforética para analitos cargados positivamente, negativamente y neutros



A fin de ampliar el espectro de aplicación de la electroforesis capilar para su utilización en el análisis de compuestos neutros o aquellos con movilidad electroforética semejante, surge una nueva modalidad de la electroforesis capilar, la cromatografía electrocinética (EKC) (Terabe, 1989).

El principio de separación en EKC es semejante al principio de la cromatografía. En una separación cromatográfica, se necesitan dos fases entre las cuales particiona el analito. Una de las fases se denomina móvil, ya que migra con una determinada velocidad dada por el flujo, y la otra estacionaria. Si estos conceptos son trasladados a la EC, se observa que los analitos cargados migrarán con una velocidad diferencial a la del EOF, por lo que cualquier sustancia cargada que pueda incorporar un analito es apropiada para ser usada como “fase”. Se denomina a ésta, “fase pseudoestacionaria o carrier de separación” (Figura 1.18).

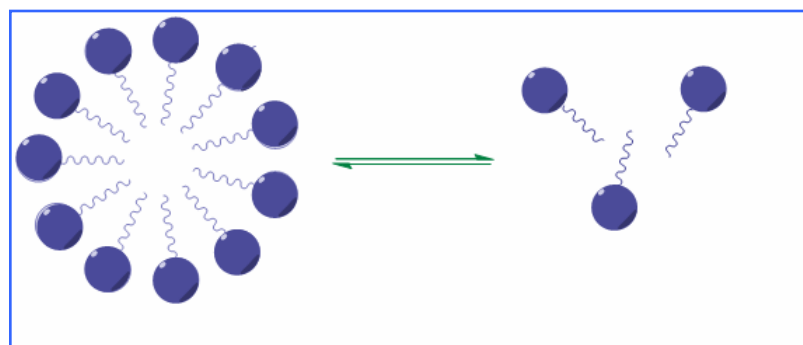
Figura 1.18.- Diferentes comportamiento de analitos neutros en EKC.



Una de las fases pseudoestacionarias más utilizadas en EKC las constituyen las micelas (MEKC). La separación de analitos neutros por electroforesis capilar usando micelas es propuesta por Nakagawa (1981) y finalmente demostrado por Terabe (1984), momento desde el cual se denomina a esta modalidad de la electroforesis capilar, MEKC (cromatografía micelar electrocinética, por sus siglas en inglés) (Terabe, 1984).

Las micelas son sistemas nanoestructurados formados por agregados de moléculas de surfactante. Se forman cuando la concentración de tensioactivo es superior a la concentración micelar crítica (CMC). La CMC de un surfactante se define como la concentración de soluto en la que aparece en solución la primera micela y que, en términos prácticos, se relaciona con cambios apreciables en fenómenos como tensión superficial, solubilización de otros compuestos orgánicos y dispersión de la luz (Coleman, 1987; Shaw y col., 1991; Carey y col., 1972), que pueden ser explicados por la existencia de agregados micelares en solución. Las micelas existen en un equilibrio dinámico entre su forma monomérica y el agregado (Figura 1.19).

Figura 1.19.- Equilibrio dinámico entre los monómeros y la micela



Son descritas como esferas cuyo tamaño y forma depende de cada surfactante. En MECK, cuando un surfactante iónico es agregado al electrolito en una concentración superior a la CMC, se forman micelas cargadas que migran con velocidad diferencial respecto de la fase acuosa, actuando de esa manera como fase pseudoestacionaria.

El dodecilsulfato de sodio (*sodium dodecylsulfate*, SDS) es uno de los surfactantes más utilizados en MECK dado sus ventajas sobre otros surfactantes tales como su alta capacidad de solubilización, baja absorción UV. Además, sus propiedades físico-químicas se encuentran bien caracterizadas. Entre sus desventajas, presenta una CMC relativamente alta (aproximadamente 8 mM en agua pura) y su elevado punto de Kraft (16 °C) (el punto de Kraft corresponde a la temperatura donde la solubilidad del surfactante alcanza su CMC. Debajo de la temperatura de Kraft, el surfactante no es bastante soluble para que esté en concentración suficiente como para formar micelas, y el equilibrio se hace entre una solución monomolecular y el surfactante sólido precipitado). La micela de SDS consiste en unas 60 moléculas/micela y está negativamente cargada en toda la escala de pH por lo que migra en dirección opuesta al EOF utilizando fuente positiva (Yashima, 1992; Sepaniak, 1992).

El SDS como agente tensioactivo formando fases pseudoestacionarias es muy utilizado en la separación de analitos de mediana hidrofobicidad pero posee una baja selectividad en la separación de analitos más hidrofóbicos (Yashima, 1992; Sepaniak, 1992).

Movilidad y factor de retención

En MEKC, el factor de retención (k') se obtiene determinando la movilidad electroforética de cada analito. La movilidad de la micela se calcula utilizando como marcadores analitos neutros que poseen una alta hidrofobicidad por lo cual quedan retenidos en la misma.

El factor de retención (k') se define como el coeficiente de distribución de masas de acuerdo con la ecuación 1.8 (Lucangioli, 2003):

Ecuación 1.8.-

$$k' = \frac{n_{i;pe}}{n_{i;s}} = \frac{C_{i;pe} V_{pe}}{C_{i;s} V_s}$$

Donde

- $n_{i,pe}$ = número de moles del analito i en la fase pseudoestacionaria
- $n_{i,el}$ = número de moles del analito i en el electrolito
- $C_{i,pe}$ = concentración molar del analito i , en la fase pseudoestacionaria
- $C_{i,el}$ = concentración molar del analito i , en el electrolito
- V_{pe} = volumen de la fase pseudoestacionaria
- V_e = volumen del electrolito

El factor de retención de analitos neutros puede ser calculado a partir de las movilidades de acuerdo con la siguiente ecuación (Ecuación 1.9):

Ecuación 1.9.-

$$k' = \frac{(\mu_{obs} - \mu_{eof})}{(\mu_{obs}^{mic} - \mu_{eof}^{mic}) - (\mu_{obs} - \mu_{eof})} = \frac{\mu_{eff}}{\mu_{ef}^{mic} - \mu_{ef}}$$

Donde

- μ_{obs} = movilidad electroforética de un analito neutro
- μ_{eof} = movilidad electroforética del EOF
- μ_{obs}^{mic} = movilidad electroforética de la micela
- μ_{eof}^{mic} = movilidad electroforética del EOF en la micela
- μ_{ef} = movilidad efectiva de un analito neutro
- μ_{ef}^{mic} = movilidad efectiva de la micela

La movilidad se calcula según (Ecuación 1.10)

Ecuación 1.10.-

$$\mu_{obs} = \frac{lL}{t_m V}$$

Para los analitos cargados se debe considerar, además de su interacción con la fase pseudoestacionaria, su propia movilidad según (Ecuación 1.11):

Ecuación 1.11.-

$$k' = \frac{\mu_{ef} - \mu_{ef}^{libre}}{\mu_{ef}^{mic} - \mu_{ef}}$$

Aditivos

Muchos aditivos han sido utilizados para mejorar la separación en MECK. La mayoría de los aditivos modifican la fase acuosa, aunque algunos pueden llegar a ser incorporados y modificar de manera simultánea la micela. Entre los aditivos más utilizados se encuentran los solventes orgánicos. La adición de solventes orgánicos, como metanol o acetonitrilo, aumenta la solubilidad de los analitos en la fase acuosa reduciendo el factor de retención. El efecto que produce el agregado de solventes orgánicos puede deberse a la saturación de los sitios de solubilización en la capa de Stern, la interacción específica entre el aditivo y el analito vía uniones puente hidrógeno, y la expansión del volumen del corazón de la micela por interacciones de tipo hidrofóbica entre los restos hidrocarbonados de las micelas y los aditivos (Katsuta, 1997).

Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CD) son los segundos aditivos más utilizados. Son oligosacáridos macrocíclicos unidos por enlaces α -1,4-glicosídicos y desde su descubrimiento por Villiers, han sido extensamente estudiadas en diversos campos. Entre ellas, las α -, β - y γ -CDs son los miembros más comunes, las cuales están compuestas de 6, 7 y 8 unidades de D-glucosa, respectivamente. La forma de cono truncado (estructura toroidal) presenta una cubierta exterior hidrofílica y una cavidad interior hidrofóbica capaz de albergar un amplio rango de moléculas orgánicas huéspedes (Escuder-Gilabert y col., 2014) (Figura 1.20).

Figura 1.20.- Estructura de la ciclodextrina



Las CDs nativas han sido químicamente modificadas por la inclusión de grupos cargados, segmentos hidrofílicos, residuos hidrofóbicos o unidades hidrofílicas e hidrofóbicas para modular sus propiedades fisicoquímicas y su capacidad de reconocimiento molecular. Las modificaciones químicas han contribuido a una significativa mejora en las propiedades fisicoquímicas y en la capacidad de enantio-

reconocimiento. Una primera clase de CD derivatizadas son las CDs neutras, como la heptakis (2,6-di-O-metil- β -CD) (DM-CD), heptakis (2,3, 6-tri-O-metil- β -CD) (TM-CD) e hidroxipropil- β -CD (HP-CD) (Matthijs y col., 2004). Las principales propiedades de las CDs nativas y sintéticas que explican sus extensas aplicaciones son: 1) formación de complejos reversibles hospedante-huésped, conocidos también como complejos supramoleculares; 2) reconocimiento selectivo de compuestos aquirales; 3) enantio-reconocimiento selectivo de enantiómeros de compuestos quirales y 4) baja toxicidad e inmunogenicidad, lo cual permite su uso como sistemas de transporte en sistemas vivos.

Las estrategias de separación más eficientes en EC se han logrado con CDs cargadas como selectores quirales, especialmente las CDs sulfatadas. Esto se debe a la ocurrencia de interacciones iónicas adicionales que contribuyen a su reconocimiento quiral. Las CDs cargadas, además, incrementan la diferencia de movilidad entre el analito libre y el complejo droga-analito que permite, potencialmente, una mejor resolución a bajas concentraciones de CDs (Matthijs y col., 2004). Las CDs altamente sulfatadas (HS-CD) en sus formas α , β y γ con un grado de sustitución de 11, 12 y 13, respectivamente han sido introducidas como isómeros simples o como mezclas de CD sulfatadas. La principal ventaja de estos selectores es que en EC se encuentran cargados negativamente a cualquier pH comúnmente usado y que migran en dirección opuesta al EOF (Rudaz y col., 2003). Dado su alto poder resolutivo y su posibilidad de separar racematos neutros, resultan interesantes (Matthijs y col., 2004). Estos selectores quirales han demostrado una gran habilidad para la separación enantiomérica de analitos ácidos, básicos y neutros y representan la primera opción cuando se requiere una evaluación rápida de moléculas quirales (Rudaz y col., 2003).

Las CDs, solas o en combinación con otras entidades químicas han probado ser útiles en todas las modalidades de la EC, principalmente para: 1) desarrollar métodos analíticos para la separación de compuestos quirales y aquirales y 2) estudiar y/o caracterizar la formación de complejos supramoleculares (Escuder-Gilabert L, 2014). Las ciclodextrinas son útiles en la separación de enantiómeros, incluyendo enantiómeros neutros en presencia de micelas. La cromatografía micelar electrocinética con utilización de ciclodextrinas es también efectiva en la separación simultánea de analitos altamente hidrofóbicos e isómeros posicionales de compuestos aromáticos (Schurig y

col., 1999). Una de las propiedades más importantes de las CDs es la formación de complejos con otras moléculas. En la mayoría de los casos, se asume la formación de complejos 1:1, pero otras estequiometrías son también posibles. La complejación usualmente involucra la inclusión de residuos hidrofóbicos de la molécula en la cavidad de la CD, con el desplazamiento de moléculas de agua. Las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas son las principales interacciones involucradas, así como, puentes de hidrógeno y factores estéricos. En el caso de los derivados iónicos de las CD, también existen interacciones electrostáticas. Se cree que la mayor parte de los complejos CD-analito son complejos de inclusión pero las CDs también pueden formar complejos externos dependiendo de la química y estructura de la CD y el medio en el cual se forman dichos complejos.

Entre las aplicaciones no quirales de las CDs, en el modo CD-EKC, el rol de la CD agregada al BGE es el de lograr resolución/selectividad. En CD-MEKC, la adición de CDs introduce un equilibrio adicional, reduce los tiempos de migración y mejora la selectividad. Más aún, se observa un descenso en la concentración micelar crítica del surfactante. La CD-EKC se ha vuelto una alternativa atractiva sobre las fases quirales de HPLC debido a las propiedades intrínsecas de ambos: EKC (alta eficiencia de separación, velocidad de análisis, bajo consumo de reactivos y bajos requerimientos de muestra) y CD (buena habilidad de enantio-reconocimiento, buena solubilidad en agua, transparencia al UV y amplia capacidad de interacción de las CDs neutras, catiónicas y aniónicas con diferentes grupos funcionales). En la CD-EKC, los enantiómeros son discriminados sobre la base de sus diferentes propiedades fisicoquímicas debido a la presencia de las CDs en el BGE. En consecuencia, la estructura de la CD permite la formación de complejos transitorios de diasterómeros con un par de enantiómeros que alcanzan el detector a diferentes velocidades debido a su diferente interacción intermolecular con la CD. El mecanismo de reconocimiento quiral ocurre a través de la inclusión de las partes lipofílicas del analito en la cavidad hidrofóbica de la CD. Las interacciones secundarias incluyen los puentes de hidrógeno, las interacciones dipolo-dipolo con grupos hidroxílicos u otros sustituyentes polares de las CDs. En el caso de CDs cargadas, las interacciones iónicas también contribuyen o incluso dominan el mecanismo de complejación (Escuder-Gilabert, 2014).

Sistemas duales

A fin de mejorar la selectividad y resolución, es posible asociar dos CDs con carga opuesta o una CD neutra y otra cargada, combinando así las propiedades de ambos selectores. El efecto sinérgico puede deberse al hecho de que las CDs por separado, poseen mecanismos enantio-selectivos de complejación con el analito independientes, presentan además diferentes movilidades electroforéticas y muestran, además, distinta afinidad frente al enantiómero. Es así que se han realizado estudios en los que se han combinado CDs neutras (DM-CD, TM-CD y HP-CD) con una HS-CD (*highly sulphated cyclodextrin*) (α , β y γ -HS-CD). Las HS-CD, además de su amplia habilidad de reconocimiento enantio-selectivo para una amplia variedad de compuestos, también poseen una movilidad propia que les permite separar compuestos no cargados. La principal desventaja de las CDs derivatizadas, que consiste en la variabilidad lote a lote, es despreciable para las HS-CD lo que favorece su utilización en el análisis de rutina (Matthijs y col., 2004). Es así que los sistemas duales son potencialmente aplicables a tres situaciones: 1) pueden mostrar enantioselectividad hacia compuestos para los cuales la aplicación de una sola CD no produjo separación; 2) mejorar la separación obtenida luego de la optimización inicial con una sola CD que no produce separación de línea de base y 3) mejorar la separación lograda con una sola CD, con línea de base resuelta, en donde se requiere un incremento en la resolución.

1.4.3. Electroforesis capilar en el análisis de los flavonoides

1.4.3.1. Antecedentes

El uso de los buffers borato para modificar la selectividad en EC es primeramente investigado por Wallingford y Ewing (1988) y luego se aplica al análisis de los carbohidratos. A semejanza de lo que ocurre en este caso, los métodos iniciales de EC para el análisis de flavonoides utilizan borato como electrolito de elección, dado que tiene la capacidad de complejar los grupos *cis*-1,2-OH vecinos presentes en dichas moléculas. Posteriormente, se ha postulado que la interacción puede tener lugar con el aglicón y/o el residuo glicosídico. Los iones borato forman complejos cargados y móviles de cinco partes (con 1,2-dioles) y de seis partes (con grupos 1,3-dioles), incrementando así la selectividad (Schmitt-Koplin y col., 1998). También se ha establecido por EC la ocurrencia de una interacción de tipo ión-dipolo o ión-dipolo inducido entre los flavonoides y el borato y se han utilizado como compuestos

marcadores la quercetina, isoramnetina, luteolina, luteolina-7-O-glicósido y apigenina (Luo y col., 2007). En este sentido, contribuciones muy importantes a la materia han sido realizadas por diferentes autores. Pietta y col. (1991) reportan el uso de la cromatografía electrocinética para la separación de flavonol-3-O-glicósidos en extractos de *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae), utilizando un sistema buffer borato y SDS. Posteriormente (Pietta y col., 1992), utilizan un sistema similar para la separación de flavonol-3-O-glicósidos en *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) y *Sambucus nigra* L. (Adoxaceae) y establecen una comparación con el método HPLC. Seitz y col. (1992) proponen el uso de la EC como una alternativa a las metodologías tradicionales (HPLC, TLC, GC e isotacoforesis) usadas hasta ese momento para el estudio de polifenoles. El sistema consiste en una electroforesis capilar zonal con buffer borato 150 mM, pH 10 y un capilar de 52 cm de largo y 50 μm de diámetro interno. Los compuestos analizados comprenden hesperidina, naringinina, rutina, isoquercitrina (quercetina-3-O-glicósido), hiperósido (quercetina-3-O-galactósido), quercitrina (quercetina-3-O-ramnósido), luteolina, ácidos ferúlico y cafeico. Utiliza rutina como estándar externo y lo aplica al análisis y la cuantificación de un extracto de *Sambucus nigra*. Pietta y col. (1994) reportan el estudio de la influencia de la estructura en el comportamiento de los flavonoides por cromatografía micelar electrocinética. En dicho trabajo, analizan el efecto de la concentración de borato, del pH y del SDS sobre la resolución de los glicósidos de los flavonoles quercetina, camferol e isoramnetina; de las flavonas luteolina y apigenina-7-O-glicósidos y de la flavanona naringenina-7-O-glicósido.

Morin y col. (1993a y b) presentan una serie de trabajos en los cuales se estudia la separación de los 7-O-glicósidos de flavonoides que difieren en el aglicón y de los 3-O-glicósidos de flavonoides que difieren en el residuo glicosídico, respectivamente. En el primero de ellos, el uso de SDS provee la interacción hidrofóbica necesaria para diferenciar los aglicones y, en el segundo análisis, el electrolito requiere la adición de borato al buffer alcalino para promover la complejación con los grupos *cis*-1,2 diol del residuo glicosídico. McGhie (1993) efectúa el análisis de flavonoides en caña de azúcar mediante el sistema de ECZ con un buffer borato a pH 9,5 y agregado de metanol. McGhie y Markham (1994) realizan un estudio sobre la separación de flavonoles por electroforesis capilar (ECZ) y el efecto de la estructura en la movilidad electroforética utilizando el mismo sistema del trabajo previo (McGhie, 1993). Otros investigadores que también utilizan el sistema ECZ con borato a pH alcalino para el análisis de los

flavonoides y glicósidos asociados son Zhang y col., (2007); Liu y col., (2008); Lee y col., (2012), entre otros. En los casos en que se requiere mejorar la resolución, se agregan modificadores orgánicos. El sistema borato-metanol para el análisis de glicósidos de flavonoides es propuesto por otros investigadores (Price y col., 1997; Marchart y col., 2003 a y b; Su-Hsiang y col., 2005; Caridi y col., 2007; Kočevár y col., 2008). El agregado de acetonitrilo al sistema borato tradicional es propuesto por Urbonavičiūtė y col., (2006), Do y col., (2012) y Luo y col., (2007).

Asimismo, las mezclas de fosfato-borato también se han utilizado para el estudio de los flavonoides en extractos de *Anaphalis margaritacea* (L.) Benth. & Hook. (Asteraceae). El sistema empleado consiste en un BGE de 25 mM borato y 10 mM fosfato a pH 9,5, permite la separación de flavonas, glicósidos de canferon, apigenina y quercetina, entre otros (Ren y col., 2009). También en el análisis de glicósidos de flavonoides y aglicones de *Flos Lonicerae* (*Lonicera japonica* Thumb. -Caprifoliaceae-) (Chen y col., 2005).

Morin y col. (1997) continúan sus estudios sobre la separación de flavonoides hidroxilados y metoxilados por MEKC, con el agregado de metanol como modificador orgánico al sistema borato-SDS. Dadáková y col. (2001 y 2010) utilizan un sistema similar para el estudio de quercetina, rutina, quercitrina, isoquercitrina, hiperósido y espireaósido.

En lo que respecta al uso de aditivos, las ciclodextrinas se encuentran entre las más utilizadas, con el fin de optimizar la resolución de compuestos y lograr la separación de enantiómeros. Guo y col (2004) estudian la formación de complejos no covalentes entre rutina y α , β y γ -CD nativas a través de espectrometría de masa (ESI-MS). Yu y col., (2007) investigan por ESI-FTICR-MS los tres complejos no covalentes de 3 glicósidos (hiperósido, quercitrina y rutina) con DM- β -CD. Jullian y col., (2007) estudian por RMN la formación del complejo entre la catequina y 3 CDs (β -CD, HP- β -CD y DM- β -CD). El agregado de CD al sistema MEKC da lugar al equilibrio de inclusión-complejación de los analitos en la cavidad de la CD, lo cual ocurre en forma simultánea con la partición en la micela de SDS (Gotti, 2011). La inclusión en la cavidad macrocíclica del monómero de SDS debe ser considerada como un evento adicional que afecta la habilidad de la separación en los sistemas combinados (Bendazzoli y col.,

2010). Yue y col., (2004) desarrollan un método con DM- β -CD y estudian la influencia del tipo de CD, concentración de SDS y agregado de modificadores orgánicos para el análisis de un extracto de *Hippophae rhamnoides* (L.) A. Nelson (Eleagnaceae). Cheung y col. (2008) desarrollan un sistema de buffer borato, β -CD y metanol para la separación, entre otros, de rutina y quercetina. Zhang y col., (2008) desarrollan un sistema borato-fosfato pH 8,8 y el agregado de β -CD para el estudio de catequina, epicatequina, canferol y quercetina, entre otros. Fan y col., (2010) desarrollan un sistema borato-SDS con agregado de γ -CD para la separación de 6 galatos de flavonoides.

1.4.3.2. Control de calidad de extractos vegetales y *fingerprinting*

Dada la complejidad de los extractos vegetales, un efectivo control de calidad plantea un desafío. Comprende la identificación de compuestos conocidos y desconocidos, el desarrollo de perfiles cromatográficos de los compuestos característicos y la identificación y detección de adulterantes. Tratándose de matrices complejas en las cuales la actividad no es responsabilidad de un único compuesto, generalmente, se seleccionan algunos marcadores como componentes farmacológicamente activos para evaluar la calidad y autenticidad de un extracto, para su identificación y eventual cuantificación. Este enfoque sin embargo, no brinda un panorama global dado que en general, hay múltiples componentes que resultan responsables de los efectos terapéuticos y actúan, a su vez, en forma sinérgica. También puede ocurrir que los componentes varíen de acuerdo con la época de recolección, hospedante, ubicación y procesos post-cosecha. Es por eso que debe determinarse la mayor cantidad posible de componentes para asegurar un efectivo control de calidad. En este sentido, la utilización de varias técnicas cromatográficas constituye una herramienta eficaz. Las técnicas tradicionales son TLC, HPLC y, en el caso de componentes volátiles, CG (cromatografía gaseosa) (Fan y col., 2006). A su vez, la posibilidad de asociar técnicas entre sí, como es el caso de HPLC-DAD, HPLC-MS (HPLC asociado a espectrometría de masa), EC-DAD y EC-MS (electroforesis capilar asociado a espectrometría de masa), expande significativamente la cantidad de información que es posible obtener de una sola corrida.

La determinación de perfiles (*fingerprinting*) asegura un control de calidad efectivo por medio de la construcción de marcas de reconocimiento específico (basados en datos analíticos).

1.5. Análisis estructural

1.5.1. HPLC-masa

Los flavonoides son parte de una mezcla compleja aislada de un extracto, lo cual hace necesaria su purificación para un análisis adecuado. Dado que la cantidad de extracto es habitualmente limitada, se prefieren las técnicas en línea, que poseen además la ventaja de posibilitar un análisis más rápido (Cuyckens y col., 2004). La cromatografía líquida asociada a la espectrometría de masa puede ser utilizada para una caracterización ulterior. Adicionalmente, puede ser empleada para determinar la ocurrencia de compuestos previamente identificados y de esta manera, minimizar el esfuerzo asociado a la separación. A este proceso de identificación en línea de compuestos conocidos (previamente identificados) para evitar su re-aislamiento se lo denomina des-replicación (Wolfender y col., 2000). Se ha demostrado que la combinación del espectro UV del compuesto de interés y el espectro de primer orden del ESI (*electrospray ionization*) pueden proveer información estructural útil y permiten una caracterización rápida de flavonoides, inclusive cuando los compuestos de referencia no se encuentran disponibles (Cuyckens y col., 2002).

En este caso particular, se utilizan columnas cortas de diámetro reducido para reducir los tiempos de análisis. Se emplean fases móviles con ácido fórmico por tratarse de un compuesto volátil, compatible con sistemas de LC/MS.

El instrumental utilizado es un analizador Q-TOF, cuya denominación es *Hybrid Quadrupole Orthogonal Time-of Flight Mass Spectrometry*, el cual combina la capacidad de escaneo de un cuadrupolo con el poder resolutivo de un analizador TOF (*time-of-flight*). Provee un espectro de alta calidad, informativo y simple que puede acoplarse a un espectrómetro de masa en tándem. Una de las mayores ventajas de los instrumentos Q-ToF es la habilidad de establecer una interface con ESI. Dentro de estas técnicas de ionización suave, en ESI (*electrospray ionization*) la muestra es disuelta en un solvente e introducida en el espectrómetro en forma de spray lo cual genera

principalmente iones moleculares en metabolitos relativamente pequeños, como son los flavonoides presentes en extractos (Wolfender y col., 2000).

En la primera etapa, se determinan iones moleculares mediante el proceso de fragmentación en la fuente. Luego, se aplica la espectrometría de masa en tándem, que se basa en el aislamiento de un m/z específico (ion precursor) que puede ser sujeto a disociación y subsecuente producción de fragmentos de iones (El-Aneed y col., 2009).

Además de proveer la masa exacta de los iones moleculares, los patrones de fraccionamiento observados por algunos métodos de MS pueden suministrar a) información estructural sobre la naturaleza del aglicón y sus sustituyentes (azúcares, acilación, etc), uniones interglicosídicas y posiciones de sustitución del aglicón y, hasta en algunos casos, c) información estereoquímica. ESI es actualmente, la técnica más comúnmente utilizada para analizar flavonoides polares y no volátiles (desde antocianinas hasta taninos condensados) principalmente debido a la facilidad en que puede ionizarlos. La técnica en modo positivo permite la detección del ión molecular como molécula protonada $[M+H]^+$, aducto $[M+Na]^+$ y causa solo fragmentación moderada de la molécula. La habilidad de ESI de trabajar con formas de introducción de la muestra en estado líquido la ha convertido en uno de los detectores más importantes acoplados al HPLC (Fossen y col., 2006).

1.5.2. RMN

La espectroscopia RMN es una excelente herramienta analítica para la determinación de las estructuras de los flavonoides. Hoy en día, es posible realizar las asignaciones completas de todas las señales de los protones y carbonos en el espectro RMN de la mayoría de los flavonoides aislados en el orden del miligramo. Estas asignaciones están basadas en los desplazamientos (δ) y constantes de acoplamiento (J) observadas en los espectros 1D de 1H y ^{13}C combinados con las correlaciones observadas en los experimentos 2D RMN homo y hétero nucleares. El propósito de un experimento 1H RMN es registrar los desplazamientos químicos, los acoplamientos spin-spin, y datos de integración, para proveer información sobre el número relativo de átomos de hidrógeno. Aplicada a los flavonoides, esta información puede ayudar en la identificación del aglicón y los grupos acilo, el número de monosacáridos y la configuración anomérica de los monosacáridos. Sin embargo, la información suministrada por un experimento 1H

RMN es insuficiente para completar la elucidación estructural. En consecuencia, experimentos ^{13}C RMN combinados con 2D RMN deben usarse para la asignación de todas las señales de ^1H y ^{13}C . Los espectros 2D RMN (principalmente visualizados como mapas de contorno) son producidos por experimentos homonucleares y heteronucleares.

Los experimentos homonucleares, tales como COSY y TOCSY, generan espectros en los cuales los desplazamientos de H en dos ejes se correlacionan unos con otros. ^1H - ^1H COSY (*correlation spectroscopy*) permite la determinación de acoplamientos spin-spin, y el espectro muestra la correlación entre protones vecinos. ^1H - ^1H TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) identifica protones que pertenecen al mismo sistema de spin. Dado que cada anillo de azúcar contiene un sistema discreto de spin separados por oxígeno, este experimento es especialmente útil para la asignación de protones superpuestos en espectro de 1D ^1H RMN de glicósidos de flavonoides. Entre los experimentos heteronucleares ^1H - ^{13}C se cuentan principalmente HSQC y HMBC. El HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) es un experimento bidimensional que correlaciona el núcleo de ^{13}C con el núcleo del ^1H separados por un enlace de distancia. El HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*) correlaciona el núcleo de un ^1H con el núcleo de ^{13}C separados por más de un enlace de distancia.

Los solventes más utilizados para el análisis de flavonoides son el hexadeuterodimetilsulfóxido (DMSO- d_6) y tetradeuterometanol (CD_3OD). La elección del solvente depende de la solubilidad del analito, la temperatura del experimento de RMN, la viscosidad del solvente y cuán fácilmente puede ser recuperado el flavonoide luego del análisis (Fossen y col., 2006).

DOSY

La identificación de sustancias previa a su separación en extractos vegetales agrega una gran eficiencia a la química de los productos naturales. La espectroscopia de difusión (DOSY: *diffusion ordered spectroscopy*) es una técnica de gradiente de pulso ampliamente utilizada que tiene por objetivo separar los componentes espectrales de una muestra en virtud de los diferentes comportamientos de difusión de las especies moleculares involucradas (Botana y col., 2011). El coeficiente de difusión (D) depende del peso molecular, forma y tamaño y puede proveer información sobre la dinámica

molecular, incluyendo interacciones intermoleculares, cambios conformacionales y de agregación. Dado que el propósito de esta técnica es la separación de los componentes de una mezcla, muchos investigadores se refieren a ella como cromatografía RMN o cromatografía de spines. Ha sido empleada con éxito en la identificación de componentes en la fracción acetato de etilo de un extracto etanólico compuesto de las partes aéreas de *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch. Bip (Asteraceae) (Rodrigues y col., 2009).

HIPÓTESIS

La electroforesis capilar es una metodología efectiva para el control de calidad de los extractos de *Ligaria cuneifolia* por medio de la generación de *fingerprints* o marcas específicas de reconocimiento.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Proceder al aislamiento, la identificación y la caracterización de los flavonoides presentes en *L. cuneifolia*
- Estudiar la variación en el perfil de los flavonoides mediante la electroforesis capilar
- Evaluar la actividad antioxidante en los extractos de *L. cuneifolia*

Objetivos específicos

- Realizar un estudio poblacional mediante el análisis de la variación en los perfiles de los flavonoides de la fracción acetato de etilo de acuerdo con la parte estudiada y el hospedante por medio de distintas técnicas cromatográficas.
- Desarrollar una metodología analítica por electroforesis capilar para el estudio de los flavonoides presentes en la fracción acetato de etilo
 - Comparar los perfiles obtenidos con el método por HPLC.
 - Desarrollar un método de control de calidad mediante la construcción de *fingerprints* característicos (perfiles cromatográficos que sirven como marcas de reconocimiento específico).
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* mediante métodos espectrofotométricos (ABTS y DPPH). Complementariamente, evaluar la capacidad antioxidante en homogeneizados de tejido y ADN e *in vivo*, en piel.
- Evaluar y monitorear la actividad antioxidante a través de una metodología por electroforesis capilar.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

2.1.1 Recolección

La recolección de los ejemplares de *L. cuneifolia* se realizó en la localidad de Barreal, departamento de Calingasta, provincia de San Juan (1.478 ms.n.m. 31°28'S - 69°25' O).

Los hospedantes fueron *Prosopis flexuosa* D.C., *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz emend. Burkart (Fabaceae, subf. Mimosoidea) y *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart (Fabaceae). Sobre estos ejemplares se realizaron los principales ensayos de aislamiento, identificación y caracterización de los flavonoides.

También se trabajó con una muestra comercial de la provincia de San Juan cuyos hospedantes fueron *Prosopis flexuosa* D.C., *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz emend. Burkart (Fabaceae, subf. Mimosoidea) y *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart (Fabaceae).

A fines comparativos, se efectuó una recolección de ejemplares en la provincia de Catamarca en la localidad de Puerta de San José, Departamento de Belén (1450 ms.n.m. 27°33' S - 67°01' O). Los hospedantes analizados fueron *Olea europea* L. (Oleaceae) (“olivo”), *Bulnesia retama* (Gillies ex Hook. & Arn.) Griseb. (Zygophyllaceae) (“retamo”) y leguminosas tales como *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz (“algarrobo”), y *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart (“chañar”).

Figura 2.1.- Zona de recolección de ejemplares en Barreal, San Juan

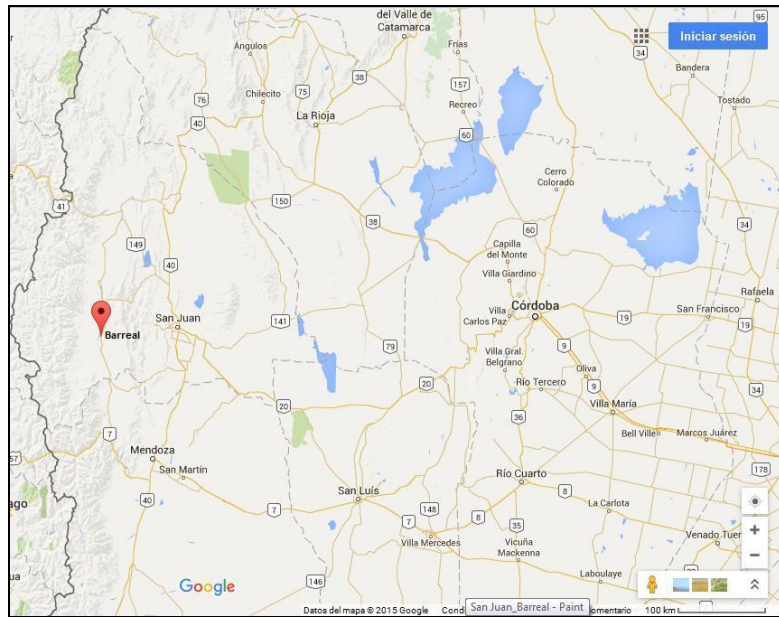
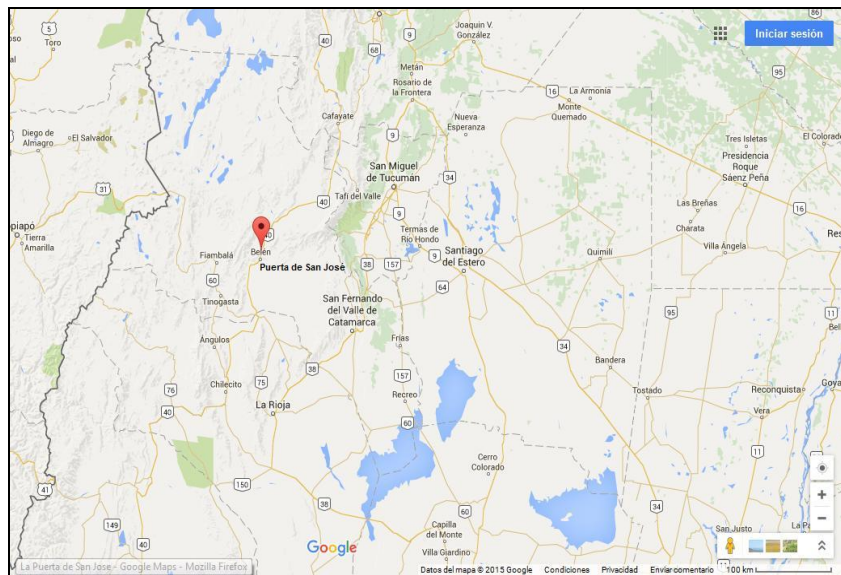


Figura 2.2.- Zona de recolección de ejemplares en Belén, Catamarca



2.1.2. Identificación del material recolectado

Las muestras recolectadas fueron identificadas como *Ligaria cuneifolia* por medio de claves adecuadas y por comparación con material de herbario. Los ejemplares fueron depositados en el herbario del Museo de Farmacobotánica “Juan A. Domínguez” (BAF).

2.1.3. Muestreo y separación del material en estudio

El muestreo fue representativo de las áreas de distribución natural, durante las épocas de floración y post-floración (entre octubre y noviembre), en estadios fenológicos específicos. Se recolectó material silvestre y una muestra comercial de la provincia de San Juan. Las partes analizadas incluyeron hojas y tallos herbáceos. En el caso de las muestras de Catamarca, se utilizó la planta entera. Las muestras fueron recolectadas durante 2013 y 2014.

2.1.4. Acondicionamiento

El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente. La molienda se realizó utilizando un molino a cuchillas, a un tamaño de partícula no mayor a 5 mm. Las muestras se pesaron y se acondicionaron en envases rotulados.

2.2. Obtención de los extractos

Equipos y solventes utilizados

- Molino a cuchillas IKA A11 Basic
- Agitador orbital M23 Vicking
- Evaporador rotatorio marca Berlusconi y Rocca
- Baño calefactor DeCalab
- Hexano, metanol y diclorometano calidad p.a.

Procedimiento

Se tomó una muestra representativa debidamente desecada y molida de hojas y tallos herbáceos de *Ligaria cuneifolia*, de aproximadamente 50 g cada una. Se realizó una limpieza del material para eliminar grasas y clorofilas con hexano y diclorometano. Se procedió al lavado con hexano en alícuotas de 500 ml y agitación periódica durante 24 horas. Esta operación se repitió 3 veces. Luego, se realizaron lavados con diclorometano, en alícuotas de 500 ml, con agitación constante, durante 24 horas y

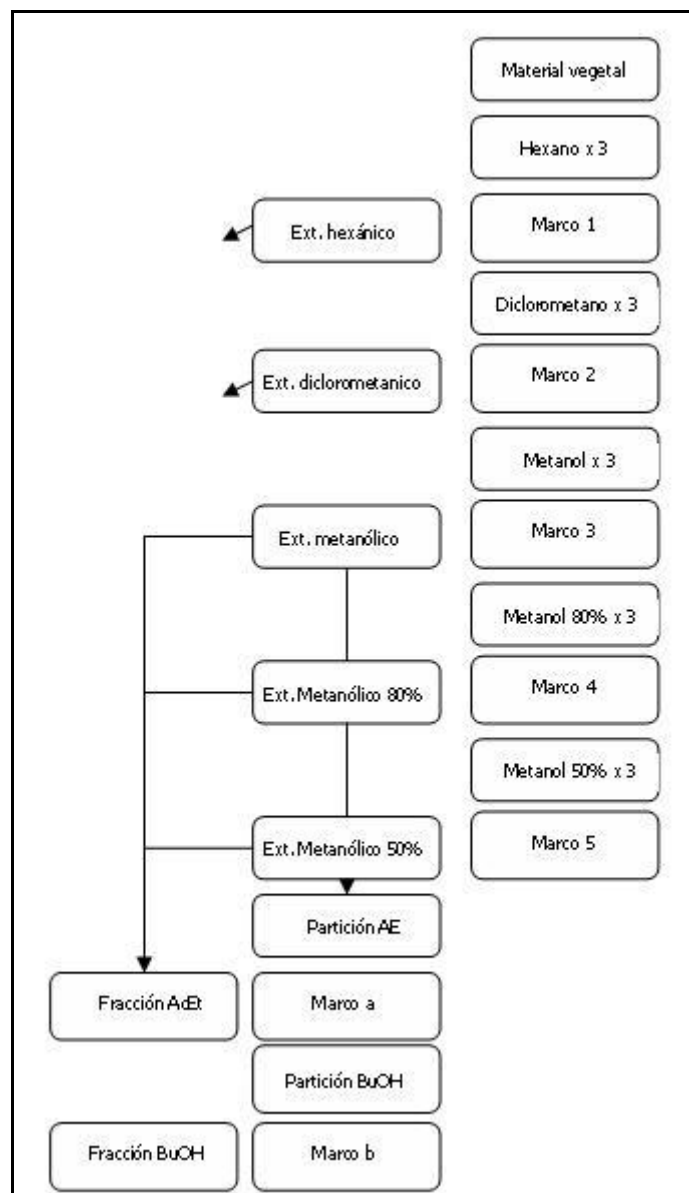
reiterando la operatoria en 3 ocasiones. Posteriormente, el material fue sometido a extracciones sucesivas con mezclas de metanol-agua (100 %, 80 % y 50 %), siempre repitiendo la operación 3 veces para cada mezcla, en alícuotas de 500 ml y con agitación constante durante 24 horas, de manera de asegurar el agotamiento del material. El solvente orgánico fue eliminado mediante el evaporador rotatorio y las fracciones acuosas se reunieron para realizar particiones ulteriores con acetato de etilo y butanol. Las particiones con acetato de etilo se realizaron en alícuotas de 50 ml y se repitieron hasta observar un color claro. A continuación, se procedió a realizar una operatoria similar con la fracción butanólica. Al finalizar el procedimiento se obtuvieron entonces 3 fracciones: acetato de etilo, butanólica y acuosa.

En los 3 casos se procedió a eliminar el solvente orgánico mediante evaporador rotatorio y el residuo obtenido se pesó y se conservó en recipiente adecuado y a 4° C para futuros ensayos. Los estudios que a continuación se detallan, se centrarán sobre la fracción acetato de etilo.

A efectos comparativos en lo referente al perfil de flavonoides, también se analizaron las fracciones acetato de etilo individuales obtenidas a partir de metanol puro y de las mezclas MeOH-agua 80 % y 50 %, respectivamente.

En la figura 2.3 se detalla el procedimiento realizado.

Figura 2.3.- Esquema del procedimiento de extracción



En la tabla 2.1 se presenta el detalle de las muestras utilizadas en los estudios posteriores.

Tabla 2.1.- Esquema de las muestras analizadas

Región	San Juan					Catamarca				
Muestra comercial	Material colectado					Material colectado				
Hospedante	<i>Prosopis</i> y <i>Geoffroea</i>		<i>Prosopis</i> y <i>Geoffroea</i>			Chañar	Algarrobo	Olivo	Retama	
Parte usada	Hoja		Hoja		Tallo	Planta entera				
Extracto	MeOH 100 %	MeOH comb.	MeOH 100 %	MeOH 80 %	MeOH 50 %	MeOH comb	MeOH 100 %	MeOH 100 %	MeOH 100 %	MeOH 100 %
Fración	AE		AE	AE	AE	AE				

MeOH: metanol. AE: acetato de etilo. MeOH combinado-AE: extracciones sucesivas sobre la misma muestra con MeOH y mezclas de metanol:agua al 80 % y 50 % y posterior partición con acetato de etilo.

2.3. Determinación del contenido de polifenoles

2.3.1. Fenoles totales

Se realizó de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu (Makkar y col., 1993).

Reactivos y soluciones de trabajo

- Soluciones de trabajo
 - Fracción acetato de etilo: 1 mg/ml en metanol.
 - Extractos metanólicos: 1 mg/ml en metanol.
- Reactivo Folin-Ciocalteu (1N): diluir el reactivo comercial de Folin-Ciocalteu (2N) con igual volumen de agua destilada. Transferir a un frasco color caramelo para proteger de la luz y almacenar a 4 °C. Debe ser color dorado.
- Solución de carbonato de sodio al 20 %.
- Solución stock de ácido gálico (10 mg/ml) en metanol
 - Diluciones: 0,1; 0,5 y 1,0 mg/ml

Procedimiento

Se realizó una curva de calibración con ácido gálico.

Muestras

Se tomaron alícuotas apropiadas de la solución de extracto. Se llevó a 0,5 ml con agua destilada. Luego, se agregaron 0,25 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu y posteriormente, 1,25 ml de solución de carbonato de sodio al 20%.

Los tubos se agitaron en vórtex y luego de una incubación de 40 minutos, se leyó la absorbancia a 725 nm.

Por interpolación en la recta correspondiente a la curva de calibración, se determinaron los μg de ácido gálico presentes en la alícuota de extracto. Luego se refirió esta masa a los mg de extracto utilizados para preparar la solución. El resultado se expresa como mg de ácido gálico/100 mg de extracto.

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Tuckey ($p < 0,05$).

2.3.2. Taninos condensados (o proantocianidinas)

De acuerdo con el método de Porter y col. (1986)

Reactivos y soluciones de trabajo

- Butanol-HCl (butanol-HCl 95:5 v/v): mezclar 950 ml de butanol con 50 ml de HCl concentrado (37 %).
- Reactivo férrico (2 % de sulfato férrico amónico en HCl 2 N): tomar 16,6 ml de HCl concentrado y llevar a 100 ml con agua destilada (HCl 2 N). Disolver 2,0 g del sulfato férrico amónico en ese volumen de HCl 2 N. Conservar en frasco color caramelo.
- Soluciones de trabajo
 - Fracción acetato de etilo: 1 mg/ml en metanol.
 - Extractos metanólicos: 1 mg/ml en metanol.

Procedimiento

En un tubo de ensayo, se pipetearon 0,50 ml de solución de trabajo y cuando fue necesario, se agregó acetona al 70 % para que el valor de absorbancia no exceda de 0,6. Luego, se agregaron 3,0 ml del reactivo Butanol-HCl y 0,1 ml del reactivo férrico. Se agitó en vórtex los tubos, se taparon, se agregaron perlas de vidrio y se colocaron en baño de agua hirviendo durante 60 min. Se enfriaron los tubos y se registró la absorbancia (A) a 550 nm. Se realizó un blanco que consistió en la mezcla sin calentar. El resultado se expresó como absorbancia/ mg de extracto.

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Tuckey ($p < 0,05$).

2.3.3. Flavonoides totales

De acuerdo con la técnica de Ho y col. (2012).

Reactivos y soluciones de trabajo

- Etanol 96 %
- Solución acuosa AlCl₃ 10 %
- Solución acuosa NaAc 1 M
- Soluciones de trabajo
 - Fracción acetato de etilo: 1 mg/ml en metanol.
 - Extractos metanólicos: 1 mg/ml en metanol.

Procedimiento

Se realizó una curva de calibración utilizando una solución estándar de rutina.

Se tomó una alícuota apropiada de muestra. Luego, se agregaron 1500 µl de etanol 96 %, 100 µl de AlCl₃ 10 % acuoso luego, 100 µl NaAc 1 M acuoso y por último, 3200 µl de agua destilada. Se dejó reposar 30 min y se leyó la A de 416 nm.

El resultado se expresó como mg rutina/100 mg de extracto.

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Tuckey ($p < 0,05$).

2.3.4. Ácidos hidroxicinámicos

Se aplicó el procedimiento indicado por Dao y Friedman (1992), con las modificaciones propuestas por Ricco y col. (2011).

Reactivos y soluciones de trabajo

- Etanol anhidro
- Soluciones de trabajo
 - Fracción acetato de etilo: 1 mg/ml en metanol.
 - Extractos metanólicos: 1 mg/ml en metanol.

Procedimiento

Se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico.

Se utilizaron alícuotas apropiadas de muestra y se completó a 2000 µl con etanol anhidro.

Los valores se expresaron como mg de ácido clorogénico/100 mg de extracto

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Tuckey ($p < 0,05$).

2.3.5. Taninos totales

Se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Makkar y col., 1993), luego de remover los taninos mediante su precipitación con seroalbúmina bovina (BSA).

Reactivos y soluciones de trabajo

- Seroalbúmina bovina (BSA): buffer acetato 0,2 M pH 5,0; cloruro de sodio 0,17 M y 1,0 mg/ml de fracción V de BSA (Ricco y col. 2011).
- Soluciones de trabajo
 - Fracción acetato de etilo: 1 mg/ml en metanol.
 - Extractos metanólicos: 1 mg/ml en metanol.
- Reactivo Folin-Ciocalteu (1 N): diluir el reactivo comercial de Folin-Ciocalteu (2 N) con igual volumen de agua destilada. Transferir a un frasco color caramelo para proteger de la luz y almacenar a 4 °C. Debe ser color dorado.
- Solución de carbonato de sodio al 20 %
- Solución stock de ácido gálico (10 mg/ml) en metanol
 - Diluciones: 0,1; 0,5 y 1,0 mg/ml

Procedimiento

A 1 ml de solución de BSA se le adicionó 1 ml de la solución de trabajo. Luego de 15 minutos a temperatura ambiente, los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm. Alícuotas del sobrenadante fueron analizadas según el procedimiento detallado para fenoles totales. Los valores obtenidos fueron restados de los correspondientes a los fenoles totales, de esta manera se obtuvo el valor de los fenoles que se comportan como taninos (taninos totales). El contenido de taninos totales fue expresado como mg de ácido gálico/100 mg de extracto.

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Tuckey ($p < 0,05$).

2.4. Estudio de los flavonoides

2.4.1. Cromatografía en capa delgada (TLC)

2.4.1.1. Flavonoles

Glicósidos de flavonoles

Reactivos, materiales y equipos

- Cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄, de 20 x 20 cm y 0,2 mm de espesor Merck
- Cromatofolios de celulosa Polygram Cel300 de 20 x 20 cm (100 µm) Analtech
- Papel Whatman 3MM Sigma-Aldrich
- Butanol, ácido acético glacial (AcH), ácido fórmico, acetato de etilo calidad p.a.
- Lámpara CAMAG
- Reactivo de Productos Naturales (NP) (Wagner y Bladt, 1996): se compone del éster formado por ácido difenilbórico y etanolamina al 1% en etanol. Luego de pulverizar la placa con el reactivo, se seca bajo corriente de aire caliente y se observa a luz visible y 366 nm.
- Testigos: quercetina-3-O-ramnósido de Extrasynthese (Lyon, Francia). Rutina, catequina, quercetina, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina 3-O-arabinofuranósido de Sigma-Aldrich Corp. (St Louis, EE.UU).

Ensayos realizados

Se realizó el perfil cromatográfico por TLC de la fracción acetato de etilo mediante una cromatografía bidimensional.

Fase estacionaria: Celulosa Polygram Cel300

Fase móvil: Butanol-AcH-agua (6:1:2) (primera dimensión); AcH 15 % (segunda dimensión) (Mabry y col. 1970).

Muestra: fracción acetato de etilo (“MeOH combinado-AE”) de la muestra proveniente de San Juan (hoja) 10 mg/ml en metanol.

Volumen de siembra: 5 µl

Detección: UV 254 y 366 nm.

Revelador: NP y visualización UV 366 nm.

Se estudió el efecto de la polaridad del solvente en la separación de los compuestos.

Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

Fase móvil: AcH 6 %, 15 % y 30 %.

Detección: UV 254 y 366 nm.

Revelador: NP y visualización UV 366 nm.

Los mejores resultados se obtuvieron con AcH 15 %, el que se utilizó para la separación de los flavonoles.

Se realizó la cromatografía unidireccional en donde se compara la fracción “MeOH combinado-AE” con quercetina y diferentes glicósidos de quercetina.

A su vez, se compararon las muestras de San Juan (hoja y tallo) obtenidas a partir de las extracciones con metanol y combinaciones de metanol-agua al 80 % y 50% con los extractos metanólicos de los ejemplares procedentes de Catamarca sobre distintos hospedantes (“chañar”, “algarrobo”, “retama” y “olivo”) y el extracto metanólico de la muestra comercial de San Juan.

Fase estacionaria: sílica gel 60 F₂₅₄

Fase móvil: acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético glacial - agua (100:11:11:26) (Wagner y Bladt, 1996).

Testigos: rutina, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido, quercetina-3-O-ramnósido, quercetina (todos ellos en concentración 1 mg/ml en metanol).

Muestras: fracción “MeOH combinado-AE” (hoja y tallo), fracción acetato de etilo MeOH 80 % y 50 % (hoja), todos en concentración 10 mg/ml en metanol. Extractos metanólicos de las muestras procedentes de Catamarca sobre distintos hospedantes (“chañar”, “algarrobo”, “retama” y “olivo”) y la muestra comercial de San Juan, todos en concentración 20 mg/ml en metanol.

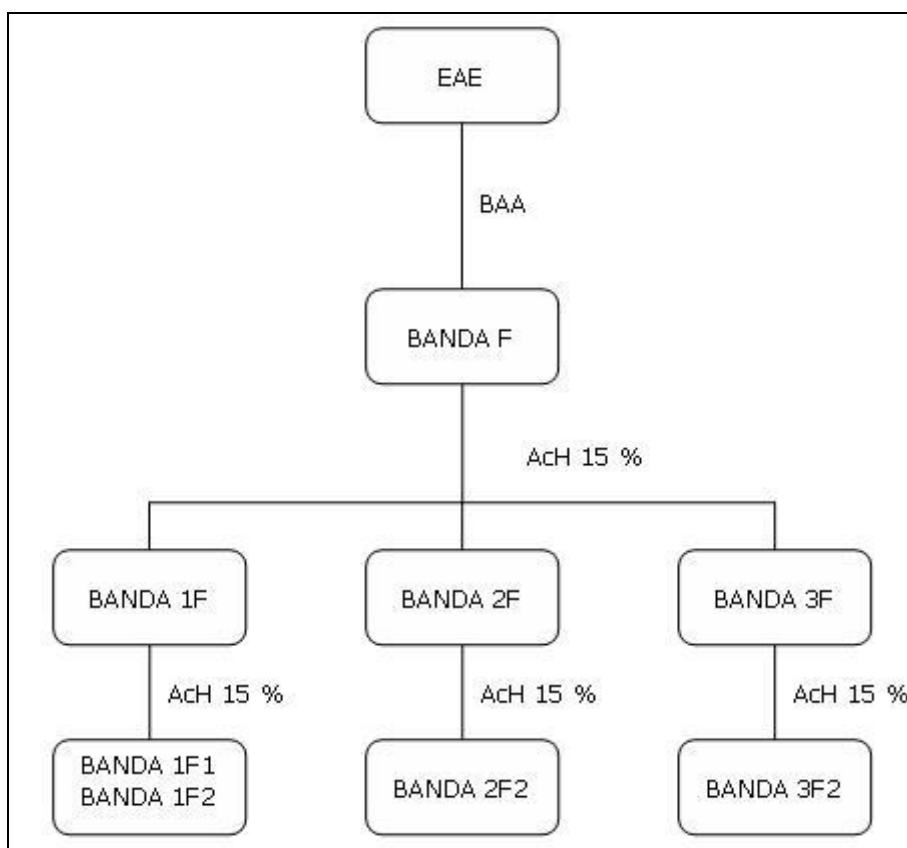
Volumen de siembra: 5 µl

Detección: UV 254 y 366 nm.

Revelador: NP y visualización UV 366 nm.

De los resultados obtenidos, se eligió la combinación de fases móviles para el aislamiento y purificación de los flavonoles. Se procedió a la separación de los compuestos de interés a partir de la fracción “MeOH combinado-AE” (hoja) por medio de la cromatografía descendente en papel, tal y como se detalla en la figura 2.4.

Figura 2.4.- Aislamiento de los compuestos de interés



Fase estacionaria: papel Whatman 3MM

Fase móvil: butanol-ácido acético-agua (6:1:2)

Muestra: fracción “MeOH combinado-AE” (hoja) en concentración 0,1 g/ml en metanol.

Volumen de siembra: 0,5 ml

Detección: UV 254 y 366 nm.

Se realizó una cromatografía en papel Whatman 3MM y se corrió en forma descendente en el sistema BAA. La banda obtenida (F) se recortó, eluyó con metanol y se concentró. La solución resultante se sembró en papel Whatman 3MM y se corrió en forma descendente en AcH 15 %.

Fase estacionaria: papel Whatman 3MM

Muestra: concentrado de la banda correspondiente a los flavonoles

Volumen de siembra: 0,5 ml

Fase móvil: AcH 15 %.

Detección: UV 254 y 366 nm.

Se obtuvieron así 3 bandas (1F, 2F y 3F) que fueron sucesivamente purificadas por cromatografía descendente en AcH 15 % hasta obtener 4 bandas principales (1F1, 1F2, 2F2 y 3F2). Las bandas así obtenidas se sometieron a estudios posteriores. Se compararon con la fracción “MeOH combinado-AE” (hoja) y los testigos de quercetina y glicósidos de quercetina.

Fase estacionaria: sílica gel 60 F 254

Fase móvil: acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26)

Testigos: rutina, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido, quercetina-3-O-ramnósido, quercetina (todos ellos en concentración 1 mg/ml en metanol).

Muestras: fracción “MeOH combinado-AE” (hoja) en concentración 10 mg/ml en metanol. Solución concentrada de las bandas 1F1, 1F2, 2F2 y 3F2.

Volumen de siembra: 5 µl.

Detección: UV 254 y 366 nm.

Revelador: NP y visualización UV 366 nm.

Las 4 bandas se sometieron a una hidrólisis para investigar la naturaleza de la aglicona y el azúcar asociado.

Aglicona

Reactivos

- Ácido clorhídrico 2 N
- Acetato de etilo
- Metanol
- BAA: butanol-ácido acético- agua (6:1:2)
- CAA: cloroformo-ácido acético-agua; (2:1, se agrega agua hasta saturación)
- Forestal: ácido clorhídrico-ácido acético-agua (3:30:10)

Soluciones de trabajo

A una alícuota de la solución del compuesto de interés se agregaron 5 ml de ácido clorhídrico 2 N. La solución permaneció en ebullición durante 60 minutos en baño María (Mabry y col. 1970).

Al finalizar, se filtró por papel y se extrajo el aglicón con pequeñas porciones de acetato de etilo. Posteriormente, ésta se llevó a sequedad y se redisolvió el aglicón en metanol (Harborne, 1994; Markham, 1982).

Se determinaron los valores de Rf frente a testigo de quercetina.

Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

Fases móviles: butanol-ácido acético-agua (6:1:2); cloroformo-ácido acético-agua (2:1, agua hasta saturación); ácido clorhídrico-ácido acético-agua (Forestal) (3:30:10).

Azúcares

Reactivos, materiales y solventes

- Cromatofolios de sílica gel 60 (Merck), 20 x 20 cm
- Butanol, ácido acético, éter etílico, ácido láctico
- Solución 0,5 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Testigos de azúcares: glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa y arabinosa. Se prepararon soluciones acuosas de concentración 1 mg/ml.
- Reveladores
 - Anisaldehído-ácido sulfúrico: 0,5 ml de anisaldehído + 9 ml de etanol 95% + 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado + 0,1 ml ácido acético (AcH).
 - Anilina-difenilamina: 1 ml de solución de anilina + 1 g de difenilamina + 7 ml de ácido fosfórico 85 % + 50 ml acetona.

Procedimiento

La fracción acuosa remanente de la partición con acetato de etilo (producto de la hidrólisis) se redujo a volumen en evaporador rotatorio y se efectuaron lavados con agua para eliminar el ácido clorhídrico remanente. La alícuota resultante se utilizó para el análisis del residuo glicosídico.

Se ensayaron distintos sistemas para la determinación de azúcares. Se utilizaron dos sistemas cromatográficos. En todos los casos se trabajó con las mismas soluciones de testigos y muestras y los volúmenes de siembra fueron de 10 μl y 50 μl , respectivamente.

Sistema 1 (Ikan, 1991)

Fase estacionaria: cromatofolio de sílica gel 60

Fase móvil: butanol-ácido acético-éter etílico:agua (9:6:3:1)

Volumen de siembra: para los testigos, 10 μl y 50 μl para las muestras

Reveladores: anisaldehído-ácido sulfúrico y anilina-difenilamina

Sistema 2 (Kremer, 1978)

Fase estacionaria: cromatofolio de sílica gel 60 pretratada con una solución 0,5 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Fase móvil: acetona-isopropanol-ácido láctico (40:40:20)

Volumen de siembra: para los testigos, 10 μl y 50 μl para las muestras

Revelador: anisaldehído-sulfúrico

Ácido gálico (Sawant, 2010)

Se estudió la presencia de ácido gálico en los hidrolizados de las bandas purificadas.

Fase estacionaria: sílica gel 60

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico-metanol (30:30:8:2)

Muestras: hidrolizado de las bandas 1F1, 1F2, 2F2 y 3F2 y testigo de ácido gálico (1 mg/ml).

Detección: UV 254 y 366 nm.

Revelador: reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N

2.4.1.2. Taninos condensados (o proantocianidinas)

Reactivos, materiales y solventes

- Cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄, de 20 x 20 cm y 0,2 mm de espesor Merck
- Cromatofolios de celulosa Polygram Cel300 de 20 x 20 cm (100 μm) Analtech

- Butanol, n-propanol, ácido acético glacial (AcH), ácido fórmico, acetato de etilo calidad p.a.
- Vainillina/HCl: se utilizó una solución de vainillina al 1 % en etanol y al momento del uso se realizó una mezcla al 1% con HCl concentrado.
- Testigos de catequina y procianidina B2 (PB2): ambas de Sigma-Aldrich, en soluciones de concentración 1 mg/ml.

En los cromatogramas de los extractos y las fracciones obtenidos de las hojas y los tallos de *Ligaria cuneifolia*, al ser tratados con el reactivo vainillina clorhídrico, se observaron manchas de color rojo que corresponden a las proantocianidinas. Se utilizaron sistemas bidimensionales y unidireccionales.

Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

Fase móvil: butanol-ácido acético-agua (6:1:2) (primera dimensión) y AcH 15 % (segunda dimensión)

Muestras: fracción “MeOH combinado AE” 10 mg/ml

Volumen de siembra: 5 µl

Revelador: vainillina/ácido clorhídrico

Se estudió el efecto de la polaridad del solvente en la separación de los compuestos.

Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

Fase móvil: ácido acético al 6 %, 15 % y 30 %

Muestra: fracción “MeOH combinado-AE”

Revelador: vainillina/ácido clorhídrico

Se realizó la identificación de la catequina en la fracción “MeOH combinado-AE” frente a testigo de catequina y el dímero proantociandina B2 (PB2) y se utilizaron diferentes sistemas:

Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

Fase móvil:

n-propanol-agua-ácido acético (20:80:1)

n-propanol-agua (20:80)

butanol-agua-ácido acético (4:2:1)

n-propanol-agua-ácido acético (4:2:1)

Muestra: fracción “MeOH combinado-AE” 10 mg/ml

Volumen de siembra: 5 μ l

Revelador: vainillina/ácido clorhídrico

Se realizó una cromatografía bidimensional para mostrar la ubicación de la catequina y otras proantocianidinas de mayor peso molecular.

Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

Fase móvil: butanol-AcH-agua (14:1:5) (primera dimensión); AcH 6 % (segunda dimensión)

Muestra: fracción “MeOH combinado-AE” 10 mg/ml

Volumen de siembra: 5 μ l

Revelador: vainillina/ácido clorhídrico

Se realizó una comparación entre las fracciones acetato de etilo de San Juan y los extractos metanólicos de Catamarca.

Fase estacionaria: sílica gel 60 F₂₅₄

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26)

Muestras: fracción “MeOH combinado-AE” (hoja y tallo), fracción acetato de etilo MeOH 80 % y 50 % (hoja), todos en concentración 10 mg/ml en metanol. Extractos metanólicos de las muestras procedentes de Catamarca sobre distintos hospedantes (“chañar”, “algarrobo”, “retama” y “olivo”) y la muestra comercial de San Juan, todos en concentración 20 mg/ml en metanol.

Volumen de siembra: 5 μ l.

Revelador: vainillina/ácido clorhídrico

2.4.2. Electroforesis capilar (EC)

Equipos y solventes

- Equipo de electroforesis capilar Beckman P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA) acoplado a un detector de arreglo de diodos.
- Capilares de sílica fundida (Microsolv technology, Eatontown, NJ, USA) de 60 cm largo (50 cm al detector) y 75 μm de diámetro interno.
- Ciclodextrinas: β -CD, γ -CD, 2-Hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD), Heptakis (2,6-di-O-metil)- β -CD, Heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- β -CD, β -CD sulfatada, todas de Sigma-Aldrich Corp. (St Louis, EE.UU).
- Metanol, tetrahidrofurano, acetonitrilo calidad HPLC.
- Tetraborato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS) calidad p.a.
- Estándares de referencia: quercetina-3-O-ramnósido de Extrasynthese (Lyon, Francia). Rutina, catequina, quercetina, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina 3-O-arabinofuranósido de Sigma-Aldrich Corp. (St Louis, EE.UU).

Desarrollo del método y optimización del sistema electroforético

Las variables ensayadas se detallan en la tabla 2.2 y se aplicaron al electrolito, el equipo y las muestras.

Tabla 2.2.- Variables estudiadas para el desarrollo del método

Electrolito (BGE)				Equipo				Muestras
Buffer	pH	Aditivos		Voltaje	Volumen inyección	Corrida	Temperatura	Diluyente
		Solventes orgánicos	CDs					
Borato 20, 25 y 30 mM	7; 8,3; 9 y 10	ACN (5 – 15%) , MeOH (5 – 10%), THF (2,5 – 5%) Combinaciones ACN:MeOH; ACN:THF y MeOH:THF	β-CD (2,5; 5; 7,5 y 10 mM) γ-CD (5 mM) HP-β-CD (5 mM) DM-β-CD (2,5 y 5 mM) TM-β-CD (5 mM) β-CD-sulfatada (0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mM) Combinaciones β-CD+HP-β-CD DM-β-CD+β-CD β-CD+β-CD-sulf	20 y 25 kV	2 y 3 segundos; 0,3 psi 5 segundos 0,5 psi	Con (0,1 psi) y sin presión	20 y 25° C	Buffer borato 20 mM pH 7 diluído 1/10 Buffer borato 20 mM pH 8,3 diluído 1/10 Buffer borato 20 mM pH 7 diluído 1/10 + 3% P/V β-CD sulfatada Buffer borato 20 mM pH 8,3 diluído 1/10 + 3% P/V β-CD sulfatada

CD: ciclodextrina; ACN: acetonitrilo; MeOH: metanol; THF: tetrahidrofurano

Las condiciones del método optimizado fueron:

- *Capilar*: 60 cm (50 cm al detector) y 75 μm de diámetro interno.
- *Voltaje*: 20 kV
- *Temperatura de corrida*: 25 °C
- *Temperatura del rack*: 10 °C
- *Inyección*: hidrodinámica, 3 seg, 0,3 psi
- *Detección*: UV-DAD 255 y 280 nm
- *BGE* (electrolito)
 - Buffer borato 20 mM pH 8,3; SDS 50 mM; β -CD 5 mM, β -CD sulfatada 2 % P/V y MeOH 10 %.
- *Solución diluyente*
 - Buffer borato 20 mM pH 7 diluido 1/10 en agua

Se trabajó a dos longitudes de onda para la determinación de los glicósidos de flavonoles (255 nm) y los taninos condensados (280 nm).

- Entre corridas, se efectuaron lavados con KOH 0,1 M durante 2 minutos, seguido de agua por 2 minutos y estabilización con el electrolito por otros 2 minutos.

Se partió de las soluciones de los testigos en metanol (1 mg/ml) y se realizaron las diluciones apropiadas hasta llegar a la solución mezcla de testigos, de acuerdo con la tabla 2.3. La última dilución se realizó en solución diluyente. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Tabla 2.3.- Concentraciones de los compuestos en la solución mezcla de testigos

Compuesto	Concentración solución mezcla testigos (µg/ml)
Catequina	12,0
Epicatequina	16,0
PB2	16,0
Rutina	8,0
Q-3-O-glucósido	6,0
Q-3-O-xilósido	4,6
Q-3-O-ramnósido	4,6
Q-3-O-arabinofuranósido	6,6
Q-3-O-arabinopiranosido	8,0
Quercetina	8,0

PB2: procianidina B2; Q-3-O-glucósido: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-xilósido: quercetina-3-O-xilósido, Q-3-O-ramnósido: quercetina-3-O-ramnósido; Q-3-O-arabinofuranósido: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-arabinopiranosido: quercetina-3-O-arabinopiranosido.

Se determinaron los valores de N (platos teóricos) y R (resolución) para el sistema optimizado (de acuerdo con USP 37, capítulo <621>).

Validación

Se realizó de acuerdo con las normativas de la guía Q2 (R1) de la ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*). Los parámetros evaluados fueron los que habitualmente se aplican a extractos vegetales.

Límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ)

Se procedió a determinar las áreas de los picos correspondientes a los testigos en la solución mezcla de testigos descrita previamente. Se realizaron determinaciones de áreas correspondientes al ruido en al menos 20 puntos en el electroferograma, en una zona donde la perturbación de la línea de base fuera mínima. Se calculó la relación S/N (señal/ruido) y las concentraciones del LOD y LOQ correspondientes a 3 y 10 veces la relación S/N, respectivamente. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Precisión

Se utilizó la solución mezcla de testigos del ensayo de LOD y LOQ.

La precisión se evaluó en el día (n=6) y entre días (durante 3 días, n=18). Se realizó la determinación de tiempo de migración y área de pico y el resultado se expresó como RSD (desviación estándar relativa por ciento).

Linealidad

Se partió de las soluciones de los testigos en metanol y se realizaron las diluciones apropiadas para obtener los 6 niveles de concentración que se evaluaron, a saber: 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 200 % y 300 %. Cada nivel se analizó por triplicado.

Tabla 2.4.- Rangos de concentración ensayada para cada compuesto

Compuesto	Rango ($\mu\text{g/ml}$)
Catequina	6,0 – 36,0
Epicatequina	8,0 – 48,0
PB2	8,0 – 48,0
Rutina	4,0 – 24,0
Q-3-O-glucósido	3,0 - 18,1
Q-3-O-xilósido	2,3 - 13,7
Q-3-O-ramnósido	2,3 - 13,8
Q-3-O-arabinofuranósido	3,3 - 19,7
Q-3-O-arabinopiranosido	4,0 – 24,0
Quercetina	4,0 – 24,0

Aplicación

Glicósidos de flavonoles y taninos condensados

El método desarrollado permitió la detección simultánea de glicósidos de flavonoles y taninos condensados. En todos los casos, las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los equipos, reactivos y solventes son los detallados en la optimización del sistema electroforético:

- *Capilar*: 60 cm (50 cm al detector) y 75 μm de diámetro interno.
- *Voltaje*: 20 kV
- *Temperatura de corrida*: 25 °C
- *Temperatura del rack*: 10 °C
- *Inyección*: hidrodinámica, 3 seg, 0,3 psi
- *Detección*: UV-DAD 255 y 280 nm
- *BGE* (electrolito)
 - Buffer borato 20 mM pH 8,3; SDS 50 mM; β -CD 5 mM, β -CD sulfatada 2 % P/V y MeOH 10 % .
- *Solución diluyente*
 - Buffer borato 20 mM pH 7 diluido 1/10 en agua
- Entre corridas, se efectuaron lavados con KOH 0,1 M durante 2 minutos, seguido de agua por 2 minutos y estabilización con el electrolito por otros 2 minutos.
- *Solución mezcla de testigos*: descrita en límite de detección y cuantificación.
- *Solución muestra*: en el caso de la fracción acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan, se partió de una solución 10 mg/ml del extracto en estudio, disuelto en metanol. En el caso de los extractos metanólicos provenientes de Catamarca y la muestra comercial de San Juan, se partió de soluciones 20 mg/ml en metanol. De todas ellas, se realizó una dilución 1/5 en metanol y se agitó. Luego, se efectuó una segunda dilución 1/5 en solución diluyente (0,4 mg/ml para las fracciones acetato de etilo; 0,8 mg/ml para los extractos metanólicos). Se agitó nuevamente y se procedió a su inyección.

Para determinar los compuestos presentes en los extractos se realizó la comparación de tiempos de migración y espectros con los testigos. Además, se realizó una co-cromatografía (marcado del extracto con testigos) para verificar la identidad de los

compuestos. Para ello, se agregó a las soluciones de las muestras una alícuota de la solución mezcla de los testigos y se compararon las áreas obtenidas antes y después del marcado.

Se realizó este procedimiento con las muestras provenientes de San Juan y Catamarca.

Posteriormente, se procedió a estudiar las bandas purificadas (1F1, 1F2, 2F2, 3F2). Se tomó una alícuota de las soluciones concentradas de cada banda y se efectuó una dilución 1/5 en metanol. Se agitó y luego, se efectuó una segunda dilución 1/5 en solución diluyente. Se agitó nuevamente y se procedió a su inyección. Se compararon con los electroferogramas obtenidos para la solución mezcla de testigos.

Aglicón y ácido gálico

En las soluciones obtenidas a partir de los hidrolizados de las bandas purificadas se procedió a estudiar la naturaleza de la aglicona y la presencia de ácido gálico. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

- Solución mezcla quercetina-ácido gálico: se prepararon soluciones 5 mg/ml en metanol de quercetina y ácido gálico. Se realizó una dilución 1/10 en metanol, se agitó. Se efectuó una segunda dilución 1/5 en solución diluyente (concentración final de 0,1 mg/ml). Se agitó nuevamente y se procedió a su inyección.
- Soluciones muestra: se partió de las soluciones metanólicas concentradas resultante de los hidrolizados de cada una de las bandas. Se realizó una dilución 1/5 en metanol y se agitó. Luego, se efectuó una segunda dilución 1/5 en solución diluyente. Se agitó nuevamente y se procedió a su inyección.

Se compararon los tiempos de migración con los de la solución mezcla de testigos.

2.4.3. HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia)

Glicósidos de flavonoles y taninos condensados (o proantocianidinas)

El método descrito a continuación consiste en un método general para el análisis de los flavonoides, usualmente aplicado en el trabajo de rutina. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Equipos, reactivos y solventes

- Cromatógrafo líquido Varian ProStar equipado con bomba binaria 9012, inyector de volumen fijo (20 µl) y detector de arreglo de diodos (DAD).
- Metanol, calidad HPLC.
- Ácido acético, calidad p.a.
- Estándares de referencia: quercetina-3-O-ramnósido de Extrasynthese (Lyon, Francia). Rutina, catequina, quercetina, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina 3-O-arabinofuranósido de Sigma-Aldrich Corp. (St Louis, EE.UU). Todos ellos en soluciones metanólicas de 1 mg/ml.
- Soluciones de trabajo
 - Solución mezcla de testigos: se partió de soluciones stock de cada uno de los testigos (1 mg/ml en metanol) y se diluyeron en FM A hasta llegar a una concentración de 0,05 mg/ml.
 - Solución muestra: se pesaron exactamente alrededor de 10 mg de las fracciones acetato de etilo provenientes de San Juan ó 20 mg de los extractos metanólicos provenientes de Catamarca y la muestra comercial de San Juan y se disolvieron en metanol. Luego se diluyeron al cuarto en FM A (2,5 mg/ml para las muestras de San Juan, 5 mg/ml para las muestras de Catamarca y muestra comercial de San Juan).

Procedimiento

Se ensayaron modificaciones menores en el gradiente para optimizar la separación de los compuestos de interés. El sistema consiste en:

- Columna Luna Phenomenex C18 (2); 250 x 4,6 mm (5 µm)
- Flujo: 1,2 ml/min
- Temperatura: 40 °C
- Volumen de inyección: 20 µl
- Detección: UV-DAD 260 y 280 nm
- Fase móvil
 - A: AcH-Agua (2:98)
 - B: AcH-MeOH (2:98)

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	85	15
25	60	40
50	60	40
60	15	85
65	0	100

Se procedió al análisis de las muestras provenientes de San Juan y Catamarca. La determinación de los compuestos presentes en las muestras se realizó por comparación de tiempos de retención y de espectros. Además, se realizó una co-cromatografía para verificar la identidad de los compuestos. Para ello, se agregó a las soluciones de las muestras una alícuota de la solución mezcla y se compararon las áreas obtenidas antes y después del marcado. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Posteriormente, se procedió a estudiar las bandas purificadas (1F1, 1F2, 2F2, 3F2). Se partió de las soluciones metanólicas concentradas de cada una de las bandas y se diluyeron al medio con FM A. Se compararon los tiempos de retención y los espectros con los testigos. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Aglicona y ácido gálico

Se procedió a analizar las soluciones provenientes de la extracción con acetato de etilo de los hidrolizados de las bandas purificadas. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

- Solución mezcla quercetina-ácido gálico: se parte de las soluciones metanólicas 1 mg/ml de quercetina y ácido gálico. Se diluyen en FM A hasta una concentración de 0,05 mg/ml.
- Solución muestra: se toma una alícuota de la fracción acetato de etilo de los hidrolizados de las bandas purificadas y se diluye al medio con FM A.

Se determinó la presencia de quercetina y ácido gálico por comparación con los tiempos de retención.

2.5. Análisis estructural

2.5.1. Espectroscopia UV- visible

Reactivos

Metanol grado HPLC

Reactivos de desplazamiento

Se preparan de acuerdo con Mabry y col. (1970):

- NaOMe: solución metanólica de NaOH al 80 % P/V.
- AlCl₃: solución metanólica al 5 %.
- AlCl₃/HCl: solución acuosa 50 % V/V de HCl.
- NaOAc: reactivo sólido.
- NaOAc/H₃BO₃: a la solución anterior se le agrega ácido bórico hasta saturación.

Procedimiento

- Se prepararon soluciones metanólicas de los compuestos aislados hasta una concentración 0,1 mg/ml y en caso de ser necesario, se realizan diluciones de las soluciones. Se registró el espectro UV-visible entre los 200 y 600 nm.
- NaOMe: a una alícuota de la solución del compuesto en estudio se le agregaron 3 gotas de la solución de NaOMe detallada anteriormente. Luego de 5 minutos se escaneó nuevamente para verificar la descomposición.
- AlCl₃: se agregaron a otra alícuota 6 gotas de la solución.
- AlCl₃/HCl: sobre la solución anterior se agregaron 3 gotas del reactivo.
- NaOAc: se agregó a otra alícuota de la solución del flavonoide cantidad suficiente de acetato de sodio sólido tal que se forme una capa de aproximadamente 2 mm en el fondo, se agitó y se leyó después que se asentó el exceso de reactivo.
- NaOAc/H₃BO₃: sobre la solución anterior se agregó cantidad suficiente de ácido bórico para saturar la solución, se agitó y se esperó unos minutos para realizar la lectura.

2.5.2. HPLC-masa

Equipos, reactivos y solventes

- HPLC Agilent

Bombas G1312B SL binary
Autosampler G1367D SL+WP
Detector G1315C Starlight DAD
MS microTOF series
Horno G1316B

- Ácido fórmico y metanol

Condiciones cromatográficas

Columna: Phenomenex Synergi Fusion RP 80-Å, (4 µm), 50 x 2 mm

Flujo: 0,35 ml/min

Temperatura: 40 °C

Fase móvil

A: 0,1 % ácido fórmico

B: metanol

Tiempo (minutos)	A (%)	B (%)
0,0	90	10
5,0	60	40
11,0	30	70
15,0	10	90
16,0	30	70
18,0	60	40
19,0	90	10

Volumen de inyección: 20 µl

Detección: 260 y 280 nm

Muestra: fracción “MeOH combinado-AE” de hoja, proveniente de San Juan en concentración 1 mg/ml en metanol.

Condiciones microTOF-Q

Fuente: ESI

Polaridad: positiva

Set capillary: 4000 V

Set End Plate Offset: -500 V
Set Collision Cell RF: 150 Vpp
Set Nebulizer: 3,5 bar
Set dry heater: 200 °C
Set Dry Gas: 7,0 l/min

Del espectro de primer orden se obtuvo información del ión molecular $[M+H]^+$ y la fórmula asociada. Una vez seleccionados los iones precursores, se procedió a realizar la fragmentación, aplicando entre 10 y 15 eV.

2.5.3. RMN

Condiciones experimentales

Los experimentos son realizados en un Sistema Bruker Avance III para la adquisición de datos y control de pulsos equipado con un magneto Bruker UltraShield 14.1 tesla, frecuencia de resonancia del H 600,13 MHz, sistema de shim BOSS II. Equipado con una probe multinuclear Smart BBFO (5 mm) con gradiente en Z y sintonía automática. En el caso de DOSY, se aplicaron distintos gradientes de pulso.

Las muestras analizadas comprendieron las bandas 1F1, 1F2, 2F2 y 3F2. Se determinaron los espectros de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY y TOCSY. En el caso de la banda 2F2, se realizó adicionalmente un ensayo de DOSY.

Los ensayos se efectuaron en CD_3OD (tetradeuterometanol) y DMSO-d_6 (hexadeuterodimetilsulfóxido)

2.6. Actividad antioxidante

2.6.1. Autografía por TLC

Materiales y reactivos

- Cromatofolios de sílica gel 60 F254
- Acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico
- Solución reveladora DPPH: 1 mg/ml en etanol

- Solución reveladora ABTS⁺: se prepara una solución acuosa 7 mM de ABTS. El radical ABTS⁺ se genera por reacción de la solución stock de ABTS con 2,45 mM de persulfato de potasio K₂O₈S₂ (concentración final). La mezcla se deja reposar en la oscuridad, entre 12 – 16 horas antes de su uso (Zampini y col., 2010).
- Reactivo de Productos Naturales (NP) (Wagner y Bladt, 1996): se compone del éster formado por ácido difenilbórico y etanolamina al 1% en etanol. Luego de pulverizar la placa con el reactivo, se seca bajo corriente de aire caliente y se observa a luz visible y 366 nm.

Procedimiento

Se trabaja con la fracción “MeOH combinado-AE”.

Fase estacionaria: sílica gel 60 F254

Fase móvil: acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26) (Wagner y Bladt, 1996).

Volumen de siembra: 5 µl

Muestra: fracción “MeOH combinado-AE” de hoja, proveniente de San Juan en concentración 10 mg/ml en metanol.

Revelado

- NP y visualización a 366 nm
- DPPH
- ABTS⁺

2.6.2. Métodos espectroscópicos

2.6.2.1. DPPH

El método consiste en medir el consumo de DPPH (radical estable) espectrofotométricamente a través de la disminución de absorbancia a 515 nm (Sánchez-Moreno y col., 1998).

Equipos y reactivos

- Espectrofotómetro Hitachi U-2000

- DPPH 63 μM : se pesaron 2,5 mg de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) para 100 ml de solución, se disolvieron en metanol y se mantuvieron a temperatura ambiente.
- Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-ácido carboxílico): 1 mg/ml en metanol
- Soluciones muestra: fracciones acetato de etilo (hoja y tallo) obtenidas con metanol y distintas proporciones de metanol-agua, provenientes de San Juan, los extractos metanólicos de los ejemplares provenientes de Catamarca sobre distintos hospedantes (“chañar”, “algarrobo”, “olivo” y “retama”) y la muestra comercial de San Juan. Todos ellos en concentración 1 mg/ml en metanol.

Procedimiento

En una cubeta, se pipetearon 3 ml de la solución DPPH 63 μM y a continuación, una alícuota apropiada de la solución de extracto 1 mg/ml en metanol (la alícuota puede modificarse según la respuesta que se obtenga). Se determinó la absorbancia (A) a tiempo fijo (10 minutos), con agitación constante.

Se realizó una curva de calibración con Trolox (1 mg/ml en metanol). Luego, se realizó una extrapolación para el cálculo de la concentración de antioxidantes presentes en la muestra. Los resultados se expresaron en μmol de trolox/g de extracto.

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Tuckey ($p < 0,05$). Para los análisis de correlación se utilizó el test de Pearson.

2.6.2.2. ABTS

El método consiste en generar radicales del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilenbenzotiazolin-6-sulfónico), que poseen color azul) por reacción con ABAP (2,2-azo-bis (2-amidinopropano) hidrocloreuro). El consumo de los radicales del ABTS se mide a través de la disminución de absorbancia a 734 nm (Campos y Lissi, 1997).

Equipos y reactivos

- Espectrofotómetro Hitachi U-2000

- ABTS 75 mM
- ABAP 2 mM
- Buffer fosfato 50 mM pH 7,40
- Trolox 1 mg/ml en metanol
- Soluciones muestra: fracciones acetato de etilo (hoja y tallo) obtenidas con metanol y distintas proporciones de metanol-agua, provenientes de San Juan, los extractos metanólicos de los ejemplares provenientes de Catamarca sobre distintos hospedantes (“chañar”, “algarrobo”, “olivo” y “retama”) y la muestra comercial de San Juan. Todos ellos en concentración 1 mg/ml en etanol-agua (1:1).

Procedimiento

Para 50 ml de mezcla se pesaron 10 mg de ABTS y 250 mg de ABAP. Se disolvió primero el ABTS, luego el ABAP en el buffer fosfato. Se incubó al menos 45 minutos a 45 °C (hasta que la solución desarrolló color azul y la absorbancia tuvo un valor de 0,5). Se pipetearon 3,0 ml de la mezcla y se le agregó una alícuota apropiada de extracto en concentración 1 mg/ml. Se leyó la absorbancia a tiempo fijo (3-4 minutos), agitando constantemente.

Se realizó una curva de calibración con Trolox (1 mg/ml en metanol). Luego se realizó una extrapolación para el cálculo de la concentración de la muestra. Los resultados se expresaron en μmol de trolox/g de extracto.

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Tuckey ($p < 0,05$). Para los análisis de correlación se utilizó el test de Pearson.

2.6.3. Electroforesis capilar

Equipos, solventes y soluciones de trabajo

- Equipo de electroforesis capilar Beckman P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA) acoplado a un detector de arreglo de diodos.
- Capilares de sílica fundida (Microsolv technology, Eatontown, NJ, USA) de 60 cm largo (50 cm al detector) y 75 μm de diámetro interno.

- Ciclodextrinas: β -CD, β -CD sulfatada de Sigma-Aldrich Corp. (St Louis, EE.UU).
- Metanol, tetrahidrofurano, acetonitrilo calidad HPLC.
- Tetraborato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS) calidad p.a.
- Estándares de referencia: rutina, catequina, quercetina y ácido gálico de Sigma-Aldrich Corp. (St Louis, EE.UU). Se prepararon soluciones metanólicas de 1 mg/ml.
- Soluciones muestra: en el caso de la fracción acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan, se partió de una solución 10 mg/ml del extracto en estudio, disuelto en metanol. En el caso de los extractos metanólicos provenientes de Catamarca y la muestra comercial de San Juan, se partió de soluciones 20 mg/ml en metanol.
- Solución de DPPH.

Condiciones electroforéticas

- *Capilar*: 60 cm (50 cm al detector) y 75 μ m de diámetro interno.
- *Voltaje*: 20 kV
- *Temperatura de corrida*: 25 °C
- *Temperatura del rack*: 10 °C
- *Inyección*: hidrodinámica, 5 seg, 0,5 psi
- *Detección*: UV-DAD 255 y 280 nm
- *BGE* (electrolito)
 - Buffer borato 20 mM pH 8,3; SDS 50 mM; β -CD 5 mM, β -CD sulfatada 2 % P/V y MeOH 10 %.
- Entre corridas, se efectuaron lavados con KOH 0,1 M durante 2 minutos, seguido de agua por 2 minutos y estabilización con el electrolito por otros 2 minutos.
- *Solución diluyente*
 - Buffer borato 20 mM pH 7 diluido 1/10 en agua

Desarrollo y optimización del método

Sobre la base del método analítico desarrollado para el análisis de los extractos y de acuerdo con los trabajos de Helmja y col. (2007, 2008 y 2009), se estudiaron distintas

variables a fin de optimizar y adaptar la metodología a las muestras en estudio. En todos los casos las determinaciones se realizaron por triplicado.

- Solución testigo sin tratar: se preparó una solución mezcla de testigos (catequina, rutina, quercetina y ácido gálico) en concentración 1 mg/ml. Se realizó una dilución 1/10 en metanol. Se agitó. Posteriormente, se realizó una dilución 1/5 en solución diluyente. Se agitó y se inyectó (concentración final 0,02 mg/ml).
- Solución testigo tratada: Se realizó una dilución 1/10 de la solución mezcla de testigos 1 mg/ml con DPPH en concentración 2,5 mM. Se incubó durante 10 minutos, al abrigo de la luz y con agitación constante. Al cabo de ese tiempo, se diluyó 1/5 con solución diluyente, se agitó e inyectó.

Se determinó el porcentaje no oxidado para cada compuesto de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje no oxidado} = \frac{\text{Área del compuesto en la solución testigo mezcla tratada}}{\text{Área del compuesto en la solución testigo mezcla sin tratar}}$$

Se trabajó luego con la fracción “MeOH combinado-AE” de hoja, proveniente de la muestra de San Juan para optimizar la metodología.

Las condiciones evaluadas se detallan en la tabla 2.5.

Tabla 2.5.- Variables estudiadas para la optimización del método

Concentración extracto (mg/ml)	Concentración DPPH (mM)
1,0; 2,5; 5,0 y 10,0	0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 y 10,00

Se realizaron las siguientes pruebas:

Condición 1

Concentración fija de DPPH (0,5 mM) y concentraciones variables de extracto (1 – 10 mg/ml).

Condición 2

Concentración fija de extracto (10 mg/ml) y concentraciones variables de DPPH (0,1 – 10 mM)

Procedimiento

- Solución muestra sin tratar: se partió de una solución 10 mg/ml de las fracciones acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan ó de la solución 20 mg/ml de los extractos metanólicos de las muestras provenientes de Catamarca y la muestra comercial de San Juan, disueltas en metanol. Se realizó una dilución 1/10 en metanol. Luego, se tomó una alícuota y se realizó una dilución 1/5 en solución diluyente. Se agitó e inyectó.
- Solución muestra tratada: se partió de la misma solución 10 mg/ml de las fracciones acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan ó de la solución 20 mg/ml de los extractos metanólicos de las muestras provenientes de Catamarca y la muestra comercial de San Juan, disueltas en metanol. En un vial se realizó una dilución 1/10 de la muestra en solución de DPPH. Se incubó al abrigo de la luz, durante 10 minutos, con agitación constante. Luego de transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de la mezcla y se realizó una dilución 1/5 en solución diluyente. Se agitó e inyectó.

Estudio comparativo

Se determinó el % de no oxidación para las fracciones acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan (10 mg/ml en metanol) y los extractos metanólicos de las muestras procedentes de Catamarca y la muestra comercial de San Juan (20 mg/ml en metanol), frente a una concentración 0,5 mM de DPPH, de acuerdo con el procedimiento detallado anteriormente. En todos los casos, las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Se determinó el porcentaje de compuesto no oxidado, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje no oxidado} = \frac{\text{Área del compuesto en la solución muestra tratada}}{\text{Área del compuesto en la solución muestra sin tratar}}$$

2.6.4. Ensayos *ex vivo*

Las muestras utilizadas corresponden a la fracción “MeOH combinado-AE” de hoja, proveniente de San Juan.

Los resultados se expresaron como media \pm ESM y representaron el promedio de al menos 6 experimentos independientes. Se utilizó ANOVA seguido del test de Dunnett para analizar las diferencias entre las medias de más de dos grupos. La significancia estadística es de $p < 0,05$.

2.6.4.1. Homogeneizados del tejido

Se utilizaron ratas hembra Sprague-Dawley con un peso entre 180 – 200 g alimentadas con una dieta convencional y agua *ad libitum*. Para el ensayo de oxidación fosfolipídica se utilizaron muestras de hígado (0,5 – 1 g peso húmedo) homogeneizadas en KCl (120 mM) buffer fosfato (30 mM, pH 7,4) a 4 °C en un homogeneizador de vidrio Potter Elvehjem. El mismo procedimiento se utilizó para obtener muestras de cerebro para la inhibición de quimioluminiscencia (QL). En ambos casos, la suspensión obtenida se centrifugó a 600 g durante 10 minutos a 4 °C para remover los núcleos y restos celulares. El pellet se descartó y el sobrenadante se utilizó como homogeneizado (Llesuy y col., 1994). La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. (1951) usando seroalbúmina bovina como estándar.

2.6.4.2. Inhibición de la oxidación fosfolipídica

La oxidación fosfolipídica se determinó mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), se utilizó una técnica fluorimétrica. Homogeneizados de hígado de ratas (1,5 ml) fueron incubados con ter-butil hidroperóxido (3 mM) y concentraciones crecientes de la fracción acetato de etilo por 60 min a 37 °C. Para detener la reacción se agregó BHT (butil-hidroxi-tolueno) en una concentración final de 0,1 % (P/V). Luego, muestras de 1 ml se mezclaron con 2 ml de HCl (0,1 N), 0,3 ml de ácido fosfotúngstico (10 % P/V) y 1 ml de ácido 2-tiobarbitúrico (0,7 % P/V) y se colocaron en baño de agua hirviendo durante 60 minutos. Luego del período de incubación, las muestras se enfriaron y los TBARS fueron extraídos con 5 ml de n-butanol. Luego de una centrifugación a 800 g durante 10 minutos, la fluorescencia de la capa butanólica se midió en un espectrómetro Perkin Elmer LS 55 a 515 nm

(excitación) y 553 nm (emisión). El 1,1,3,3-tetrametoxipropano se usó como testigo y los resultados fueron expresados como pmol TBARS por mg de proteína (Yagi, 1976).

2.6.4.3. Inhibición de la quimoluminiscencia (QL) en homogeneizados de cerebro

Los homogeneizados (1 ml) fueron mezclados con concentraciones crecientes de la fracción acetato de etilo e inmediatamente colocados en viales de vidrio con bajo contenido de potasio de 25 mm de diámetro x 50 mm de altura. La concentración de proteínas se ajustó a 1 mg/ml de homogeneizado con un medio de reacción consistente en KCl (120 mM) buffer fosfato (30 mM, pH 7,4). La emisión de QL fue medida en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb luego de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente. Los resultados fueron expresados como cuentas por minuto (cpm) por mg de proteína (Lissi y col., 1986).

2.6.4.4. Inhibición del daño oxidativo al ADN inducido por H₂O₂

La extensión del daño al ADN es determinado por el ensayo del cometa (Tice y col., 2000). Se obtuvo sangre venosa heparinizada de donantes masculinos sanos y las células mononucleares fueron aisladas por centrifugación al 300 g por 15 minutos a temperatura ambiente en un gradiente de densidad Histopaque-1077. La concentración final de las células obtenidas se ajustó a 105 células/ml con medio RPMI-1640 y se agregaron concentraciones crecientes de la fracción acetato de etilo. Luego de 3 horas a 37 °C, la mezcla se incubó con H₂O₂ (50 µM) por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, la suspensión celular se centrifugó a 400 g por 10 minutos a 4 °C. El pellet obtenido fue resuspendido en 75 µL de 0,75 % (P/V) de agarosa de bajo punto de fusión, y depositado en capa sobre un portaobjeto congelado recubierto con 100 µL de 1% (P/V) de agarosa normal. Cuando la agarosa de bajo punto de fusión solidificó, se agregó una segunda capa de 0,75 % (P/V) de agarosa de bajo punto de fusión. Luego de 5 minutos a 4 °C, los portaobjetos fueron sumergidos en un baño de hielo con solución alcalina de lisis (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Trizma base, 10 % DMSO y 1 % Triton X-100, pH 10,0) e incubados por 60 minutos a 4 °C. Posteriormente, los portaobjetos fueron sumergidos en un buffer de electroforesis (0,3 M NaOH con 1 mM Na₂EDTA, pH 13,5) durante 20 minutos a 4 °C para permitir que el ADN se desenrolle.

La electroforesis se desarrolló a 1,0 V/cm (25 V y 300 mA) por 20 minutos a 4 °C. Los portaobjetos fueron luego neutralizados mediante 3 lavados de 5 minutos cada uno con

Tris-HCl (0,4 M, pH 7,5) a 4 °C y el ADN se tiñó con una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml). El procedimiento completo se llevó a cabo en oscuridad. El análisis del largo de los cometas se desarrolló en un microscopio de fluorescencia, se utilizó el método visual de puntaje semicuantitativo. Para cada muestra, 100 células elegidas al azar fueron clasificadas en cuatro categorías (Cat) de acuerdo con el largo de la cola del cometa: Cat #1: cola < 20 µm, Cat #2: 20 – 40 µm, Cat #3: 40 – 80 µm y Cat #4: > 80 µm y el índice de daño al ADN (N) se calculó de la siguiente manera:

$$N = n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4$$

Donde n_1 es el número de células dentro de Cat #1 de daño, n_2 es el número de células dentro de Cat #2 de daño, n_3 es el número de células dentro de la Cat #3 de daño y n_4 es el número de células dentro de la Cat #4 de daño. A fin de descartar el daño directo al ADN inducido por la incubación con la fracción acetato de etilo, se realizó el mismo ensayo en ausencia de H₂O₂. No se observó daño al ADN inducido por la fracción acetato de etilo a cada concentración ensayada.

2.6.5. Inhibición de la QL *in vivo* en la piel irradiada con la luz UVA

Ratones hembra Swiss de entre 20 – 25 g fueron alimentados con una dieta convencional y agua a voluntad. Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital (50 mg por kg de peso). La superficie dorsal fue afeitada y se le aplicó, en forma tópica con una pipeta automática, 50 µl de la EAF (10 % P/V) o el vehículo (etanol) en la espalda del animal. Áreas de entre 1 – 3 cm² fueron irradiadas con luz UVA de una fuente Mineralight UVGL-58 UVA (máximo a 366 nm) durante 30 minutos (dosis total: 7,5 J/m²). El porcentaje de luz UVB (290 – 320 nm) emitida fue menor al 1 %. La espalda del animal se colocó a una distancia de 15 cm de la lámpara UVA. A fin de medir la QL *in vivo*, el animal completo se cubrió con un lámina de aluminio, en el cual se recortó una ventana para permitir la exposición de la parte dorsal, exclusivamente. Las determinaciones fueron realizadas en un contador de fotones Johnson Research Foundation. Se utilizó un fotomultiplicador EMI 9658 (con respuesta en el rango de 300 – 900 nm) enfriado a -20 °C y un potencial de -1,4 kW. La salida del fototubo se conectó a un amplificador-discriminador ajustado a un conteo de un fotón, que a su vez fue conectado a un contador de frecuencia y a un registrador. La recolección y aislamiento eficiente de la luz fueron establecidos mediante una barra de lucita colocada frente a la piel expuesta *in situ*. Los resultados fueron expresados como

cuentas por segundo (cps) por cm² de superficie de piel (Evelson y col., 1997). El tratamiento del animal se realizó de acuerdo con las guías regulatorias de ANMAT 6344/96.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de los extractos

En la tabla 3.1 se muestra los rendimientos de las fracciones de acetato de etilo obtenidos a partir de extractos metanólico y metanol-agua (80 % y 50 %) obtenidos de las hojas y los tallos herbáceos recolectados en la provincia de San Juan.

Tabla 3.1.- Rendimiento de las fracciones de acetato de etilo obtenidas a partir de distintas proporciones de metanol-agua

Rendimiento (fracción AE)	Hoja				Tallo
	MeOH				
	Combinado	100 %	80 %	50 %	Combinado
	25 %	20 %	20 %	20 %	24 %

AE: acetato de etilo. MeOH: metanol.

MeOH combinado: extracciones sucesivas sobre la misma muestra con MeOH 100 %, 80 % y 50 %.

En el caso de las muestras de Catamarca y la muestra comercial de San Juan, se trabajó con los extractos metanólicos al 100 %.

3.2. Determinación del contenido de polifenoles

3.2.1. Fenoles totales

Los valores de fenoles totales obtenidos de los diferentes extractos metanólicos y las fracciones de acetato de etilo se observan en la tabla 3.2.

Tabla 3.2.- Fenoles totales en ejemplares de *Ligaria cuneifolia*

Muestra				Fenoles totales (mg ácido gálico/100 mg extracto) Promedio (n = 5) ± ESM*		
San Juan	<i>Prosopis Geoffroea</i>	Material colectado	Hoja	MeOH combinado-AE	59,8 ± 0,1	
				MeOH 100 %-AE	57,6 ± 0,1	
				MeOH 80 %-AE	56,7 ± 0,1	
				MeOH 50 %-AE	55,7 ± 0,1	
			Tallo	MeOH combinado-AE	53,8 ± 0,1	
	<i>Prosopis Geoffroea</i>	Comercial	Hoja	MeOH 100 %	32,1 ± 0,2	
Catamarca	Retama	Material colectado	Planta entera	MeOH 100 %	17,8 ± 0,2	
					Algarrobo	17,6 ± 0,2
					Chañar	21,0 ± 0,2
					Olivo	17,7 ± 0,2

*ESM: error estándar de la media. AE: acetato de etilo. MeOH combinado-AE: extracciones sucesivas sobre la misma muestra con MeOH 100 %, 80 % y 50 % y posterior partición con acetato de etilo.

El mayor contenido de fenoles totales corresponde a las fracciones de acetato de etilo. La fracción obtenida por agotamiento de la hoja (MeOH combinado-AE) presenta mayor concentración de fenoles que la correspondiente al tallo. Por otro lado, cuando se analizan los extractos obtenidos con MeOH 100 %, la muestra comercial de San Juan presenta valores superiores a las muestras obtenidas en Catamarca.

Entre las muestras colectadas en Catamarca, si bien los resultados son similares, los ejemplares que crecen sobre “chañar” son los que presentan mayores valores de fenoles totales.

3.2.2. Taninos condensados (o proantocianidinas)

Los resultados obtenidos para la cuantificación de los taninos condensados se observan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3.- Taninos condensados en ejemplares de *L. cuneifolia*

Muestra				Taninos condensados (A/mg extracto) Promedio (n = 5) ± ESM*	
San Juan	<i>Prosopis Geoffroea</i>	Estudio	Hoja	MeOH combinado-AE	0,67 ± 0,02
				MeOH 100 %-AE	0,50 ± 0,01
				MeOH 80 %-AE	0,57 ± 0,02
				MeOH 50 %-AE	0,59 ± 0,01
			Tallo	MeOH combinado-AE	0,43 ± 0,02
		<i>Prosopis Geoffroea</i>	Comercial	Hoja	MeOH 100 %
Catamarca					0,07 ± 0,00
	Algarrobo	Estudio	Planta entera	MeOH 100 %	0,39 ± 0,03
	Chañar				0,47 ± 0,02
	Olivo				0,36 ± 0,01

*ESM: error estándar de la media. A: absorbancia. AE: acetato de etilo. MeOH combinado-AE: extracciones sucesivas sobre la misma muestra con MeOH 100 %, 80 % y 50 % y posterior partición con acetato de etilo.

Los valores más altos de taninos condensados corresponden a la fracción acetato de etilo (combinado-AE), esta fracción proviene de la partición con acetato de etilo de un extracto obtenido por sucesivas extracciones con proporciones variables de metanol. Por otro lado, se observa una tendencia al aumento de los valores a medida que la proporción acuosa del solvente de extracción se incrementa, lo cual es consistente con la afinidad de las proantocianidinas por el solvente acuoso.

Entre las muestras de Catamarca, el extracto metanólico proveniente de ejemplares recolectados sobre la “retama” presentan valores significativamente bajos de taninos totales.

3.2.3. Flavonoides totales

Los resultados obtenidos para la cuantificación de los flavonoides totales se observan en la tabla 3.4.

Tabla 3.4.- Flavonoides totales en ejemplares de *Ligaria cuneifolia*

Muestra					Flavonoides totales (mg rutina/100 mg extracto) Promedio (n = 5) ± ESM*	
San Juan	<i>Prosopis Geoffroea</i>	Estudio	Hoja	MeOH combinado-AE	8,5 ± 0,0	
				MeOH 100 %-AE	7,9 ± 0,0	
				MeOH 80 %-AE	7,1 ± 0,0	
				MeOH 50 %-AE	6,7 ± 0,0	
			Tallo	MeOH combinado-AE	8,1 ± 0,0	
	<i>Prosopis Geoffroea</i>	Comercial	Hoja	MeOH 100 %	1,1 ± 0,0	
Catamarca	Algarrobo Chañar Olivo	Estudio	Planta entera	MeOH 100 %	Retama	3,5 ± 0,0
						1,3 ± 0,0
						1,5 ± 0,0
						1,2 ± 0,0

*ESM: error estándar de la media. AE: acetato de etilo. MeOH combinado-AE: extracciones sucesivas sobre la misma muestra con MeOH 100 %, 80 % y 50 % y posterior partición con acetato de etilo.

Los valores más altos corresponden a la fracción “MeOH combinado-AE” y disminuye a medida que aumenta la concentración de agua en el solvente de extracción.

Si comparamos los extractos metanólicos, presentan valores similares salvo el material recolectado sobre “retama” en la provincia de Catamarca, para el cual la concentración de flavonoides totales se triplica.

3.2.4. Ácidos hidroxicinámicos

Los resultados obtenidos para la cuantificación de ácidos hidroxicinámicos se observan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5.- Ácidos hidroxicinámicos en ejemplares de *Ligaria cuneifolia*

Muestra				Ácidos hidroxicinámicos (mg ácido clorogénico/100 mg extracto)	Promedio (n = 5) ± ESM*	
San Juan	<i>Prosopis Geoffroea</i>	Estudio	Hoja	MeOH combinado-AE	16,4 ± 0,0	
				MeOH 100 %-AE	13,6 ± 0,1	
				MeOH 80 %-AE	12,9 ± 0,1	
				MeOH 50 %-AE	11,9 ± 0,0	
			Tallo	MeOH combinado-AE	15,9 ± 0,1	
	<i>Prosopis Geoffroea</i>	Comercial	Hoja	MeOH 100 %	2,1 ± 0,1	
Catamarca	Retama	Estudio	Planta entera	MeOH 100 %	1,6 ± 0,0	
					Algarrobo	1,0 ± 0,0
					Chañar	1,2 ± 0,0
					Olivo	1,0 ± 0,0

*ESM: error estándar de la media. AE: acetato de etilo. MeOH combinado-AE: extracciones sucesivas sobre la misma muestra con MeOH 100 %, 80 % y 50 % y posterior partición con acetato de etilo.

Las fracciones de acetato de etilo son las muestras que presentan los mayores valores. En cambio, los extractos metanólicos presentan concentraciones diez veces menores.

Por otro lado, los extractos metanólicos de los ejemplares colectados en San Juan son superiores a los extractos metanólicos de los ejemplares provenientes de Catamarca. Además, el extracto que se obtiene de los individuos de *L. cuneifolia* que crecen sobre “retama”, en la provincia de Catamarca, son los que presentan mayor concentración de ácidos hidroxicinámicos.

3.2.5. Taninos totales

Los resultados obtenidos para la cuantificación de los taninos totales de las fracciones y de los extractos de los ejemplares de *L. cuneifolia* se observan en la tabla 3.6.

Tabla 3.6.- Taninos totales en ejemplares de *Ligaria cuneifolia*

Muestra				Taninos totales (mg ácido gálico/100 mg extracto) Promedio (n = 5) ± ESM*	
San Juan	<i>Prosopis Geoffroea</i>	Estudio	Hoja	MeOH combinado-AE	14,0 ± 0,1
				MeOH 100 %-AE	13,6 ± 0,1
				MeOH 80 %-AE	13,5 ± 0,1
				MeOH 50 %-AE	12,5 ± 0,1
			Tallo	MeOH combinado-AE	12,1 ± 0,1
	<i>Prosopis Geoffroea</i>	Comercial	Hoja	MeOH 100 %	8,1 ± 0,1
Catamarca	Retama	Estudio	Planta entera	MeOH 100 %	1,6 ± 0,1
	Algarrobo				5,2 ± 0,1
	Chañar				11,9 ± 0,1
	Olivo				11,4 ± 0,1

*ESM: error estándar de la media. AE: acetato de etilo. MeOH combinado-AE: extracciones sucesivas sobre la misma muestra con MeOH 100 %, 80 % y 50 % y posterior partición con acetato de etilo.

Los valores más altos corresponden a las fracciones de acetato de etilo resultante de las sucesivas extracciones con proporciones variables de metanol sobre las hojas. Para la muestra comercial de San Juan se observan valores intermedios.

Entre las muestras de los ejemplares colectados en Catamarca, aquellos que crecieron sobre “olivo” y “chañar” se obtienen valores de taninos totales significativamente elevados con respecto a los que crecen en “retama” y “algarrobo”.

3.3. Estudio de los flavonoides

3.3.1. Cromatografía en capa delgada (TLC)

3.3.1.1. Flavonoles

Glicósidos de flavonoles

En la figura 3.1 se puede observar el perfil cromatográfico de la fracción acetato de etilo de la muestra proveniente de San Juan, resultante de las sucesivas extracciones con proporciones variables de metanol sobre las hojas.

Figura 3.1.- Fracción acetato de etilo proveniente de la muestra de San Juan (hoja)



Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

Fase móvil: butanol-AcH-agua (6:1:2) (primera dimensión); AcH 15 % (segunda dimensión)

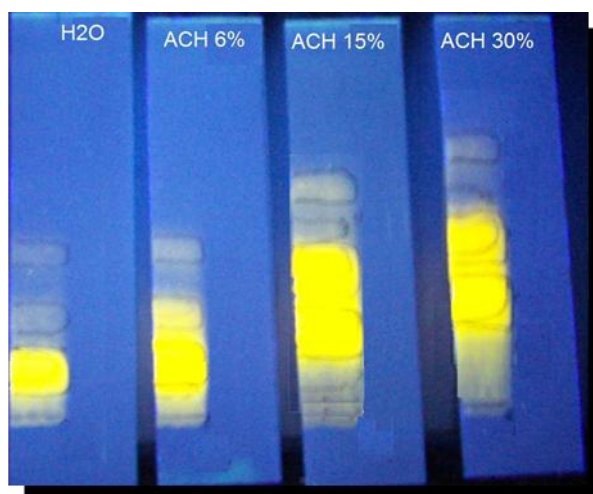
Detección: UV 254 y 366 nm.

Revelador: NP y visualización UV 366 nm.

En el perfil cromatográfico se puede observar 5 manchas oscuras, que reaccionan con los vapores de amoníaco virando al amarillo oscuro. Con el reactivo NP dan reacción característica de los orto-difenoles (amarillo oscuro).

En la figura 3.2 se puede observar cómo los compuestos presentes en la fracción “metanol combinado-AE” modifican sus valores de Rf de acuerdo con la polaridad del solvente de corrida: agua, AcH 6 %, AcH 15 % y AcH 30 %.

Figura 3.2.- Efecto de la polaridad de los solventes sobre los compuestos presente en la fracción “MeOH combinado-AE”



Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

Detección: UV 254 y 366 nm.

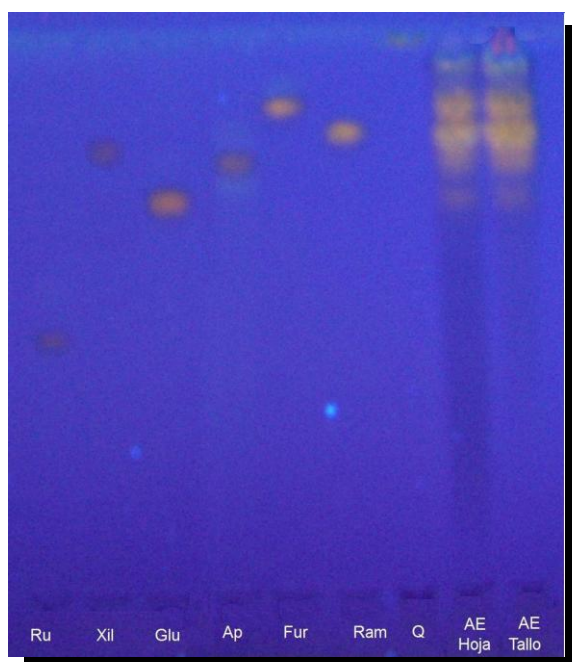
Revelador: NP y visualización UV 366 nm.

Se observa el efecto de separación de los flavonoles con los distintos solventes. La mejor separación se logra con el AcH 15 %, el cual es el utilizado para el aislamiento de los flavonoles.

En la figura 3.3 se puede observar la cromatografía unidireccional en donde se compara la fracción “MeOH combinado-AE” de tallo y hoja con quercetina y diferentes glicósidos de quercetina.

Los valores de R_f se observan en tabla 3.7.

Figura 3.3.- Cromatograma unidireccional de la fracción “MeOH combinado AE”



Fase estacionaria: sílica gel 60 F₂₅₄

Fase móvil: acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético glacial - agua (100:11:11:26)

Testigos (de izquierda a derecha): Ru (rutina), Xil (quercetina-3-O-xilósido), Glu (quercetina-3-O-glucósido), Ap (quercetina-3-O-arabinopiranosido), Fur (quercetina-3-O-arabinofuranósido), Ram (quercetina-3-O-ramnósido), Q (quercetina).

Detección: UV 254 y 366 nm.

Revelador: NP y visualización UV 366 nm

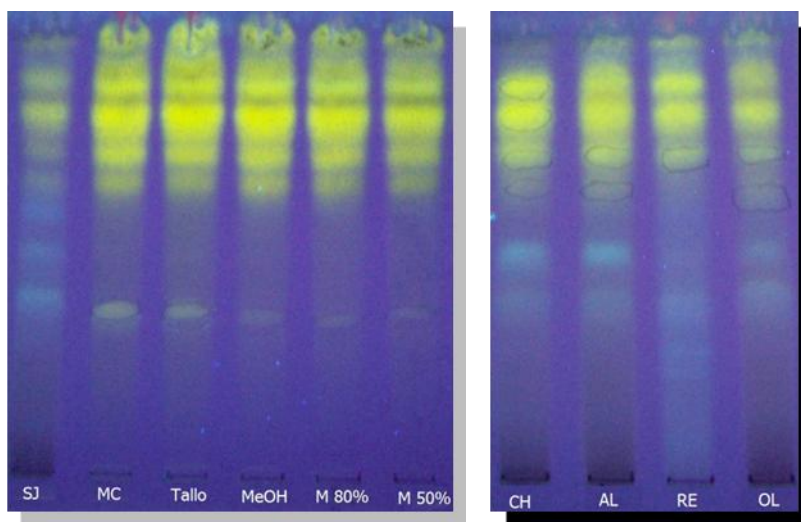
Tabla 3.7.- Valores de R_f de los testigos

Compuesto	R_f
Rutina	0,44
Q-3-O-xilósido	0,81
Q-3-O-glucósido	0,71
Q-3-O-arabinopiranosido	0,78
Q-3-O-arabinofuranósido	0,87
Q-3-O-ramnósido	0,83
Quercetina	1,00

En forma preliminar, se observa la presencia de Q-3-O-xilósido, Q-3-O-glucósido, Q-3-O-arabinopiranosido, Q-3-O-arabinofuranósido, Q-3-O-ramnósido. Se detectan también compuestos desconocidos.

En las figura 3.4 se realiza un estudio comparativo entre las muestras de San Juan y las de Catamarca.

Figura 3.4.- Estudio comparativo de las muestras de San Juan y Catamarca.

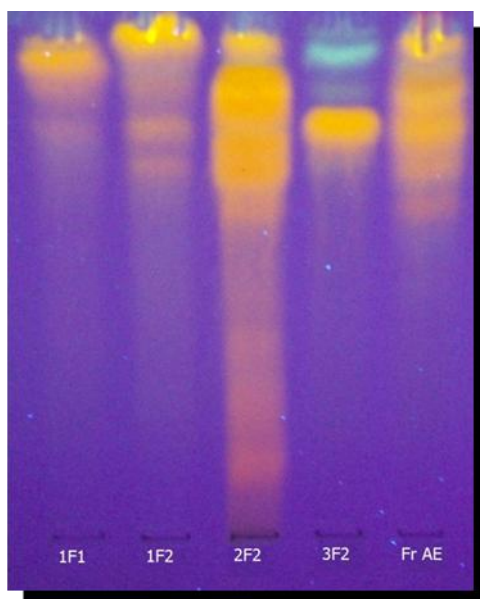


De izquierda a derecha: muestras San Juan (calles 1 a 6). SJ: muestra comercial de San Juan; MC: Hoja metanol combinado; Tallo Metanol combinado, MeOH (Hoja metanol); M 80 %: (hoja metanol 80 %); M 50 % (hoja metanol 50 %). Muestras de Catamarca (calles 7 a 10): extractos metanólicos de distintos hospedantes CH (“chañar”), AL (“algarrobo”), RE (“retama”), OL (“olivo”)

En forma preliminar, se observa la semejanza de perfiles entre los extractos de Catamarca entre sí, independientemente de los hospedantes, con los extractos de San Juan.

La separación de los compuestos de interés (flavonoles) se realiza sobre la muestra “MeOH combinado-AE”. Para ello, se utiliza la cromatografía descendente en papel. A través de una corrida inicial en butanol-ácido acético-agua (6:1:2) se separa la banda principal correspondiente a los flavonoles. Esta se eluye, concentra y vuelve a sembrarse en papel para ser sometida a sucesivas corridas en ácido acético al 15 % (tal como se indica en Materiales y métodos). Se obtienen así cuatro bandas (1F1, 1F2, 2F2 y 3F2), las cuales son objeto de estudio posterior (Figura 3.5).

Figura 3.5.- Bandas aisladas (1F1, 1F2, 2F2 y 3F2) y fracción acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan



Fr AE: fracción acetato de etilo “MeOH combinado” de hoja

Fase estacionaria: Sílica gel 60 F 254

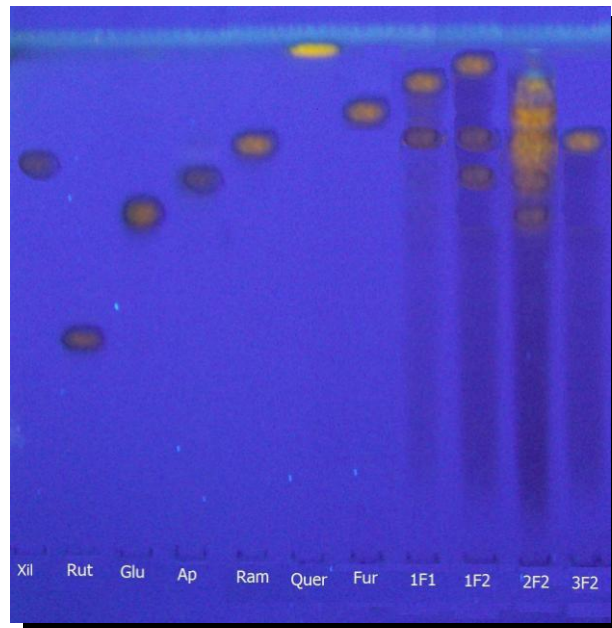
Fase móvil: Acetato de etilo-ACH-Ácido fórmico-Agua (100:11:11:26)

Detección: UV 254 y 366 nm.

Revelador: NP y visualización UV 366 nm.

Por otro lado, se procede a sembrar las bandas aisladas frente a testigos de quercetina y glicosidos de quercetina.

Figura 3.6.- Bandas aisladas (1F1, 1F2, 2F2 y 3F2) frente a testigos



De izquierda a derecha-Xil: quercetina-3-O-xilósido, Glu: quercetina-3-O-glucósido, Ap: quercetina-3-O-arabinopiranosido, Ram: quercetina-3-O-ramósido, Fur: quercetina-3-O-arabinofuranósido.

De acuerdo con el desarrollo cromatográfico se puede preliminarmente informar lo siguiente:

- 1F1: compuesto desconocido (mayoritario)
- 1F2: compuesto desconocido (mayoritario)
- 2F2: posible presencia de Q-3-O-glucósido, Q-3-O-xilósido, Q-3-O-arabinopiranosido, Q-3-O-arabinofuranósido, Q-3-O-ramnósido, compuestos desconocidos
- 3F2: posible presencia de Q-3-O-ramnósido

Posteriormente, se realiza el tratamiento ácido de cada banda aislada y se realizan corridas cromatográficas en diferentes sistemas de solventes.

Agliconas

Fase estacionaria: Celulosa Polygram Cel300

Tabla 3.8.- Valores de Rf de las agliconas de las bandas hidrolizadas frente a testigo de quercetina

Bandas	Rf		
	BuOH-ACH-H ₂ O (6:1:2)	Cl ₃ CH-ACH- H ₂ O (2:1, agua hasta saturación)	Forestal HCl-ACH-H ₂ O (3:30:10)
1F1	0,75	0,29	0,43
1F2	0,75	0,29	0,43
2F2	0,75	0,29	0,43
3F2	0,75	0,29	0,43
Quercetina (testigo)	0,75	0,29	0,43

BuOH-ACH-H₂O (Butanol-ácido acético-agua); Cl₃CH-ACH- H₂O (cloroformo-ácido acético-agua); Forestal HCl-ACH- H₂O (ácido clorhídrico-ácido acético-agua)

Los resultados de la hidrólisis muestran la presencia de quercetina como único aglicón en los 3 sistemas estudiados.

Se procede al estudio del azúcar resultante de la hidrólisis.

Azúcares

Se procede al estudio de los azúcares obtenidos en el tratamiento ácido, para ello se utilizan dos sistemas cromatográficos.

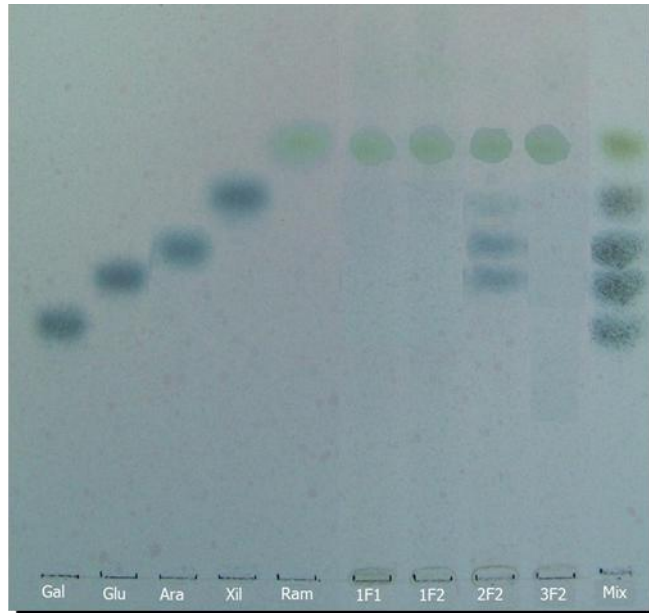
Sistema 1: (Figuras 3.7 y 3.8)

Fase estacionaria: sílica gel 60

Fase móvil: butanol-ácido acético-éter etílico-agua (9:6:3:1)

Revelador: anilina-difenilamina o anisaldehído-sulfúrico.

Figura 3.7.- Corrida cromatográfica de los azúcares provenientes de los hidrolizados de las bandas aisladas y revelado con anilina-difenilamina



Fase estacionaria: sílica gel 60

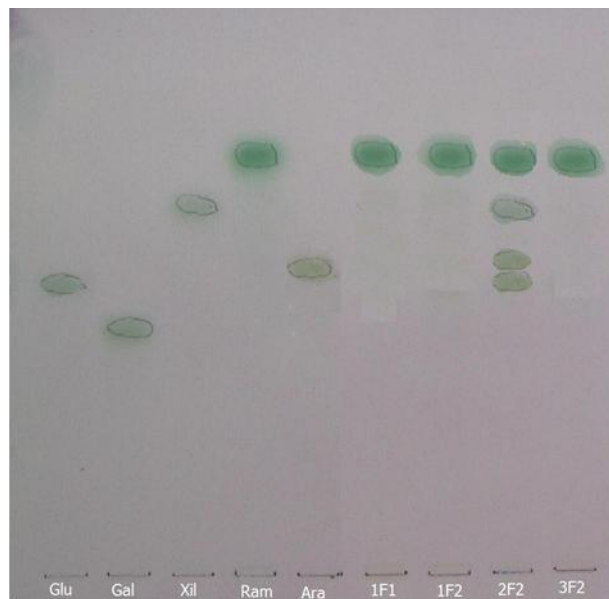
Fase móvil: butanol-ácido acético-éter etílico-agua (9:6:3:1)

Muestra: fase acuosa concentrada resultante de la hidrólisis de las bandas 1F1, 1F2, 2F2 y 3F2.

Testigos: galactosa (Gal), glucosa (Glu), arabinosa (Ara), xilosa (Xil), ramnosa (Ram)

Revelador: anilina-difenilamina.

Figura 3.8.- Corrida cromatográfica de los azúcares provenientes de los hidrolizados de las bandas aisladas y revelado con anisaldehído-sulfúrico.



Fase estacionaria: sílica gel 60

Fase móvil: butanol-ácido acético-éter etílico-agua (9:6:3:1)

Muestra: fase acuosa concentrada resultante de la hidrólisis de las bandas 1F1, 1F2, 2F2 y 3F2.

Testigos: galactosa (Gal), glucosa (Glu), arabinosa (Ara), xilosa (Xil), ramnosa (Ram)

Revelador: anisaldehído sulfúrico

En la tabla 3.9 se indican los valores de Rf de los testigos en el sistema de solventes butanol-ácido acético-éter etílico-agua (9:6:3:1).

Tabla 3.9.- Valores de Rf de los testigos

Compuesto	Rf
Galactosa	0,40
Glucosa	0,48
Arabinosa	0,52
Xilosa	0,60
Ramnosa	0,65

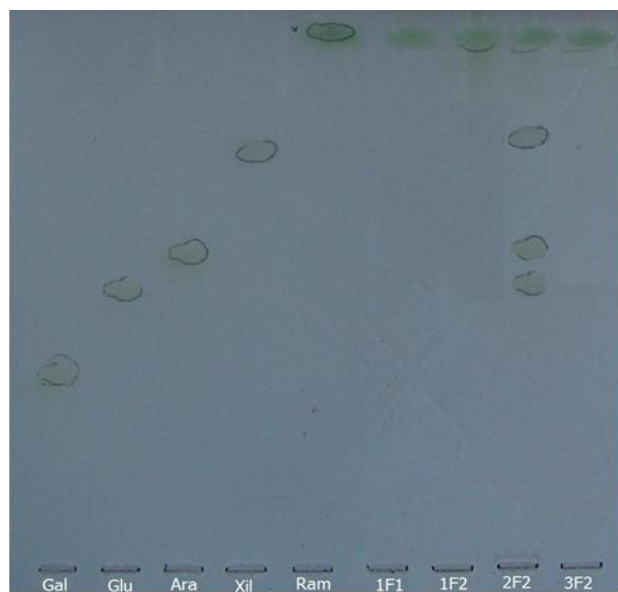
Sistema 2: (Figura 3.9)

Fase estacionaria: sílica gel 60 pretratada con una solución 0,5 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Fase móvil: acetona-isopropanol-ácido láctico (40:40:20)

Revelador: anisaldehído-sulfúrico

Figura 3.9.- Cromatografía de los azúcares provenientes del hidrolizado de las bandas aisladas



Gal: galactosa. Glu: glucosa. Ara: arabinosa. Xil: xilosa. Ram: ramnosa

Tabla 3.10.- Valores de Rf de los testigos

Compuesto	Rf
Galactosa	0,30
Glucosa	0,40
Arabinosa	0,50
Xilosa	0,67
Ramnosa	0,86

Como puede observarse en los distintos sistemas estudiados, los azúcares detectados son los siguientes:

- 1F1: ramnosa, como azúcar principal
- 1F2: ramnosa, como azúcar principal
- 2F2: ramnosa, arabinosa, glucosa y xilosa
- 3F2: ramnosa

Ácido gálico

En el hidrolizado de las bandas 1F1, 1F2, 2F2 y 3F2 también se estudia la presencia de ácido gálico (Figura 3.10).

Figura 3.10.- Hidrolizado de las bandas 1F1, 1F2, 2F2 y 3F2 frente a testigo de ácido gálico



AG: ácido gálico

Fase estacionaria: sílica gel 60

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico-metanol (30:30:8:2)

Muestras: hidrolizado de las bandas 1F1, 1F2, 2F2 y 3F2 y testigo de ácido gálico.

Detección: UV 254 y 366 nm.

Revelador: reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N

Tabla 3.11.- Valores de Rf del ácido gálico y los compuestos presentes en los hidrolizados de las bandas purificadas

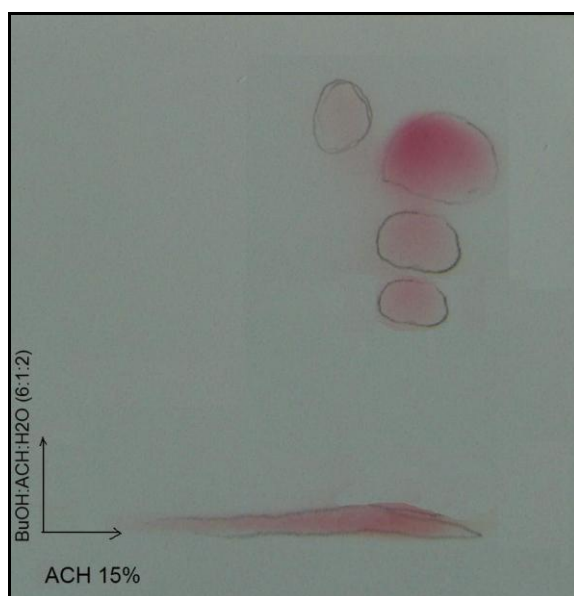
Bandas	Rf
1F1	0,7
1F2	0,7
2F2	0,7
Ácido gálico (testigo)	0,7

Se observa la presencia de ácido gálico en los hidrolizados correspondientes a las bandas 1F1, 1F2 y 2F2.

3.3.1.2. Taninos condensados (o proantocianidinas)

En los cromatogramas de los extractos y las fracciones obtenidos de hojas y tallos de *Ligaria cuneifolia*, al ser tratados con el reactivo vainillina clorhídrico, se observan manchas de color rojo que corresponden a las proantocianidinas (Figuras 3.11 y 3.12).

Figura 3.11.- Cromatograma bidimensional de la fracción “MeOH combinado-AE”
revelado con el reactivo vainillina clorhídrico



Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

Fase móvil: butanol-ácido acético-agua (6:1:2) (primera dimensión) y ACH 15 % (segunda dimensión)

Muestras: fracción “MeOH combinado AE”

Revelador: vainillina/ácido clorhídrico

Figura 3.12.- Cromatogramas unidireccionales de la fracción “MeOH combinado-AE”
con fase móvil con distinta polaridad



Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

Fase móvil: ácido acético al 6 %, 15 % y 30 %

Muestra: fracción “MeOH combinado-AE”

Revelador: vainillina/ácido clorhídrico

En los cromatogramas de la figura 3.13 se realiza la identificación de la catequina en la fracción “MeOH combinado-AE” frente a testigo de catequina y el dímero proantociandina B2 (PB2) y se utilizan diferentes fases móviles:

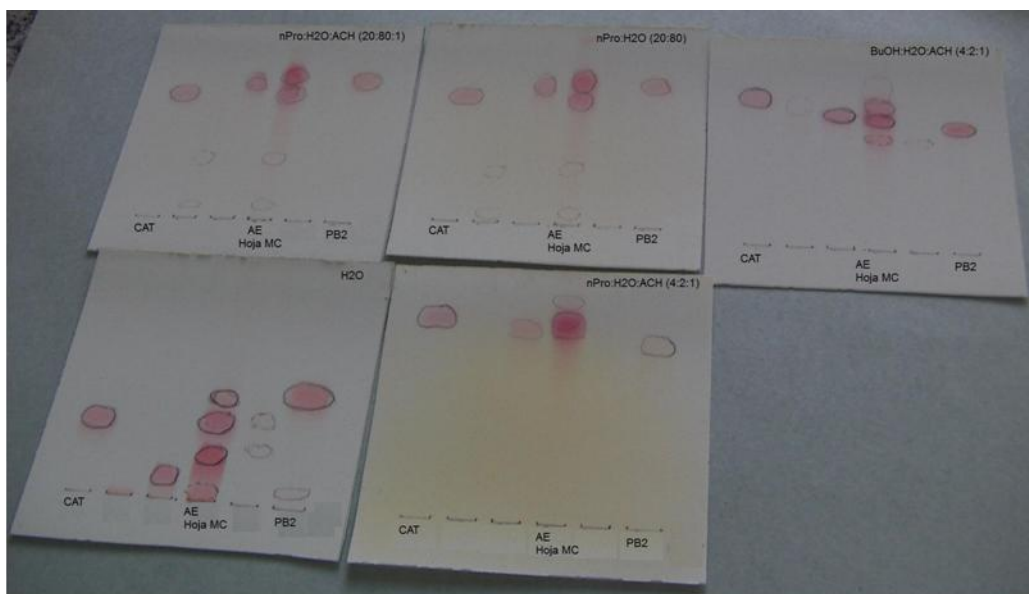
n-propanol-agua-ácido acético (20:80:1)

n-propanol-agua (20:80)

butanol-agua-ácido acético (4:2:1)

n-propanol-agua-ácido acético (4:2:1)

Figura 3.13.- Fracción acetato de etilo proveniente de las muestras de San Juan (hoja) frente a testigos



Calle I: catequina (CAT), calle IV: fracción “MeOH combinado-AE” (AE hoja MC), calles II, III y V: bandas semipurificadas, calle VI: procianidina B2 (PB2).
 Fases móviles (de izquierda a derecha) I: n propanol-agua-ácido acético (20:80:1); II: n propanol-agua (20:80); III: butanol-agua-ácido acético (4:2:1); IV: agua; V: n propanol-agua-ácido acético (4:2:1)

Tabla 3.12- Rf de los testigos en los distintos sistemas ensayados

Compuesto	Rf				
	nPro-agua-ACH (20:80:1)	nPro-agua (20:80)	BuOH-agua-ACH (4:2:1)	Agua	nPro-agua-ACH (4:2:1)
Catequina	0,65	0,62	0,71	0,29	0,79
PB2	0,72	0,71	0,59	0,45	0,71

nPro: n-propanol. ACH: ácido acético. BuOH: butanol. PB2: procianidina B2

De acuerdo con los valores de Rf en los diferentes solventes se observa coincidencia con los valores de Rf del testigo de catequina.

Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

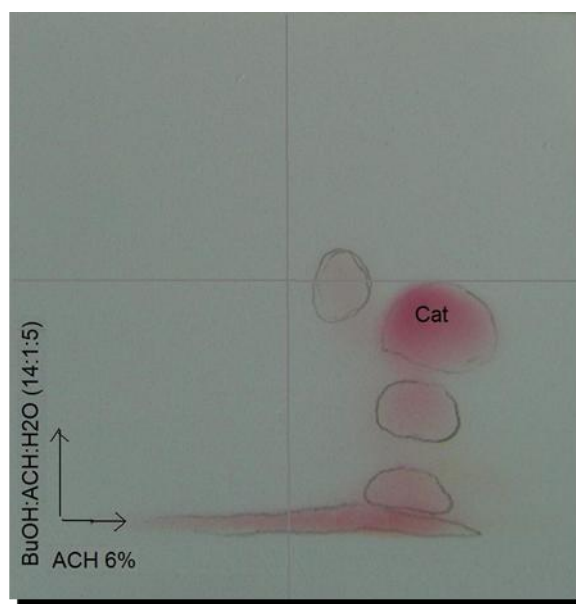
Muestra: fracción “MeOH combinado-AE”

Testigos: catequina y procianidina B2 (PB2)

Revelador: vainillina/ácido clorhídrico

En la figura 3.14 se realiza una cromatografía bidimensional de la fracción “MeOH combinado-AE” para mostrar la ubicación de la catequina.

Figura 3.14.- Cromatografía bidimensional de la fracción “MeOH combinado-AE”
revelado con vainillina clorhídrico



Cat: catequina

Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300

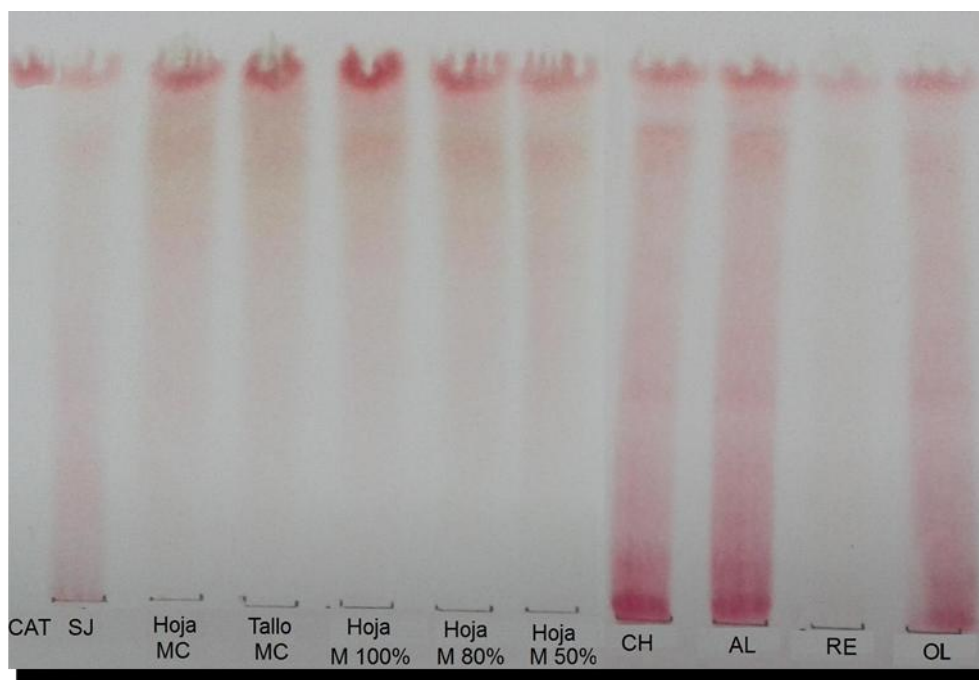
Fase móvil: butanol-ACH-agua (14:1:5) (primera dimensión); ACH 6 % (segunda dimensión)

Muestra: fracción “MeOH combinado-AE”

Revelador: vainillina/ácido clorhídrico

En el cromatograma de la figura 3.15 se observa un estudio comparativo de las muestras estudiadas.

Figura 3.15.- Cromatograma de las muestras estudiadas revelado con vainillina/clorhídrico



De izquierda a derecha: catequina (CAT), San Juan comercial (SJ), hoja MeOH combinado (Hoja MC), tallo metanol combinado (Tallo MC), hoja metanol 100 % (Hoja M 100 %), metanol 80 % (Hoja M 80 %), metanol 50 % (Hoja M 50%), muestras de Catamarca: “chañar” (CH), “algarrobo” (AL), “retama” (RE), “olivo” (OL).

Fase estacionaria: sílica gel 60 F₂₅₄

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26)

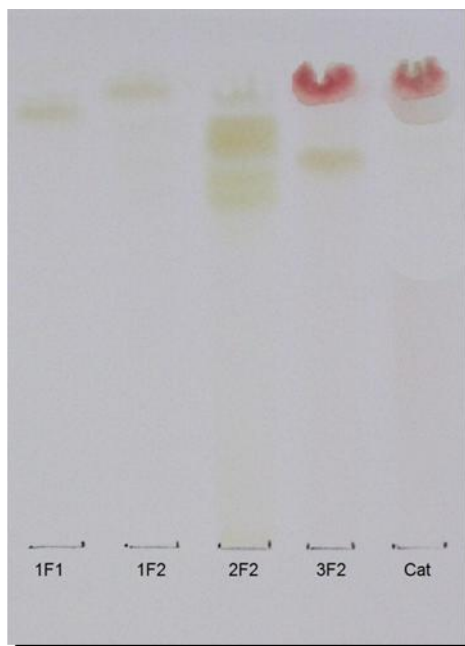
Muestras: fracción acetato de etilo (provenientes de los extractos metanólicos combinado, metanol, metanol 80 %, metanol 50 % de hoja y metanol combinado de tallo) proveniente de las muestras de San Juan, extractos metanólicos de las muestras de Catamarca (hospedantes: “chañar”, “algarrobo”, “retama” y “olivo”), muestra comercial de San Juan y testigo de catequina.

Revelador: vainillina/ácido clorhídrico

Sobre la base de los resultados obtenidos en los distintos sistemas, se observa la presencia de catequina (por coincidencia de R_f con el testigo) y de otras proantocianidinas de mayor peso molecular.

En la figura 3.16 se estudia la presencia de taninos condensados en las bandas purificadas 1F1, 1F2, 2F2 y 3F2 obtenidas a partir de la fracción acetato de etilo “MeOH-combinado” (hoja), de las muestras provenientes de San Juan.

Figura 3.16.- Bandas purificadas a partir de la fracción acetato de etilo de las muestras de San Juan frente a catequina



Cat: catequina

Fase estacionaria: sílica gel 60 F₂₅₄

Fase móvil: acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético glacial - agua (100:11:11:26)

Muestras: bandas 1F1, 1F2, 2F2, 3F2 y testigo de catequina.

Revelado: vainillina/ácido clorhídrico.

Puede observarse la presencia de catequina en la banda 3F2, por coincidencia con el R_f del testigo.

3.3.2. Electroforesis capilar

Desarrollo del método

El buffer borato ha sido ampliamente utilizado para el análisis de flavonoides dada su capacidad de formar complejos con los aglicones y/o glicósidos (Schmitt-Koppling y col., 1998). Inicialmente, se ensayó un sistema de electroforesis capilar zonal consistente en el uso de buffer borato (entre 20 mM y 30 mM) y el pH en un rango de 7 a 9. El pH superior a 7 posibilitó una mejora en la resolución. En cuanto a la molaridad

del buffer, se eligió trabajar con 20 mM ya se logró una adecuada capacidad buffer con un valor de amperaje bajo. Dado que no se obtuvo una completa separación de los analitos, se decidió añadir al sistema un surfactante, para lo cual se trabajó con SDS en una concentración de 50 mM y pH 8,3 (este pH resultó óptimo, tal como lo indica Pietta y col., 1994) con el fin de estudiar el comportamiento de los compuestos de interés en un sistema micelar. En tal sentido, se observó una mejora en la separación respecto del sistema de electroforesis zonal por lo cual se decidió utilizar este sistema y ensayar el agregado de modificadores para su optimización. Dado que entre los analitos ensayados se encuentran los enantiómeros catequina y epicatequina, se añadió un selector quiral (en este caso, se prueban distintos tipos de ciclodextrinas, tales como HP- β -CD (2-Hidroxipropil- β -CD), Heptakis (2,6-di-O-metil)- β -CD (DM- β -CD), Heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- β -CD (TM- β -CD), γ -CD y combinación de ellas para posibilitar su separación. Se optó por el uso de β -ciclodextrina en concentración 5 mM. Esto no sólo posibilitó la separación de los enantiómeros sino que también mejoró la resolución entre los glicósidos de quercetina estudiados, lo cual implica la interacción de la ciclodextrina con los flavonoides mediante la formación de complejos, lo cual ha sido estudiado por espectrometría de masa y RMN (Guo y col., 2004; Yu y col., 2007; Jullian y col., 2007). La utilización de un modificador orgánico (se probó el uso de metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano en distintas proporciones y combinaciones de ellos y se optó por el uso de metanol 10 %) y de una segunda ciclodextrina (β -CD sulfatada 2 % P/V) permitieron lograr una resolución óptima para los compuestos de interés. Además, se ensayaron condiciones de corrida, tales como voltaje, volumen de inyección y temperatura.

La detección se efectuó a dos longitudes de onda, 255 nm para los glicósidos de flavonoles y 280 nm para los taninos condensados.

De acuerdo con lo mencionado en Materiales y Métodos, el sistema optimizado para el análisis de los extractos consistió en:

- capilar de 60 cm;
- voltaje, 20 kV;
- temperatura de corrida, 25 °C;
- temperatura rack, 10 °C;
- inyección hidrodinámica, 3 seg, 0,3 psi;

- detección, UV-DAD 255 y 280 nm;
- BGE: buffer borato 20 mM pH 8,3; SDS 50 mM; β -CD 5 mM, β -CD sulfatada 2 % P/V y MeOH 10 %.
- Muestra: solución mezcla de testigos (detallada en 2.4.2. de Materiales y Métodos)

En la tabla 3.13 se presentan los valores obtenidos para N (platos teóricos) y R (resolución) del método optimizado (de acuerdo con USP 37, capítulo <621>). Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Tabla 3.13.- Valores de concentración, tiempo de migración, N y R del método optimizado para los analitos de interés

Compuesto	T _m (minutos)	Concentración (μ g/ml)	N	R*
Catequina	12,533	12,0	145390	
Epicatequina	13,121	16,0	171092	4,55
PB2	14,971	16,0	133313	12,72
Rutina	15,564	8,0	167916	3,69
Quercetina-3-O-glucósido	17,438	6,0	140308	11,14
Quercetina-3-O-xilósido	17,804	4,6	157008	2,00
Quercetina-3-O-arabinopiranosido	18,129	4,6	270819	2,04
Quercetina-3-O-arabinofuranósido	18,324	6,6	168024	1,20
Quercetina-3-O-ramnósido	18,762	8,0	137797	2,32
Quercetina	22,462	8,0	61227	13,09

PB2: procianidina B2; T_m: tiempo de migración; N: platos teóricos; *R: resolución, con respecto al pico del compuesto anterior.

Validación

Para los extractos naturales, los parámetros de validación habitualmente estudiados comprenden la determinación del límite de detección (LOD, *limit of detection*) y límite de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*), precisión en el día y entre días y linealidad, de acuerdo con los lineamientos de la guía Q2 (R1) de ICH. Se trabajó a dos longitudes de onda, 255 nm para los glicósidos de flavonoles y 280 nm los para taninos condensados (catequina, epicatequina y procianidina B2).

Límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ)

Se determina por la relación señal/ruido (S/N), de acuerdo con lo detallado en Materiales y Métodos. LOD= 3 S/N y LOQ= 10 S/N. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tabla 3.14.- LOD y LOQ para los analitos de interés

Compuesto	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
Catequina	0,39	1,30
Epicatequina	0,84	2,81
Procianidina B2 (PB2)	0,37	1,25
Rutina	0,14	0,47
Quercetina-3-O-glucósido	0,11	0,35
Quercetina-3-O-xilósido	0,11	0,36
Quercetina-3-O-ramnósido	0,09	0,30
Quercetina-3-O-arabinofuranósido	0,08	0,26
Quercetina-3-O-arabinopiranosido	0,09	0,31
Quercetina	0,10	0,33

Precisión

La precisión se evalúa en el día (n=6) y entre días (durante 3 días, n=18). Se evalúa el tiempo de migración y el área del pico y el resultado se expresa como RSD por ciento.

Tabla 3.15.- Determinación de la precisión intra e interdía (área y tiempo de migración) para los analitos de interés

Compuesto	RSD (%)			
	En el día (n=6)		Entre días (n=18)	
	Área (AU)	Tiempo de migración (min)	Área (AU)	Tiempo de migración (min)
Catequina	1,6	0,3	2,1	0,5
Epicatequina	2,0	0,3	2,5	0,4
Procianidina B2 (PB2)	2,5	0,2	3,0	0,3
Rutina	2,7	0,3	3,1	0,5
Quercetina-3-O-glucósido	2,6	0,4	3,2	0,5
Quercetina-3-O-xilósido	3,0	0,4	3,2	0,6
Quercetina-3-O-ramnósido	3,1	0,4	3,2	0,5
Quercetina-3-O-arabinofuranósido	1,7	0,4	2,5	0,5
Quercetina-3-O-arabinopiranosido	2,8	0,5	3,2	0,6
Quercetina	2,7	0,6	3,2	0,7

Linealidad

Se evalúa en 6 niveles (50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 200 % y 300 %), cada uno de ellos por triplicado.

Tabla 3.16.- Determinación de la linealidad para los analitos de interés

Compuesto	Rango ($\mu\text{g/ml}$)	Ecuación	R^2
Catequina	6,0 - 36,0	$174,42x + 9,6369$	0,9939
Epicatequina	8,0 - 48,0	$71,318x - 2,8854$	0,9926
PB2	8,0 - 48,0	$181,96x + 10,389$	0,9940
Rutina	4,0 - 24,0	$347,61x + 5,7686$	0,9932
Q-3-O-glucósido	3,0 - 18,1	$448,45x + 0,8832$	0,9936
Q-3-O-xilósido	2,3 - 13,7	$484,95x - 3,7941$	0,9923
Q-3-O-ramnósido	2,3 - 13,8	$594,50x - 1,0998$	0,9924
Q-3-O-arabinofuranósido	3,3 - 19,7	$624,59x + 7,3609$	0,9944
Q-3-O-arabinopiranosido	4,0 - 24,0	$544,61x + 7,9682$	0,9978
Quercetina	4,0 - 24,0	$567,45x - 7,4034$	0,9972

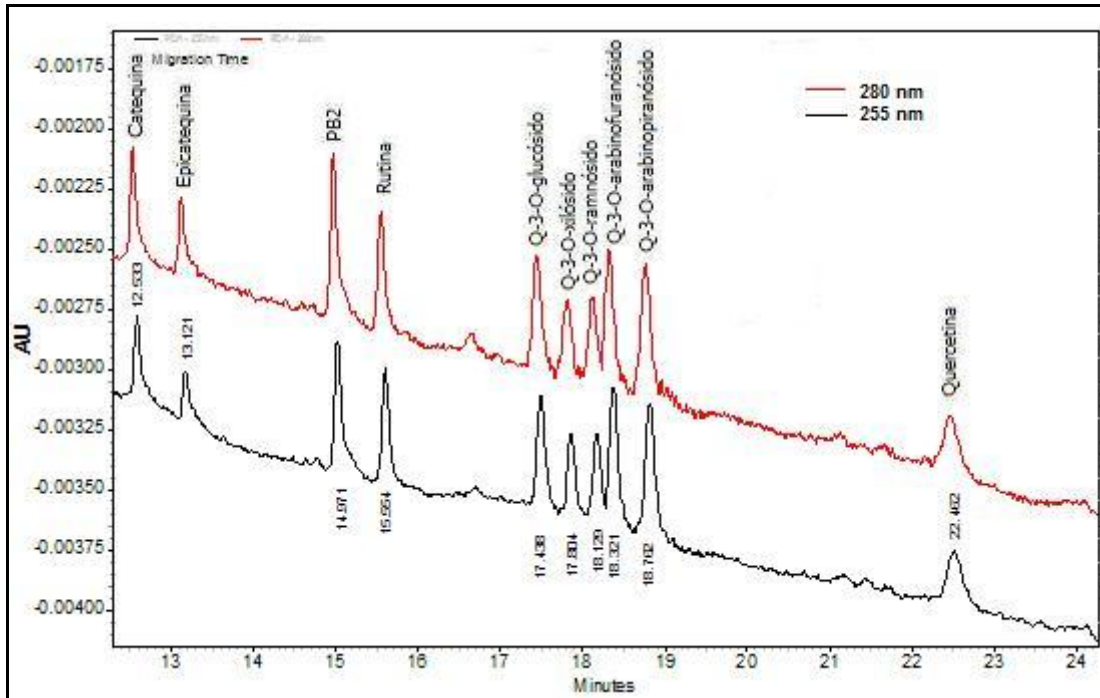
Aplicación

Glicósidos de flavonoles y taninos condensados (o proantocianidinas)

El sistema desarrollado permite detectar en forma simultánea la presencia de glicósidos de flavonoles y de taninos condensados.

Se presentan los electroferogramas obtenidos para la mezcla de testigos, las fracciones acetato de etilo (obtenidas a partir de distintas combinaciones de metanol-agua) de las hojas y los tallos herbáceos de las muestras provenientes de San Juan, los extractos metanólicos de las muestras provenientes de Catamarca y la muestra comercial de San Juan. Cada determinación se realizó por triplicado.

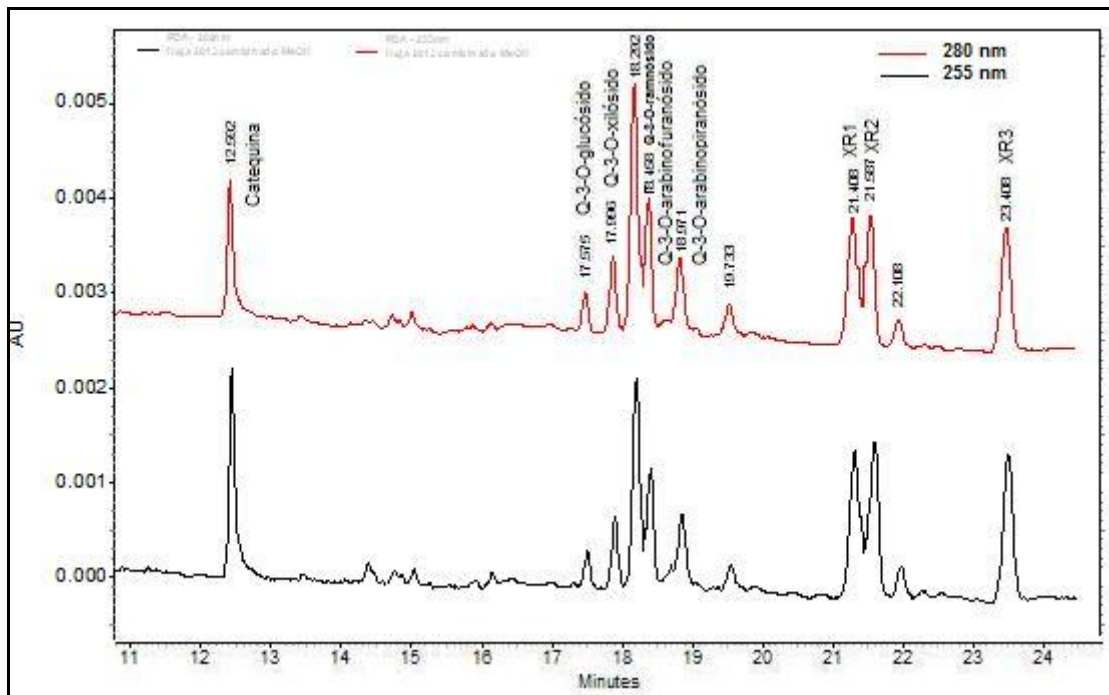
Figura 3.17.- Solución mezcla de testigos (255 y 280 nm)



PB2 (prociandina B2), Q-3-O-glucósido (quercetina-3-O-glucósido), Q-3-O-xilósido (quercetina-3-O-xilósido), Q-3-O-ramnósido (quercetina-3-O-ramnósido), Q-3-O-arabinofuranósido (quercetina-3-O-arabinofuranósido), Q-3-O-arabinopiranosido (quercetina-3-O-arabinopiranosido).

Figura 3.18.- Fracción acetato de etilo (metanol combinado) proveniente de la muestra de San Juan (hoja) con la asignación preliminar de los compuestos principales.

Visualización a 255 y 280 nm



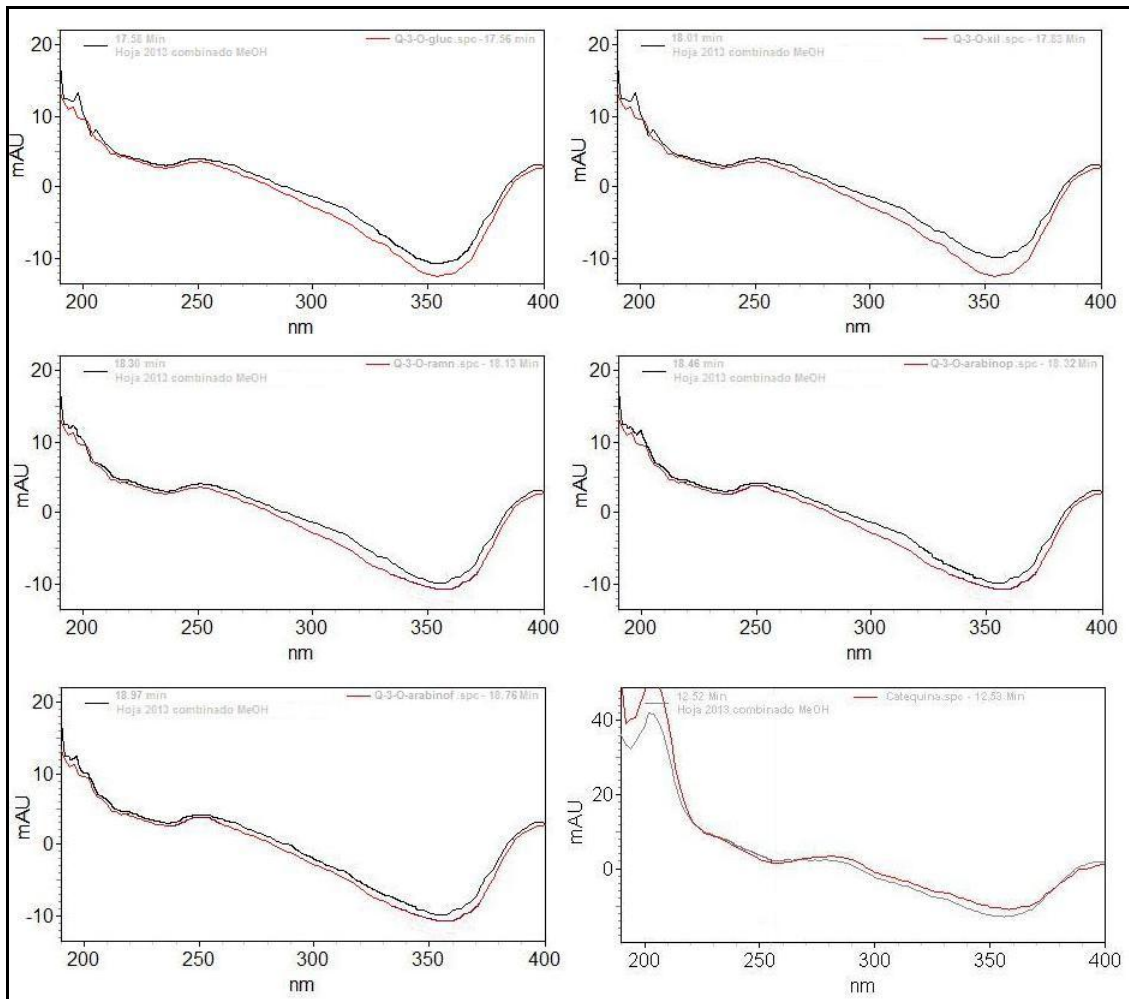
En la tabla 3.17 se presentan los tiempos de migración de los picos principales junto con su asignación preliminar, en el electroferograma correspondiente a la fracción “MeOH combinado-AE”.

Tabla 3.17.- Tiempos de migración de los picos principales en la fracción “MeOH combinado-AE”.

Compuesto	Tiempo de migración (minutos)
Catequina	12,592
Quercetina-3-O-glucósido	17,575
Quercetina-3-O-xilósido	17,896
Quercetina-3-O-ramnósido	18,232
Quercetina-3-O-arabinofuranósido	18,458
Quercetina-3-O-arabinopiranosido	18,971
XR1	21,408
XR2	21,587
XR3	23,408

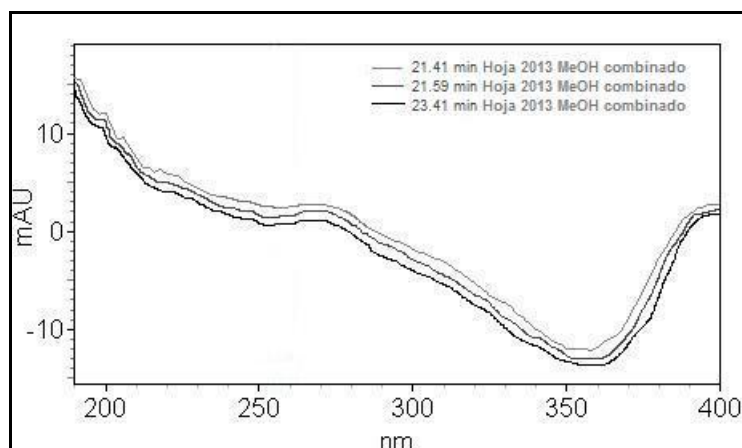
XR1, XR2 y XR3: compuestos desconocidos

Figura 3.19.- Comparación de los espectros entre los compuestos principales y los testigos correspondientes



De izquierda a derecha: quercetina-3-O-glucósido; quercetina-3-O-xilósido; quercetina-3-O-ramnósido; quercetina-3-O-arabinopiranosido; quercetina-3-O-arabinofuranósido; catequina

Figura 3.20.- Comparación de los espectros entre los compuestos XR1, XR2 y XR3



Mediante la co-cromatografía y la comparación de espectros frente a testigos, puede observarse preliminarmente la presencia de catequina, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-ramnósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido y quercetina-3-O-arabinofuranósido. Asimismo, se detectan 3 compuestos desconocidos, cuyos espectros UV coinciden entre sí. Han sido nombrados como XR1, XR2 y XR3. Se observa un desplazamiento de la banda II hacia un valor de 260 nm.

A continuación, se presentan los electroferogramas correspondientes a la fracción acetato de etilo de las muestras de San Juan obtenidas a partir de distintas proporciones de metanol-agua.

Figura 3.21.- Fracción acetato de etilo (a partir de metanol 100 %) proveniente de la muestra de San Juan (hoja)

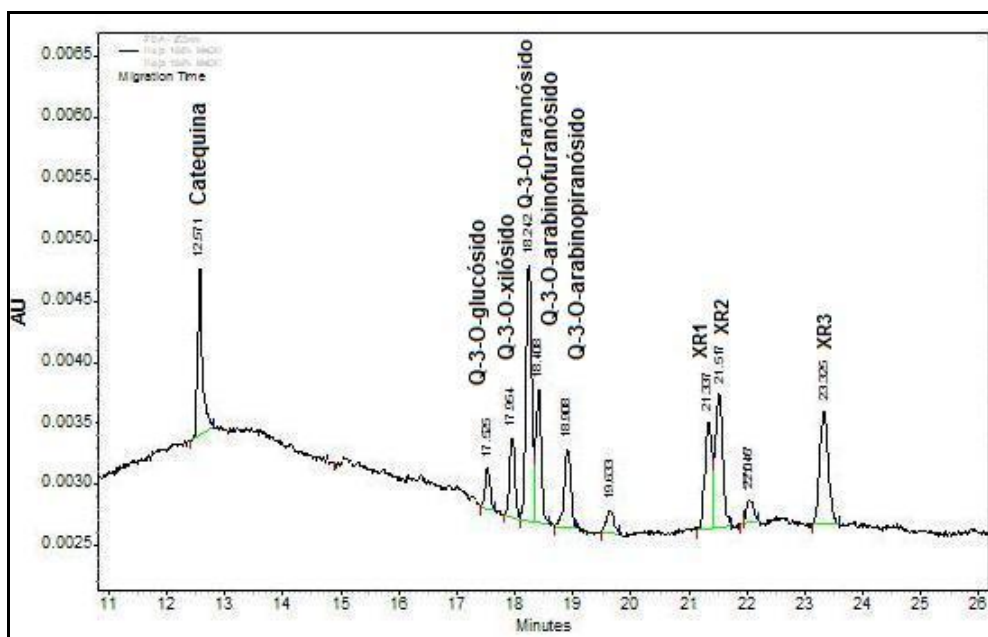


Figura 3.22.- Fracción acetato de etilo (a partir de metanol 80 %) proveniente de la muestra de San Juan (hoja)

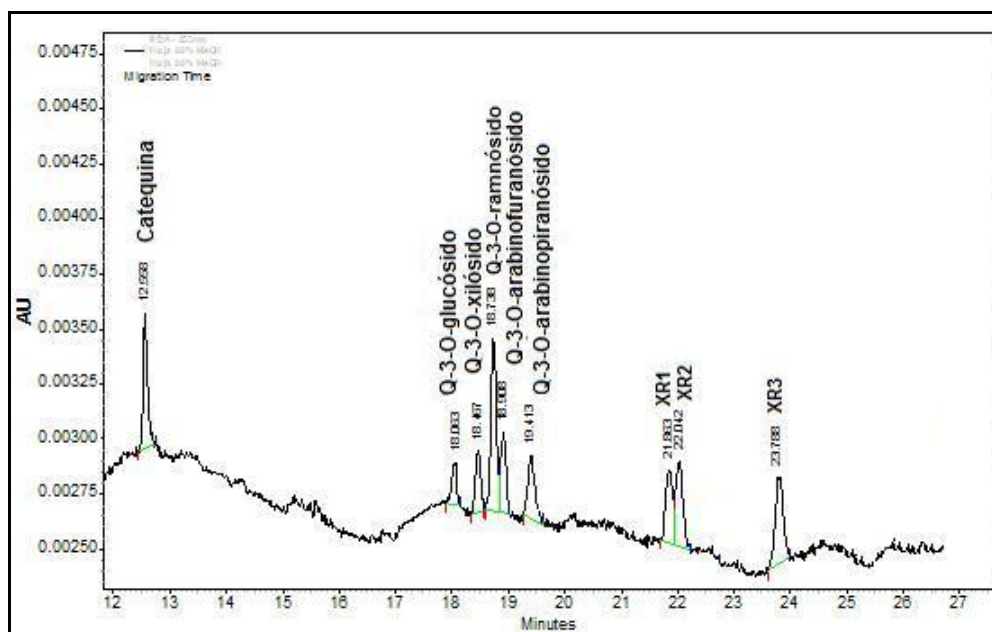


Figura 3.23.- Fracción acetato de etilo (a partir de metanol 50 %) proveniente de la muestra de San Juan (hoja)

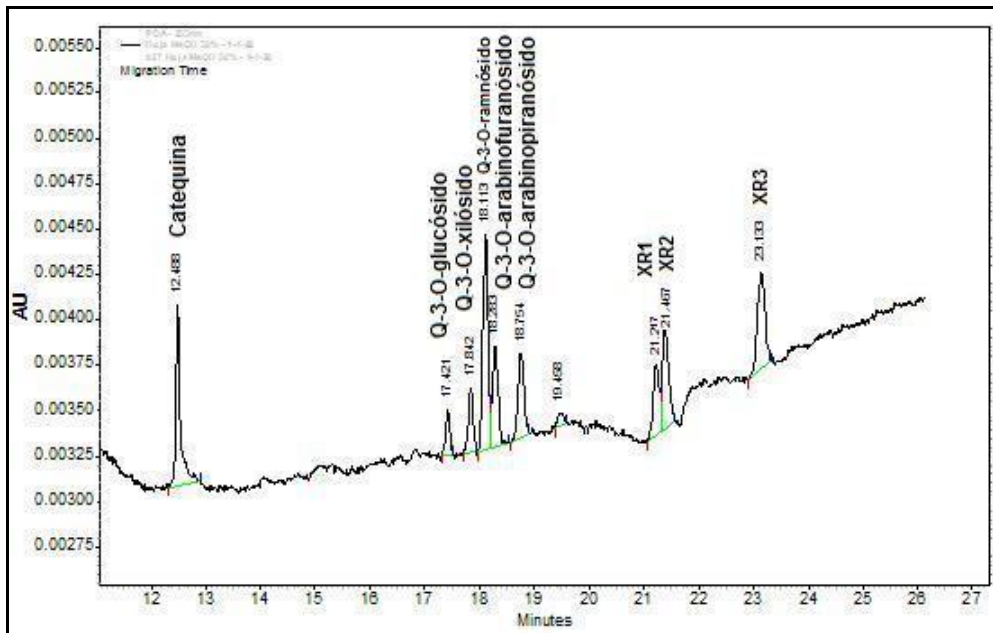


Figura 3.24.- Fracción acetato de etilo (a partir de las extracciones con distintas proporciones de metanol) proveniente de la muestra de San Juan (tallo)

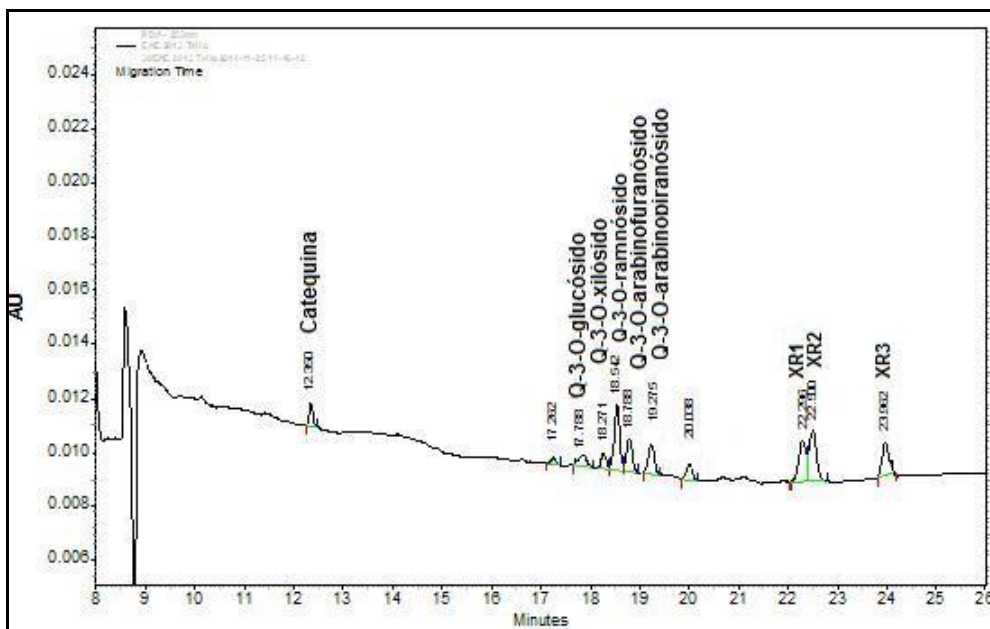


Figura 3.25.- Extracto metanólico proveniente de la muestra comercial de San Juan

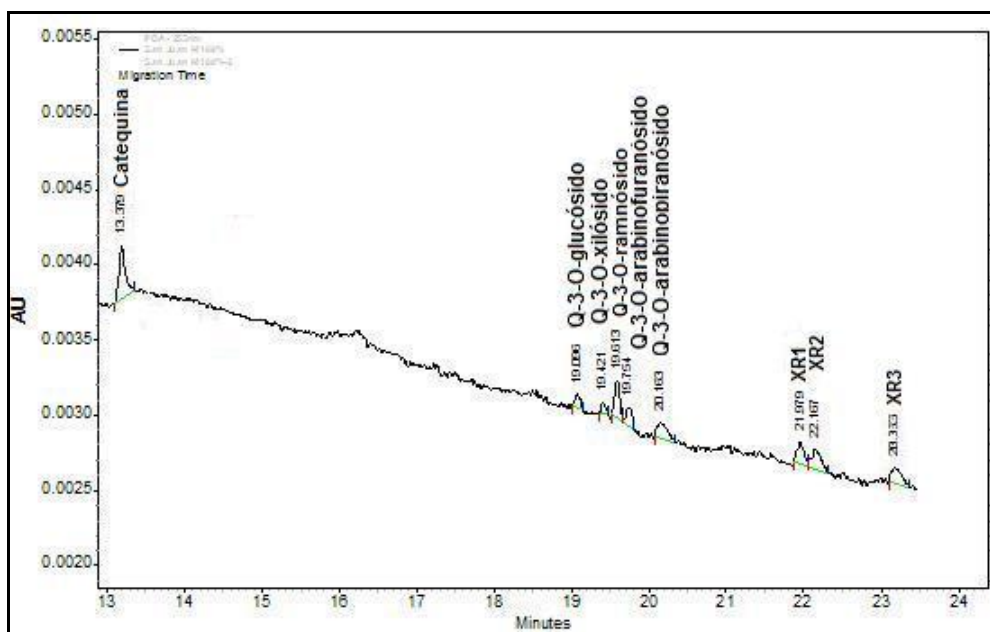


Figura 3.26.- Comparación de los espectros de los picos principales de la muestra comercial de San Juan

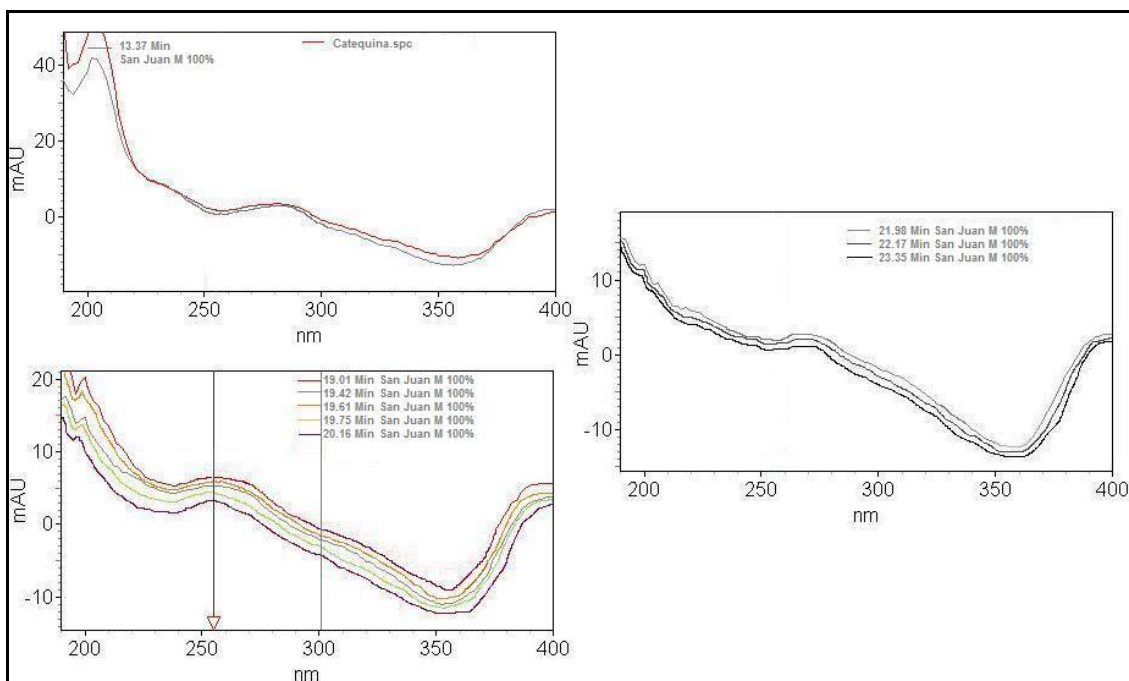
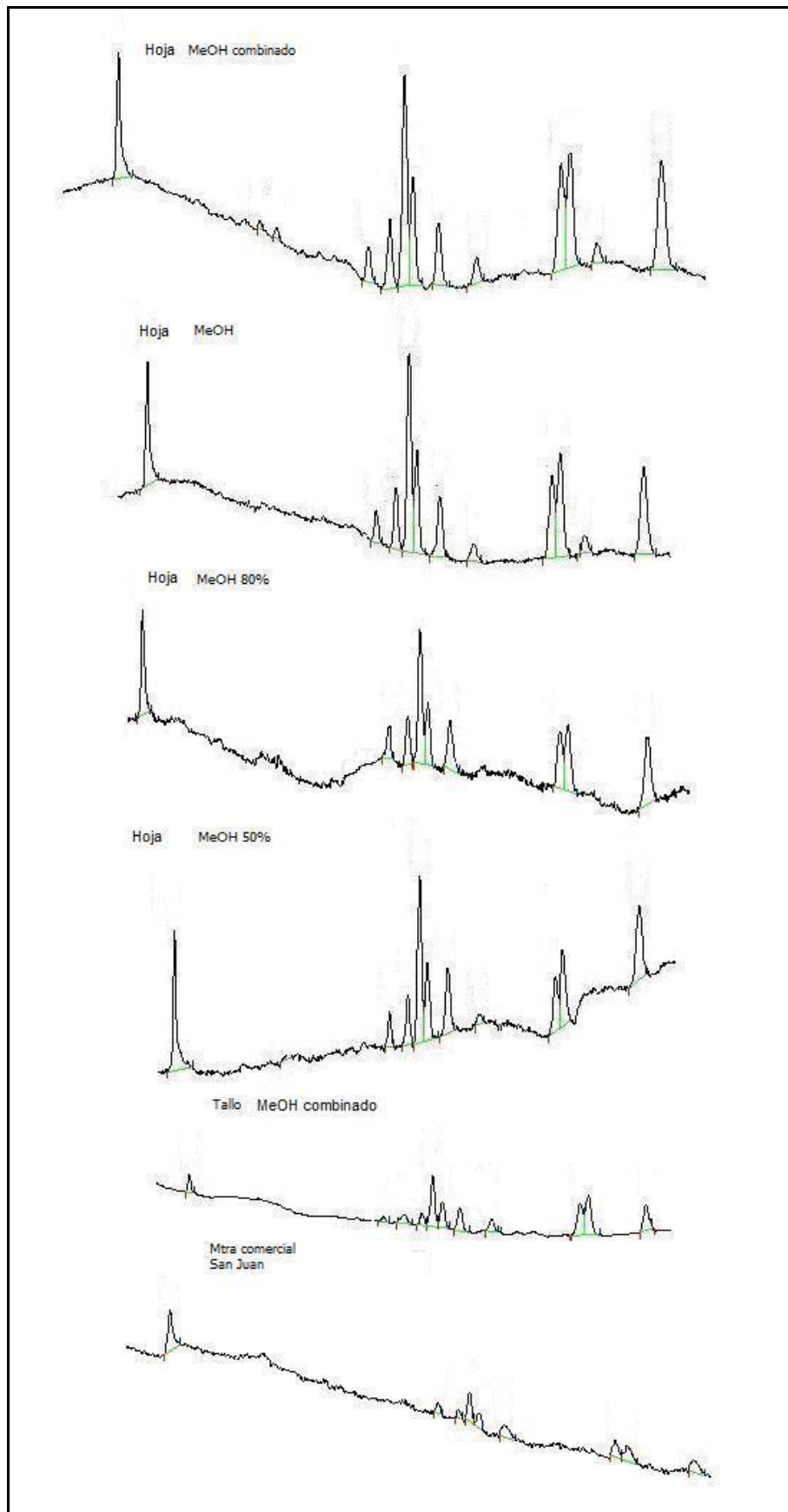


Figura 3.27.- Comparación entre los perfiles cromatográficos de las muestras provenientes de San Juan



Se observa la similitud entre los perfiles cromatográficos de las muestras de San Juan. En la tabla 3.18. se observa un resumen de los compuestos encontrados en las muestras de San Juan (las fracciones acetato de etilo correspondientes a las extracciones con metanol y distintas combinaciones de metanol-agua y el extracto metanólico correspondiente a la muestra comercial de San Juan).

Tabla 3.18.- Compuestos presentes en las muestras de San Juan

	Hoja				Tallo	Muestra
	Fracción acetato de etilo				Fracción acetato de etilo	comercial Hoja
	MeOH combinado	MeOH 100 %	MeOH 80 %	MeOH 50 %	MeOH combinado	MeOH 100 %
Compuestos	Catequina	Catequina	Catequina	Catequina	Catequina	Catequina
	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G
	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X
	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP
	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF
	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM
	XR1	XR1	XR1	XR1	XR1	XR1
	XR2	XR2	XR2	XR2	XR2	XR2
	XR3	XR3	XR3	XR3	XR3	XR3

Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido; Q-3-O-AF: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-RAM: quercetina-3-O-ramnósido; XR1, XR2, XR3: compuestos desconocidos.

A continuación, se presentan los electroferogramas correspondientes a los extractos metanólicos de las muestras provenientes de Catamarca, sobre distintos hospedantes (“chañar”, “algarrobo”, “retama” y “olivo”).

Figura 3.28.- Extracto metanólico proveniente de la muestra de Catamarca (hospedante: “chañar”)

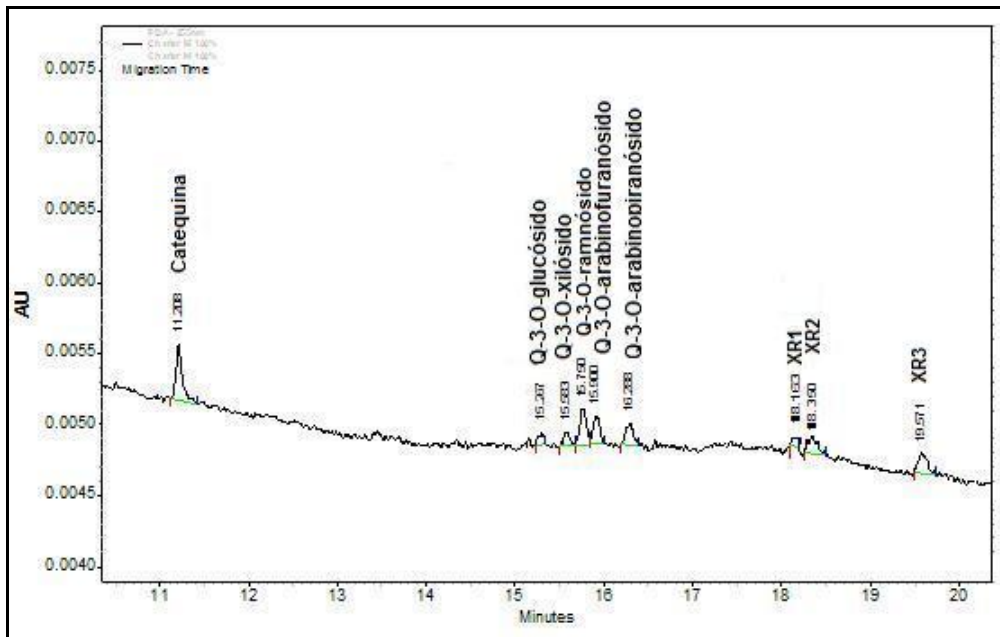


Figura 3.29.- Comparación de los espectros de los picos principales de la muestra proveniente de Catamarca (hospedante “chañar”)

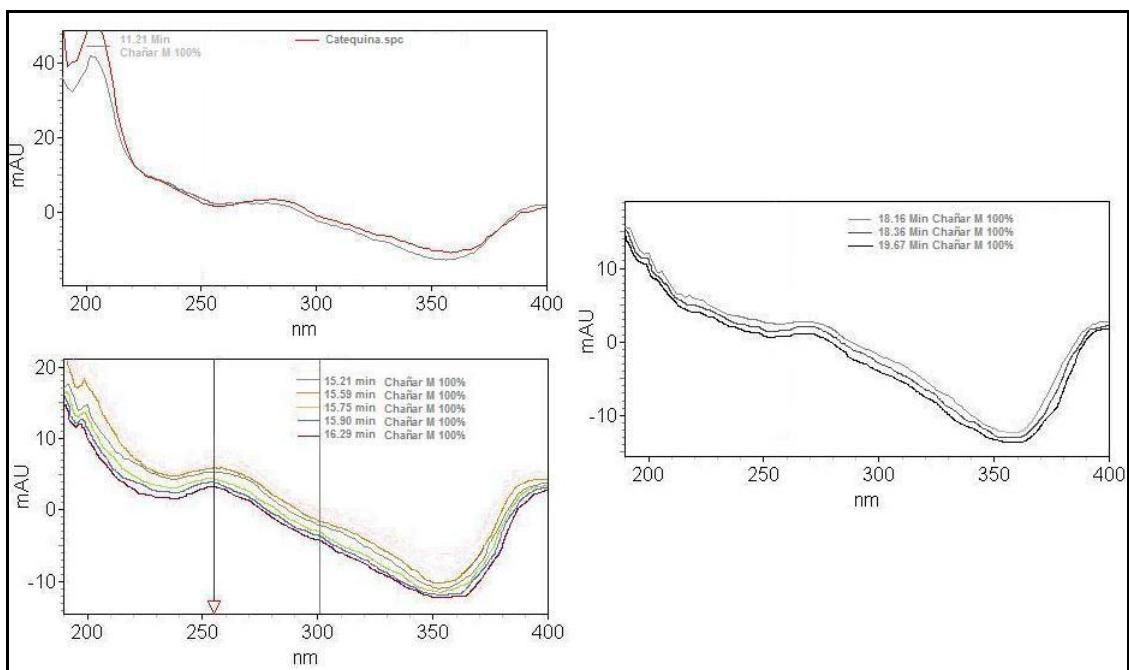


Figura 3.30.- Extracto metanólico proveniente de la muestra de Catamarca (hospedante “retama”)

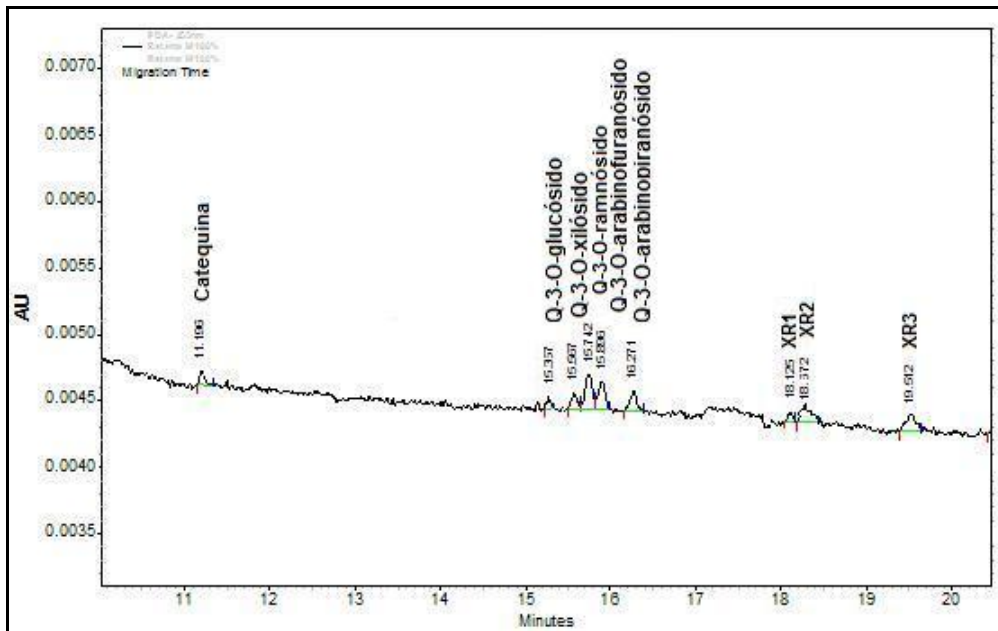


Figura 3.31.- Comparación de espectros de los picos principales de la muestra proveniente de Catamarca (hospedante “retama”)

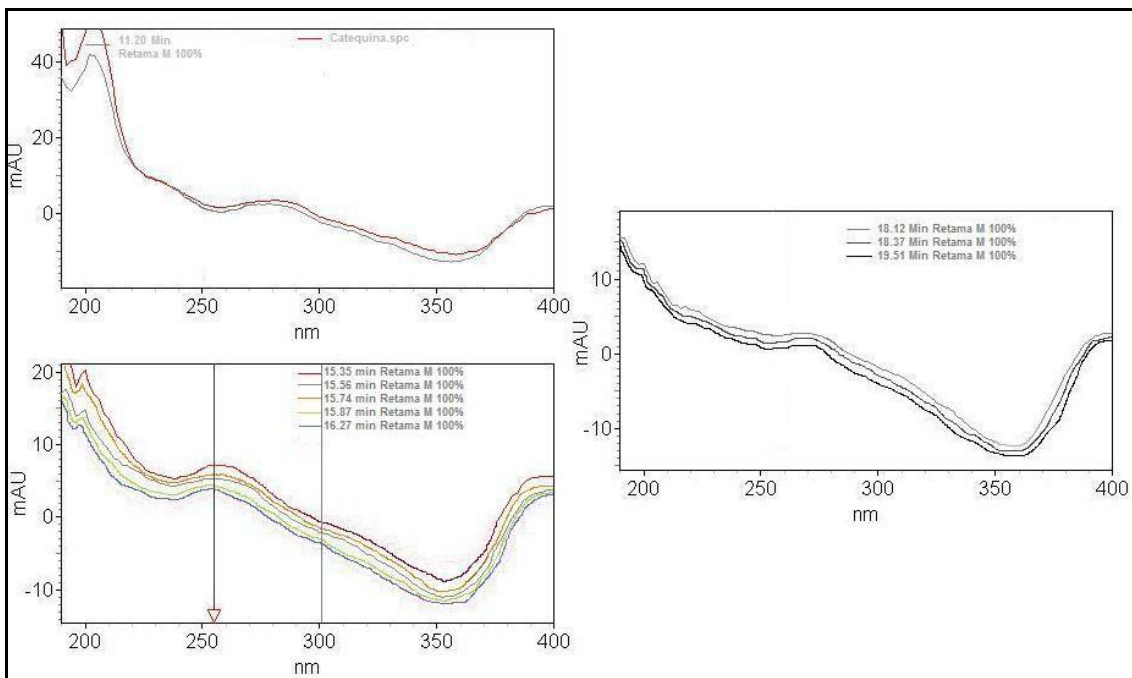


Figura 3.32.- Extracto metanólico proveniente de la muestra de Catamarca (hospedante “algarrobo”)

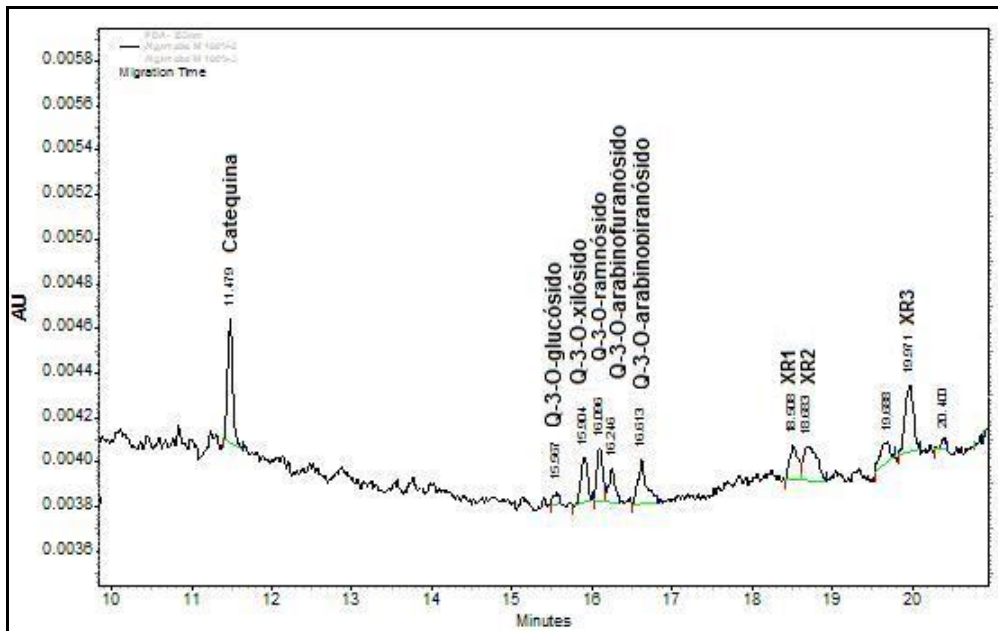


Figura 3.33.- Comparación de espectros de los picos principales de la muestra proveniente de Catamarca (hospedante “algarrobo”)

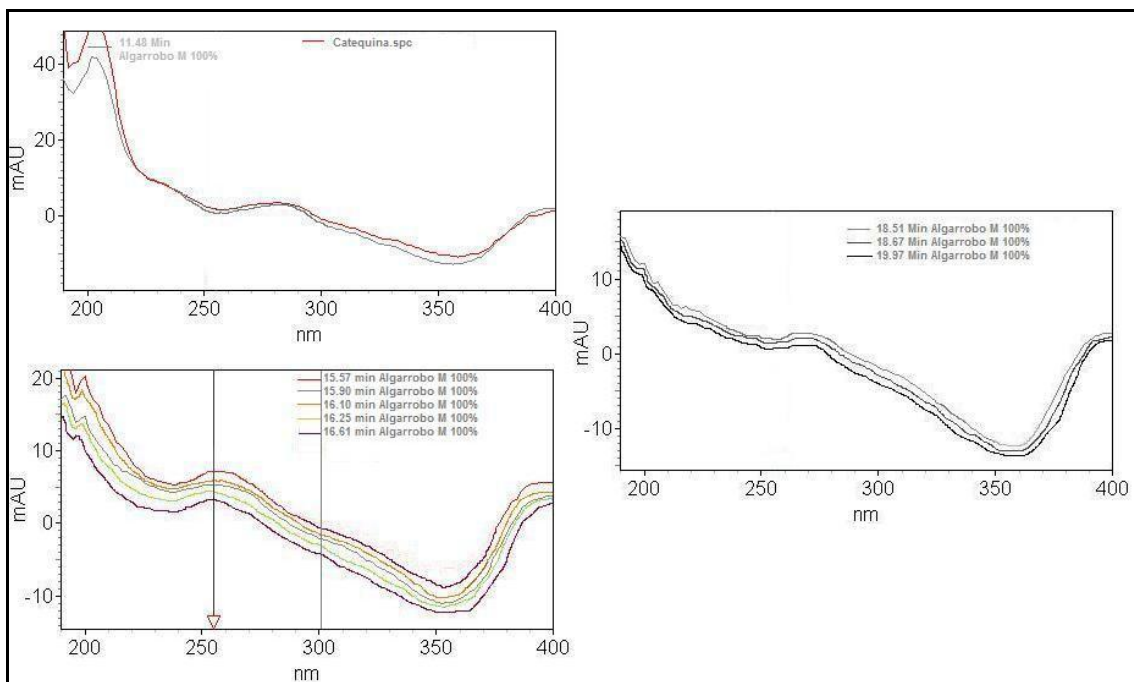


Figura 3.34.- Extracto metanólico proveniente de la muestra de Catamarca (hospedante “olivo”)

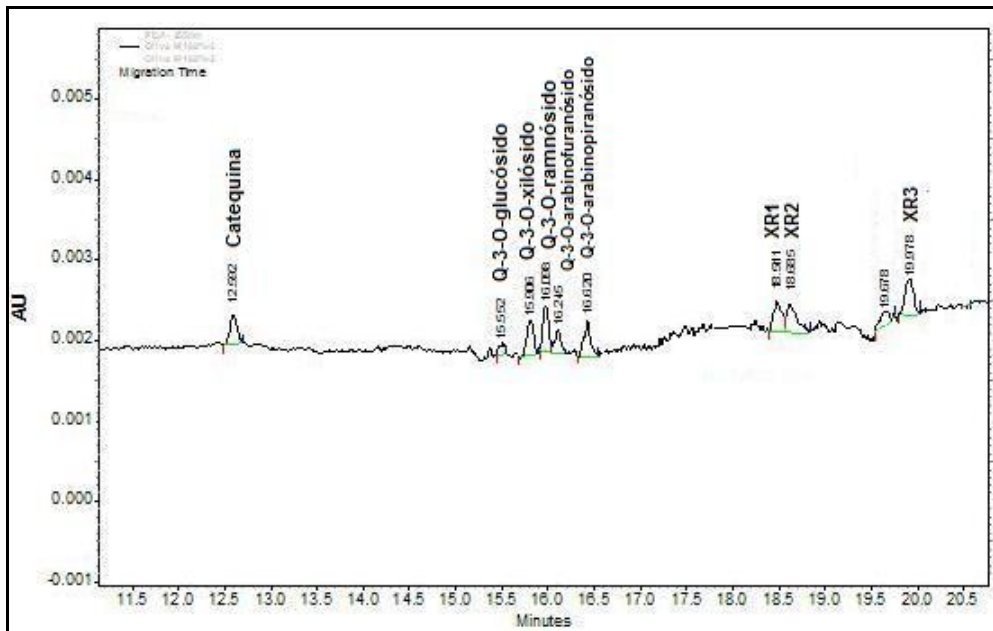


Figura 3.35.- Comparación de espectros de los picos principales de la muestra proveniente de Catamarca (hospedante “olivo”)

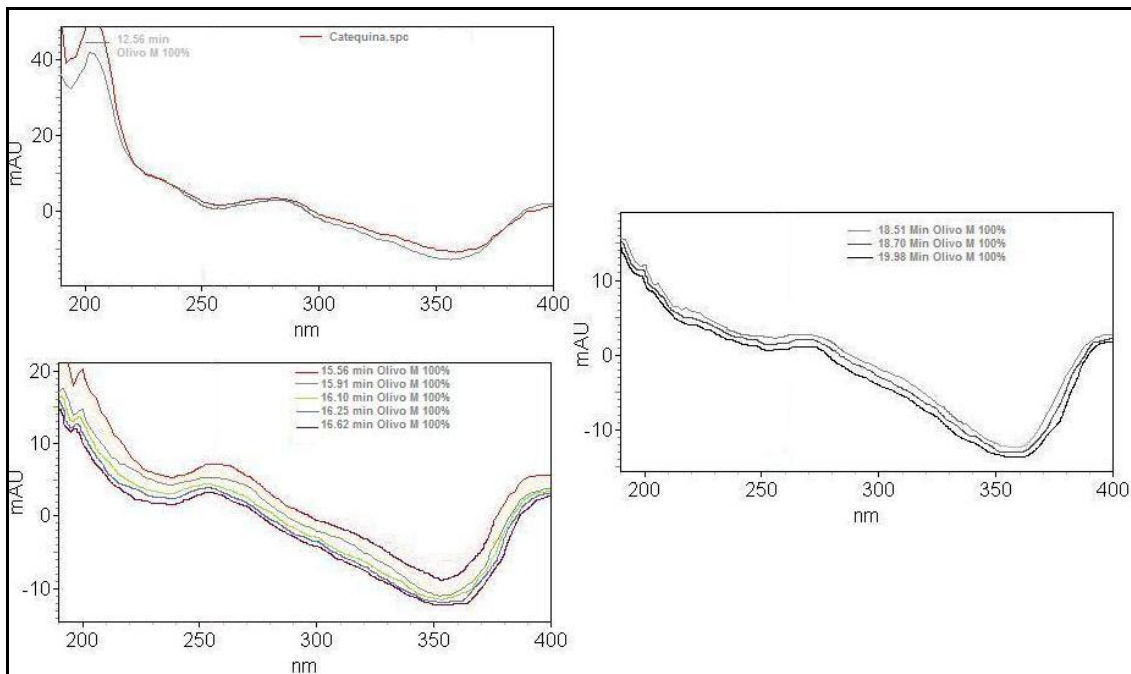
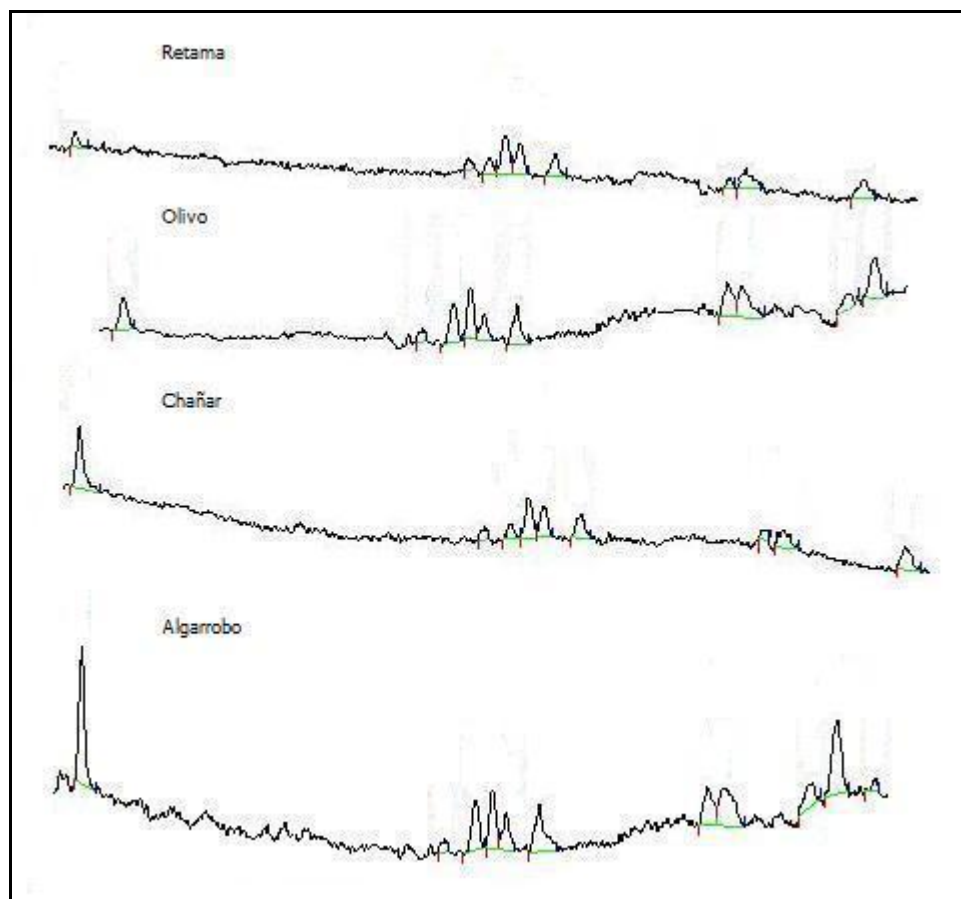


Figura 3.36.- Comparación de perfiles cromatográficos de las muestras provenientes de Catamarca



Como puede observarse, los perfiles cromatográficos son similares. Por comparación con los tiempos de migración y espectros UV de los testigos, en forma preliminar puede considerarse la presencia de catequina, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-ramnósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido y quercetina-3-O-arabinofuranósido.

En la tabla 3.19. se presenta un resumen de los compuestos presentes en las muestras provenientes de Catamarca.

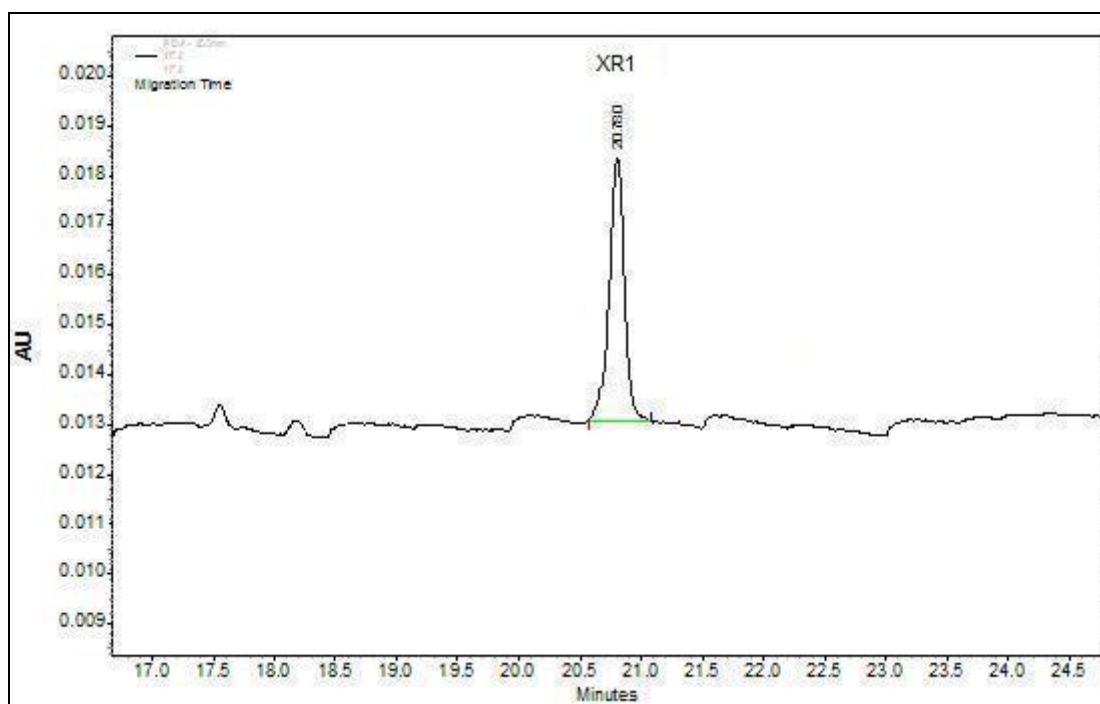
Tabla 3.19.- Compuestos presentes en las muestras de Catamarca

Catamarca				
Extractos metanólicos				
Hospedantes	“Chañar”	“Retama”	“Algarrobo”	“Olivo”
	Catequina	Catequina	Catequina	Catequina
	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G
	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X
	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP
Compuestos	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF
	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM
	XR1	XR1	XR1	XR1
	XR2	XR2	XR2	XR2
	XR3	XR3	XR3	XR3

Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido; Q-3-O-AF: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-RAM: quercetina-3-O-ramnósido; XR1, XR2, XR3: compuestos desconocidos.

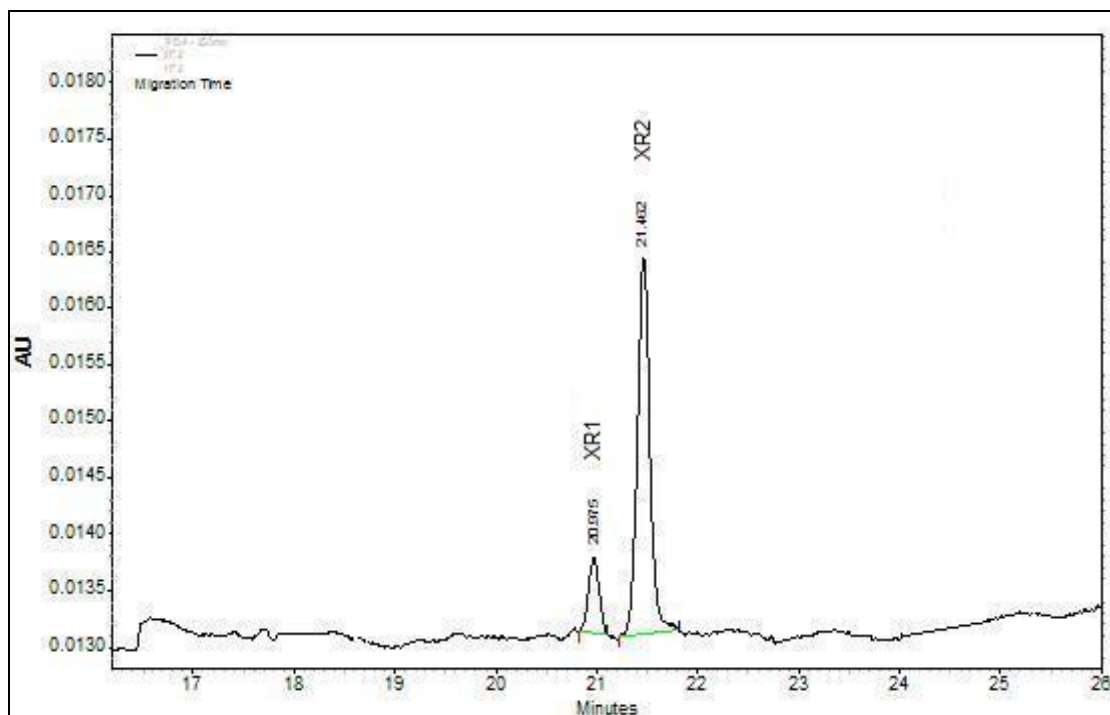
Se procede a estudiar el perfil de flavonoles en las bandas purificadas (1F1, 1F2, 2F2 y 3F2). En todos los casos, las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Figura 3.37.- Banda 1F2 proveniente de la muestra de San Juan



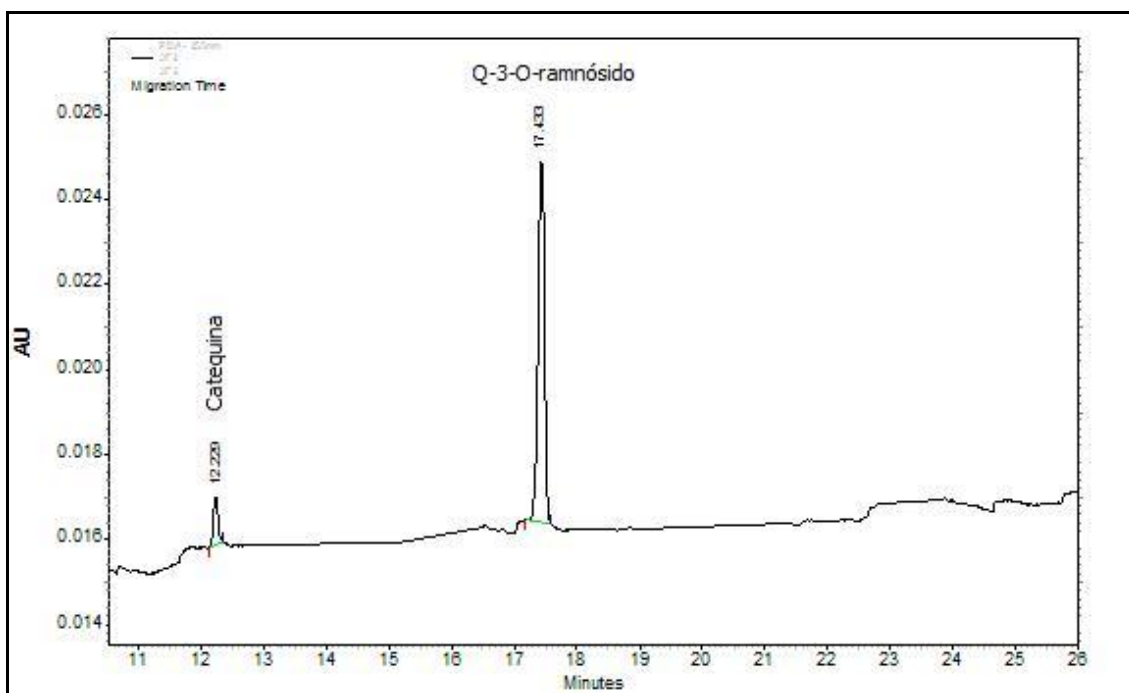
XR1: compuesto desconocido

Figura 3.38.- Banda 1F1 proveniente de la muestra de San Juan



XR1, XR2: compuestos desconocidos

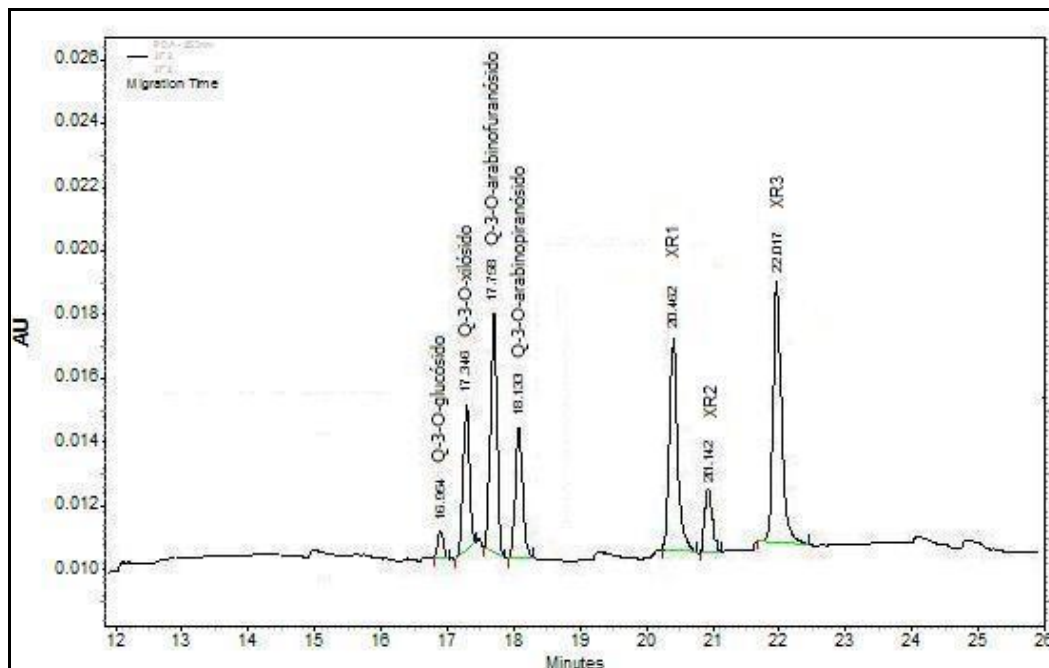
Figura 3.39.- Banda 3F2 proveniente de la muestra de San Juan



Q-3-O-ramnósido: quercetina-3-O-ramnósido

Por comparación de espectros y tiempos de migración, preliminarmente se detecta la presencia de catequina y quercetina-3-O-ramnósido.

Figura 3.40.- Banda 2F2 proveniente de la muestra de San Juan



Q-3-O-glucósido: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-xilósido: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-arabinopiranosido: quercetina-3-O-arabinopiranosido; Q-3-O-arabinofuranósido: quercetina-3-O-arabinofuranósido; XR1, XR2 y XR3: compuestos desconocidos.

En el caso de la banda 2F2, por co-cromatografía, comparación de los espectros y los tiempos de migración con los testigos correspondientes, se detecta la presencia de quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido. Asimismo, se observa la presencia de los compuestos desconocidos XR1, XR2 y XR3.

En la tabla 3.20 se presenta un resumen de los compuestos encontrados en las bandas purificadas.

Tabla 3.20.- Compuestos presentes en las bandas purificadas

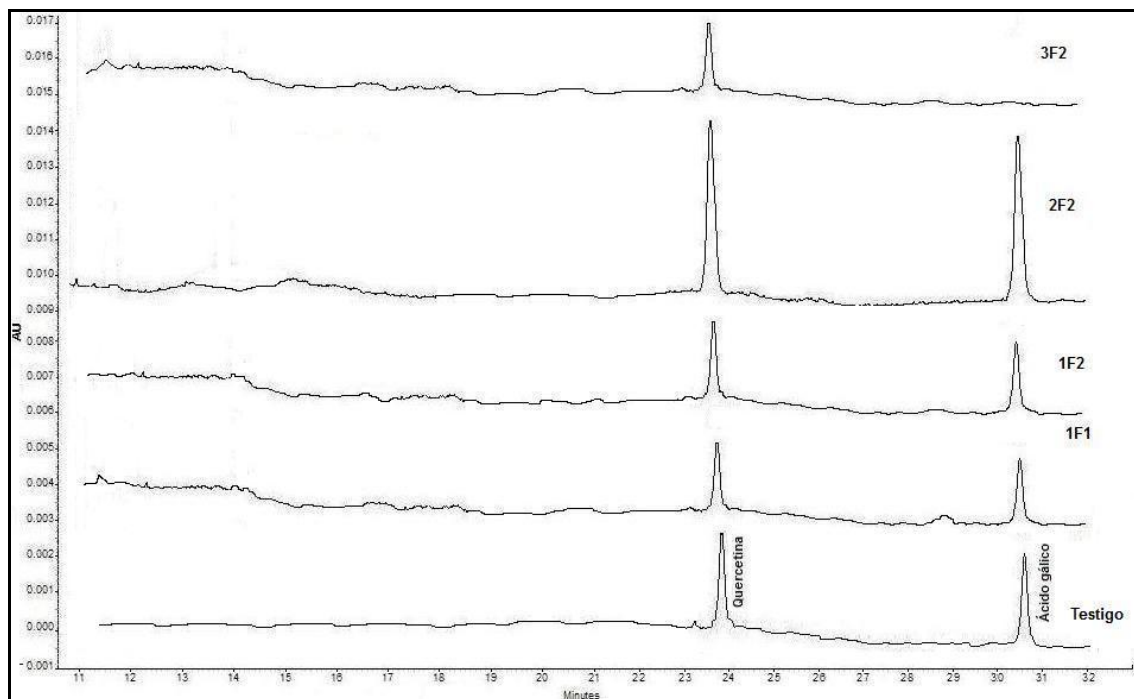
	1F1	1F2	2F2	3F2
Compuestos		XR1	Q-3-O-glucósido	Catequina
			Q-3-O-xilósido	Q-3-O-ramnósido
			Q-3-O-arabinopiranosido	
			Q-3-O-arabinofuranósido	
			XR1	
			XR2	
			XR3	

Q-3-O-glucósido: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-xilósido: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-arabinopiranosido: quercetina-3-O-arabinopiranosido; Q-3-O-arabinofuranósido: quercetina-3-O-arabinofuranósido; XR1, XR2 y XR3: compuestos desconocidos.

Las bandas purificadas, sometidas a la hidrólisis ácida, son objeto de estudio posterior para determinar la naturaleza del aglicón y la posible presencia de ácido gálico. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Aglicón y ácido gálico

Figura 3.41.- Hidrolizado de las bandas 1F1, 1F2, 2F2 y 3F2



Se observa la presencia de quercetina como único aglicón para todas las bandas. El ácido gálico se encuentra presente en las bandas 1F1, 1F2 y 2F2. El resumen de los compuestos encontrados en los hidrolizados de las bandas purificadas se presenta en la tabla 3.21.

Tabla 3.21.- Compuestos presentes en los hidrolizados de las bandas purificadas

	1F1	1F2	2F2	3F2
Compuestos	Quercetina	Quercetina	Quercetina	Quercetina
	Ácido gálico	Ácido gálico	Ácido gálico	

3.3.3. HPLC (cromatografía líquida de alta performance, *high performance liquid chromatography*)

Glicósidos de flavonoles y taninos condensados (o proantocianidinas)

Se procedió a realizar un análisis por HPLC, a través de un método general para la detección de flavonoides, a fin de establecer un perfil y compararlo con el obtenido con la electroforesis capilar. Las muestras estudiadas corresponden a las fracciones acetato de etilo provenientes de San Juan, los extractos metanólicos de las muestras recoletadas en Catamarca y la muestra comercial de San Juan.

Se realizaron ajustes menores al gradiente para optimizar la resolución de los compuestos de interés.

Sistema cromatográfico

- Columna Luna Phenomenex C18 (2); 250 x 4,6 mm (5 μ m)
- Flujo: 1,2 ml/min
- Temperatura: 40 °C
- Volumen de inyección: 20 μ l
- Detección: UV-DAD 260 y 280 nm
- Fase móvil

A: ácido acético-agua (98:2)

B: ácido acético-metanol (98:2)

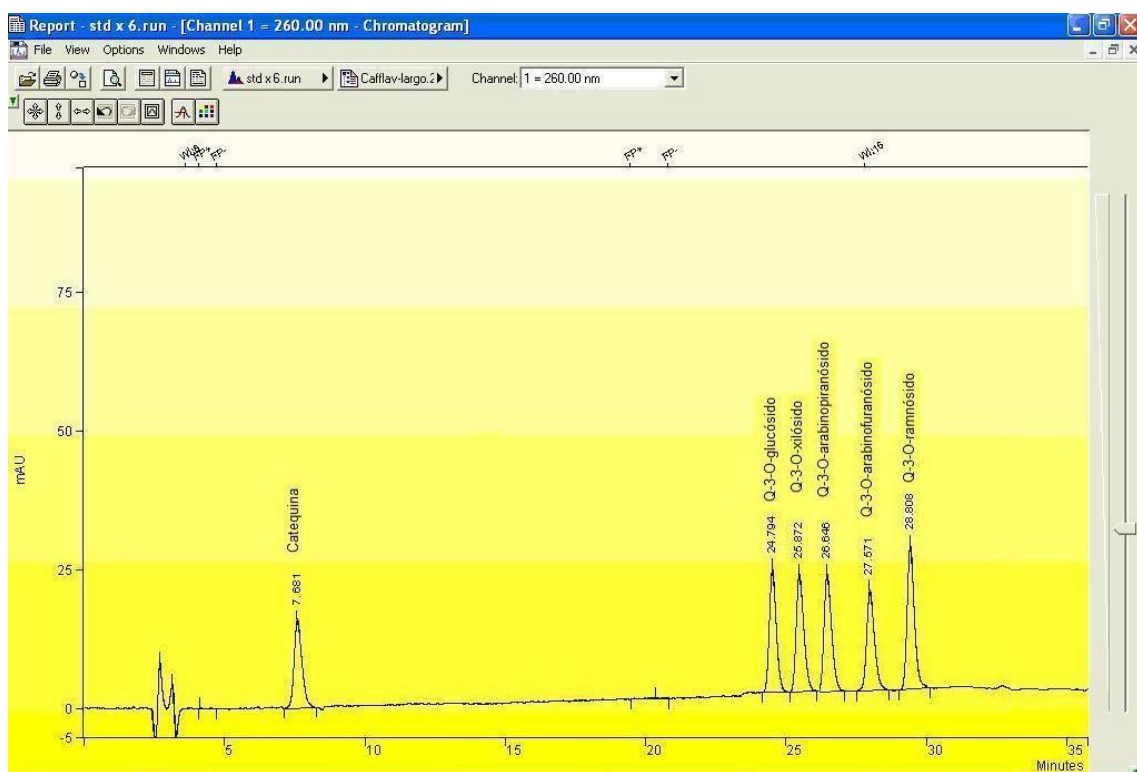
Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	85	15
25	60	40
50	60	40
60	15	85
65	0	100

Muestras: las fracciones de acetato de etilo (10 mg/ml en metanol) provenientes de los extractos obtenidos de las muestras de San Juan (MeOH 100 %, 80 % y 50 % y “MeOH combinado-AE”, los extractos se obtienen por medio de extracciones sucesivas, de las hojas o los tallos, con distintas proporciones de metanol: metanol 100 %, 80 % y 50 %).

Además, se estudiaron los extractos metanólicos correspondientes a las muestras de Catamarca (20 mg/ml) provenientes de los distintos hospedantes (“chañar”, “algarrobo”, “olivo” y “retama”) y una muestra comercial de San Juan. En todos los casos, las determinaciones se efectuaron por triplicado.

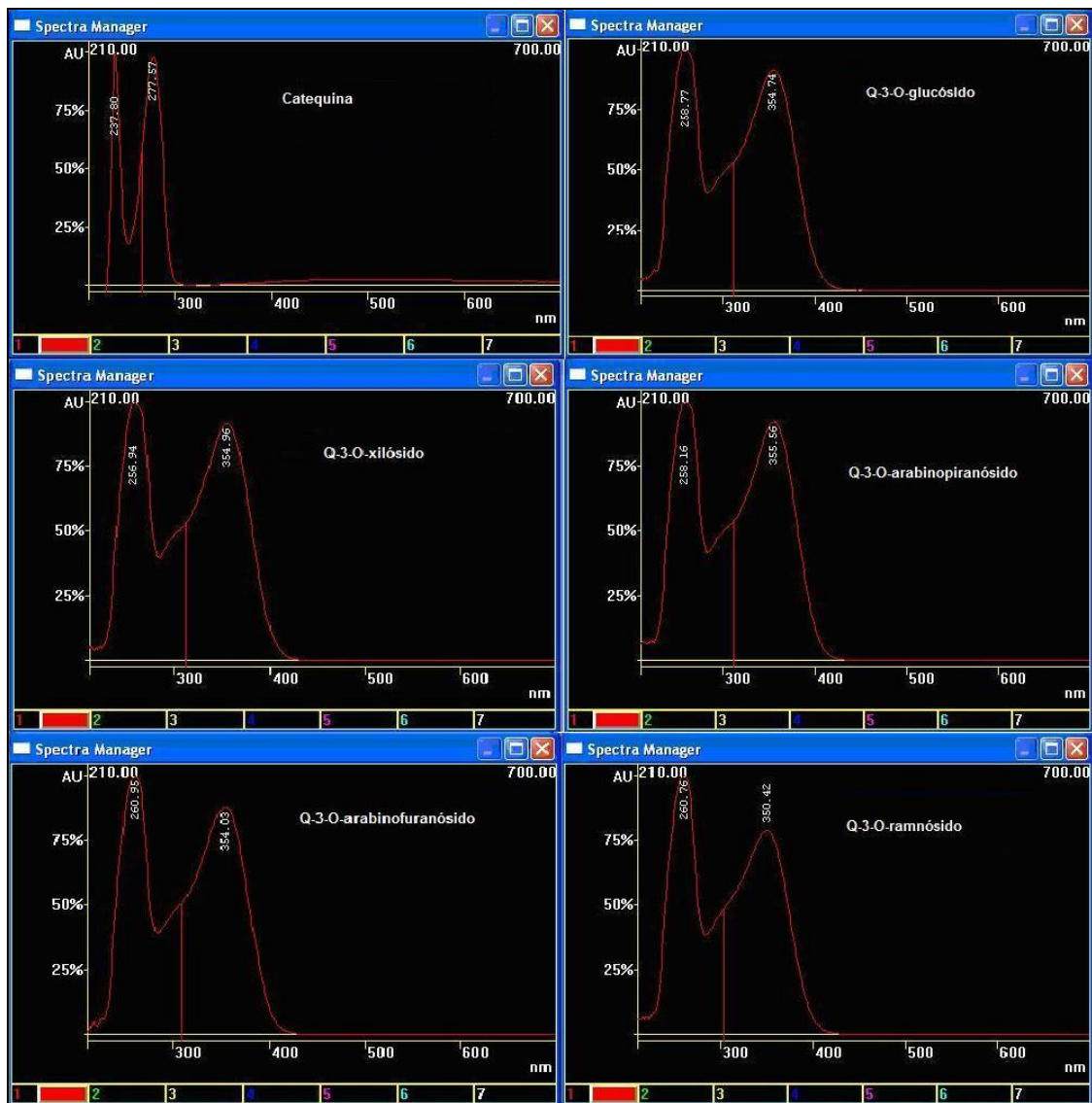
Se observaron los cromatogramas de la solución mezcla de los testigos correspondientes a los compuestos preliminarmente identificados por TLC y electroforesis capilar: catequina, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido y quercetina-3-O-ramnósido en concentración 0,05 mg/ml en metanol (Figura 3.42). También se muestran los espectros obtenidos para cada compuesto de interés (Figura 3.43).

Figura 3.42.- Solución mezcla de testigos



Q-3-O-glucósido: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-xilósido: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-arabinopiranosido: quercetina-3-O-arabinopiranosido; Q-3-O-arabinofuranósido: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-ramnósido: quercetina-3-O-ramnósido

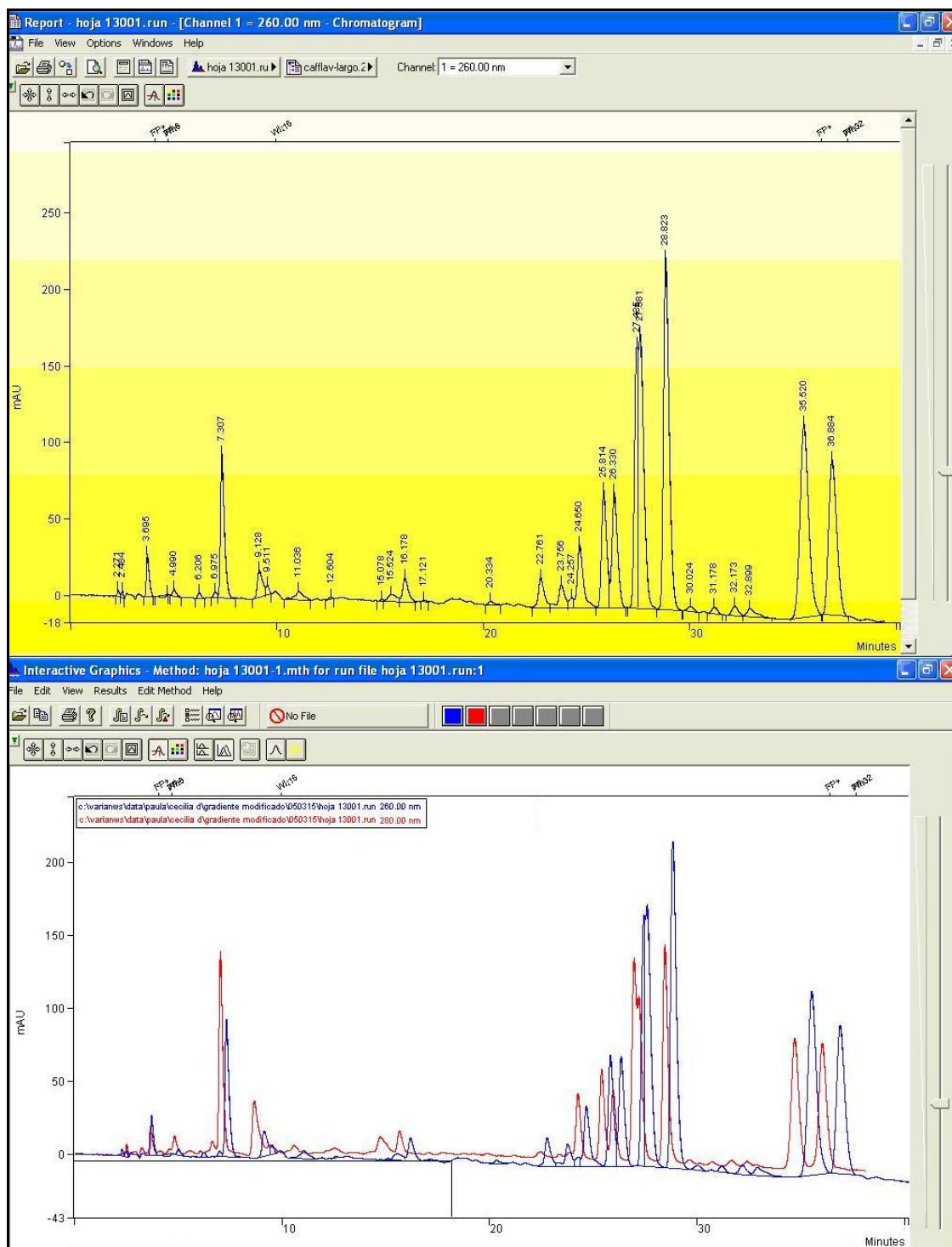
Figura 3.43.- Espectros correspondientes a los testigos



De izquierda a derecha: catequina, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido, quercetina-3-O-ramnósido

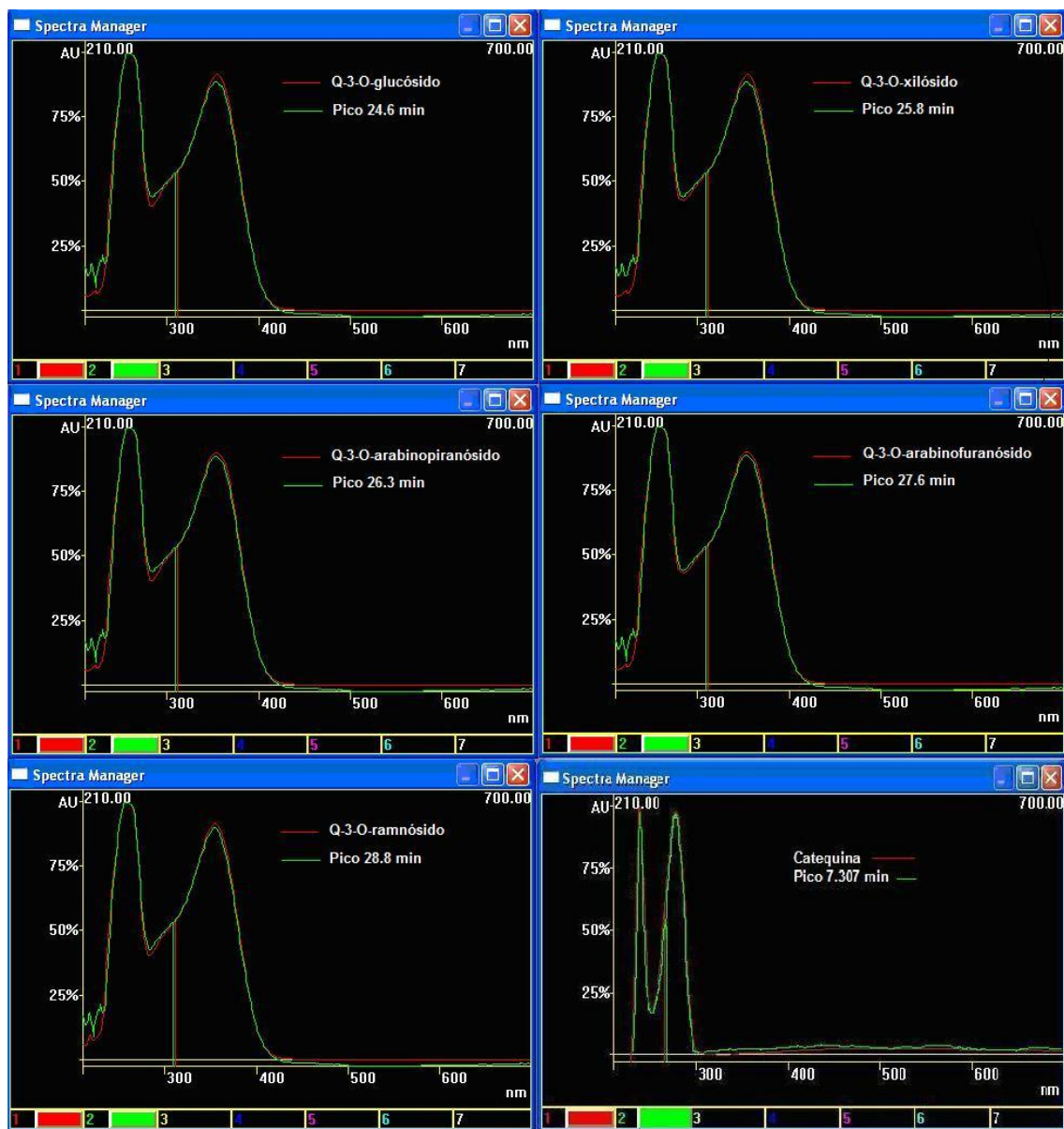
En la figura 3.44 se observan las corridas a 255 nm y 280 nm correspondientes a la fracción “MeOH combinado-AE” de los ejemplares provenientes de San Juan. Se compararon los tiempos de retención y los espectros de los compuestos de interés respecto a los testigos (figura 3.45). Se realizó también una co-cromatografía para confirmar la identidad del compuesto.

Figura 3.44.- Cromatograma de la fracción “MeOH combinado-AE” provenientes de las hojas de los ejemplares colectados en San Juan (visualización a 260 y 280 nm)



Por coincidencia del tiempo de retención, se efectuó la comparación de los espectros entre los picos principales y el testigo correspondiente.

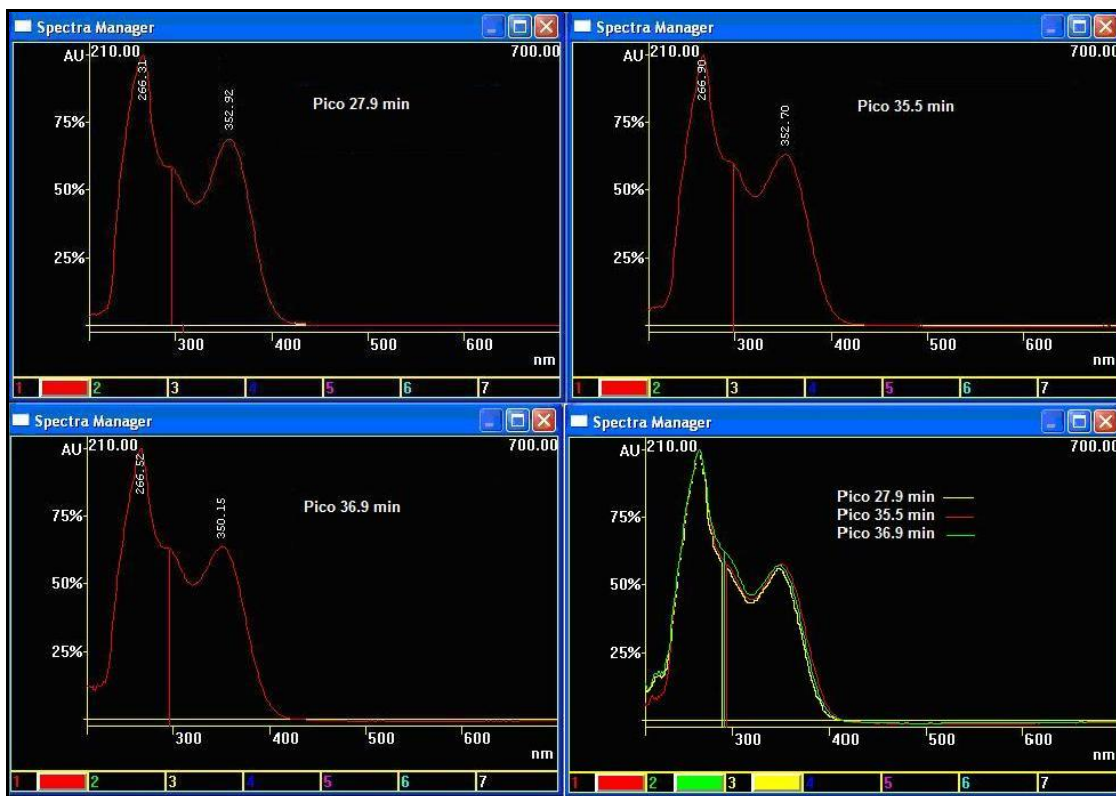
Figura 3.45.- Comparación de espectros entre compuestos de la muestra y referencias (glicósidos de quercetina y catequina)



Como puede observarse, los espectros y tiempos de retención de los compuestos coinciden con los testigos. Exhiben máximos entre 240 - 285 (banda II) y entre 300 - 550 nm (banda I), característicos de los flavonoles. La catequina, por su parte, es un flavan-3-ol con un máximo a 238 y 278 nm, aproximadamente.

En la figura 3.46 se observan los espectros y los tiempos de retención correspondientes a los compuestos que difieren de los glicósidos testigos. Al igual de lo que se observó en la electroforesis capilar, se detectan 3 picos.

Figura 3.46.- Espectros correspondientes a los picos desconocidos



Se observa un desplazamiento de la banda II (266 – 267 nm) respecto de los obtenidos para los glicósidos de quercetina.

Se presenta la asignación preliminar de los picos por coincidencia de los tiempos de retención, espectro UV y co-cromatografía. Hay 3 compuestos cuyos espectros no coinciden con los de los glicósidos y que, por lo tanto, han sido designados como XR1, XR2 y XR3.

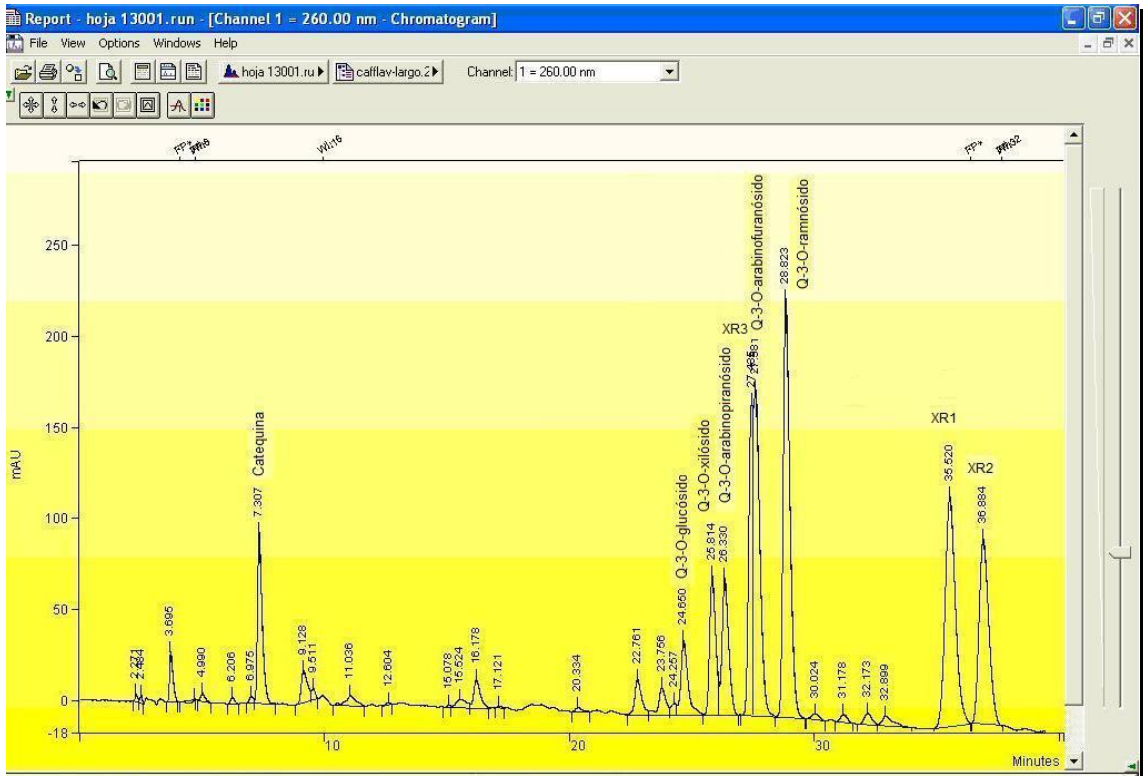
En la tabla 3.22 se presentan los tiempos de retención de los picos principales junto con su asignación preliminar, en el cromatograma correspondiente a la fracción “MeOH combinado-AE”

Tabla 3.22.- Tiempos de retención de los picos principales en la fracción “MeOH combinado-AE”

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Catequina	7,307
Quercetina-3-O-glucósido	24,650
Quercetina-3-O-xilósido	25,814
Quercetina-3-O-arabinopiranosido	26,330
XR3	27,485
Quercetina-3-O-arabinofuranósido	27,581
Quercetina-3-O-ramnósido	28,823
XR1	35,520
XR2	36,884

XR1, XR2 y XR3: compuestos desconocidos

Figura 3.47.- Cromatograma de la fracción “MeOH combinado-AE” de la hoja proveniente de San Juan con la asignación preliminar de los principales compuestos



De izquierda a derecha: catequina, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido, quercetina-3-O-ramnósido

Figura 3.48.- Cromatograma de la fracción “MeOH 100 % - AE” obtenida de las hojas de los ejemplares colectados en San Juan

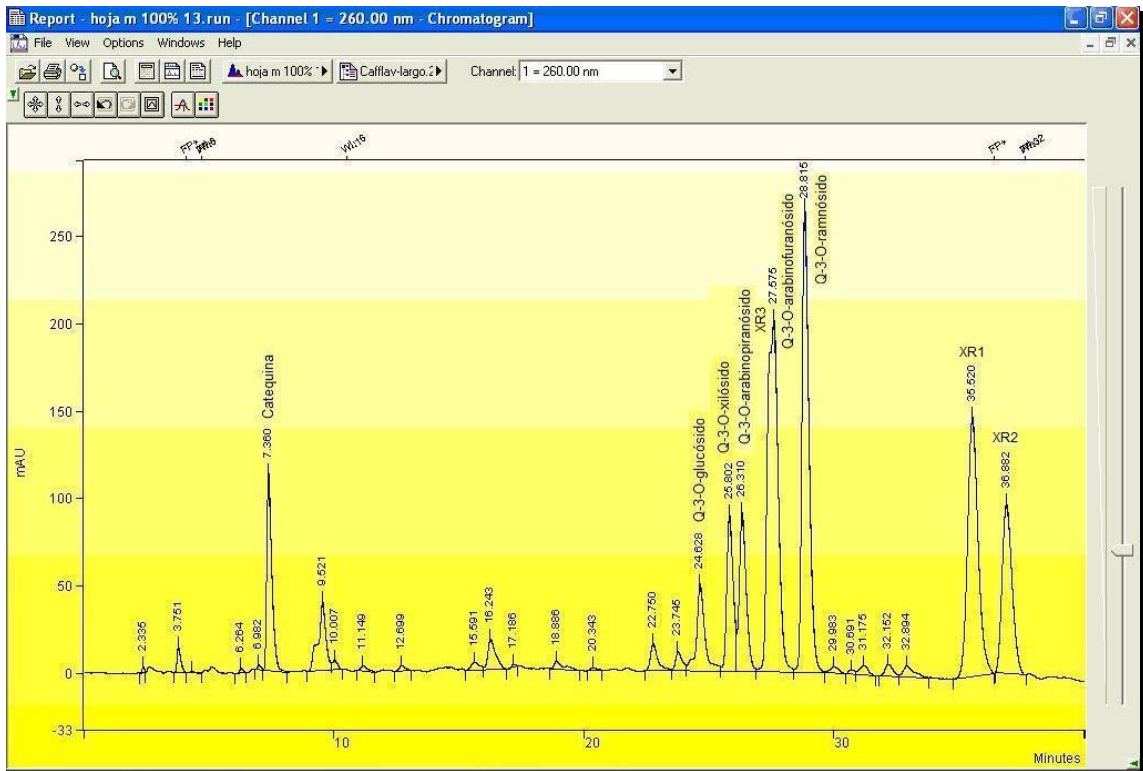


Figura 3.49.- Cromatograma de la fracción “MeOH 80 % - AE” obtenida de las hojas de los ejemplares colectados en San Juan

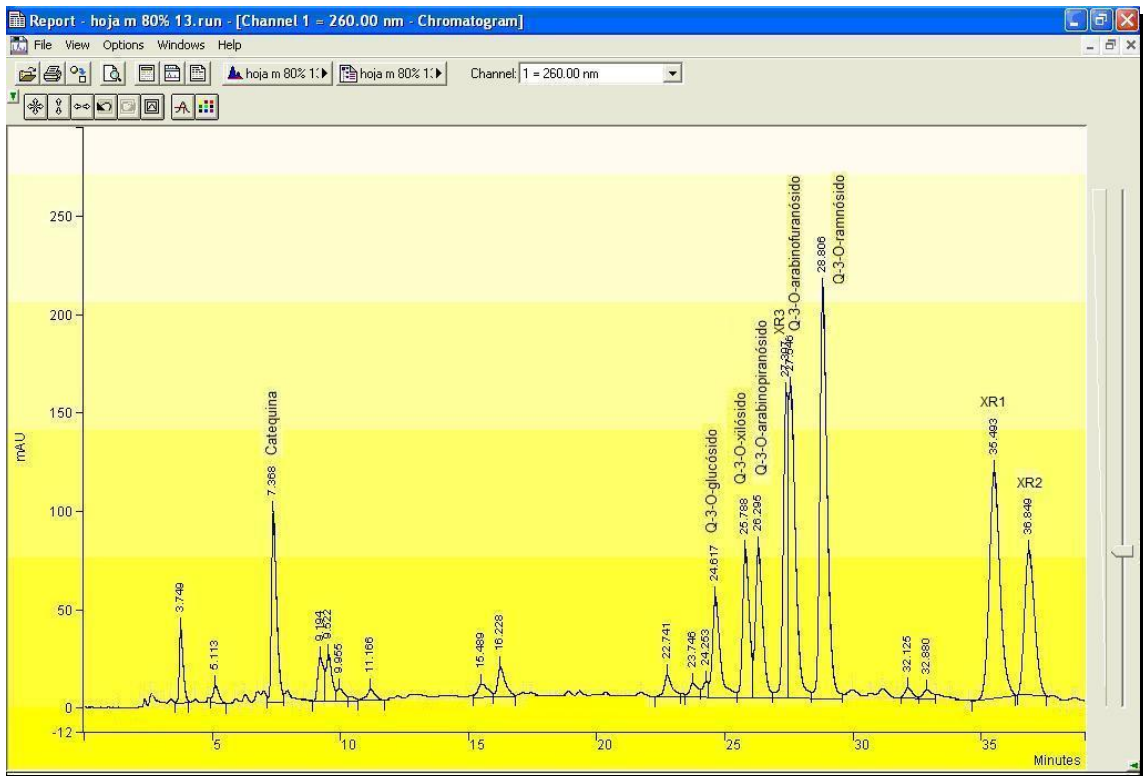


Figura 3.50.- Cromatograma de la fracción “MeOH 50 % - AE” obtenida de las hojas de los ejemplares colectados en San Juan

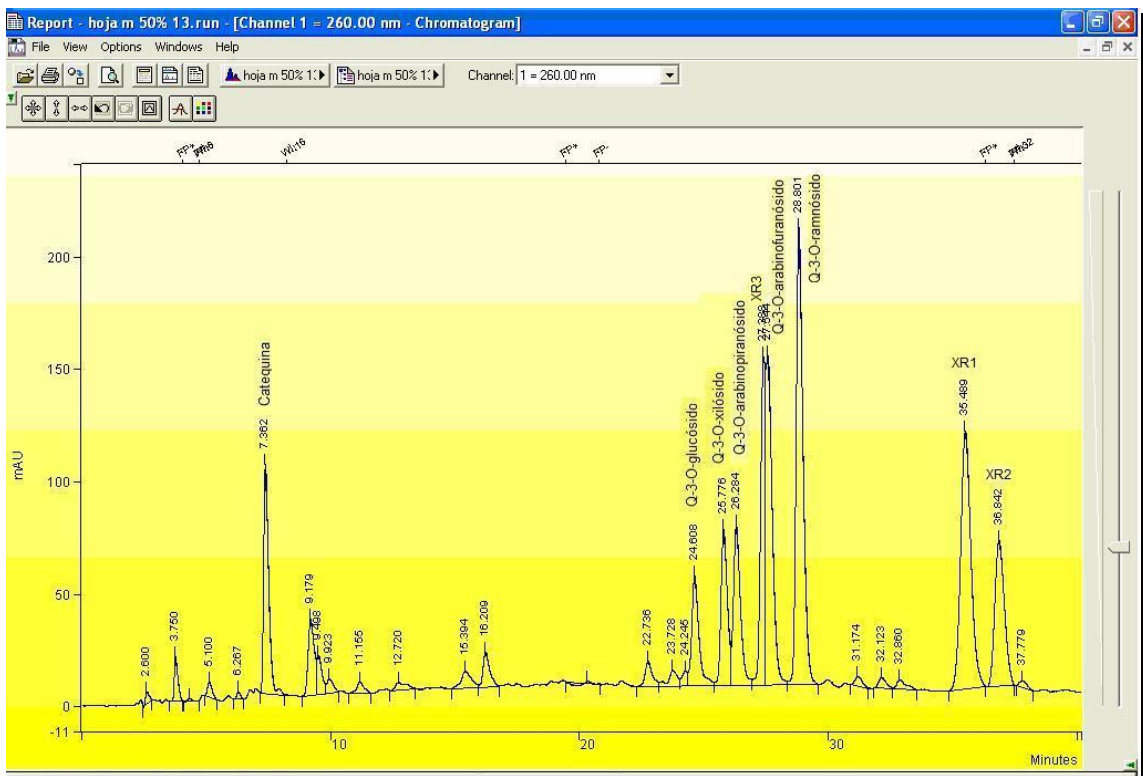


Figura 3.51.- Cromatograma de la fracción “MeOH combinado-AE” del tallo proveniente de San Juan

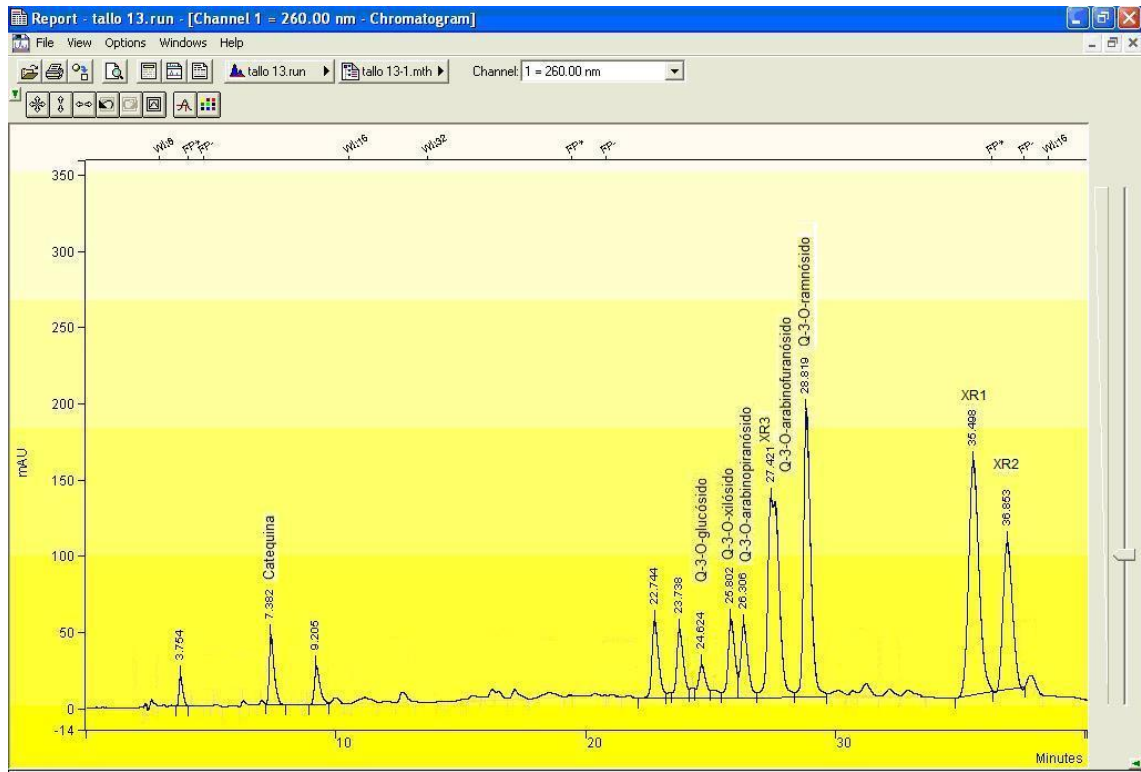
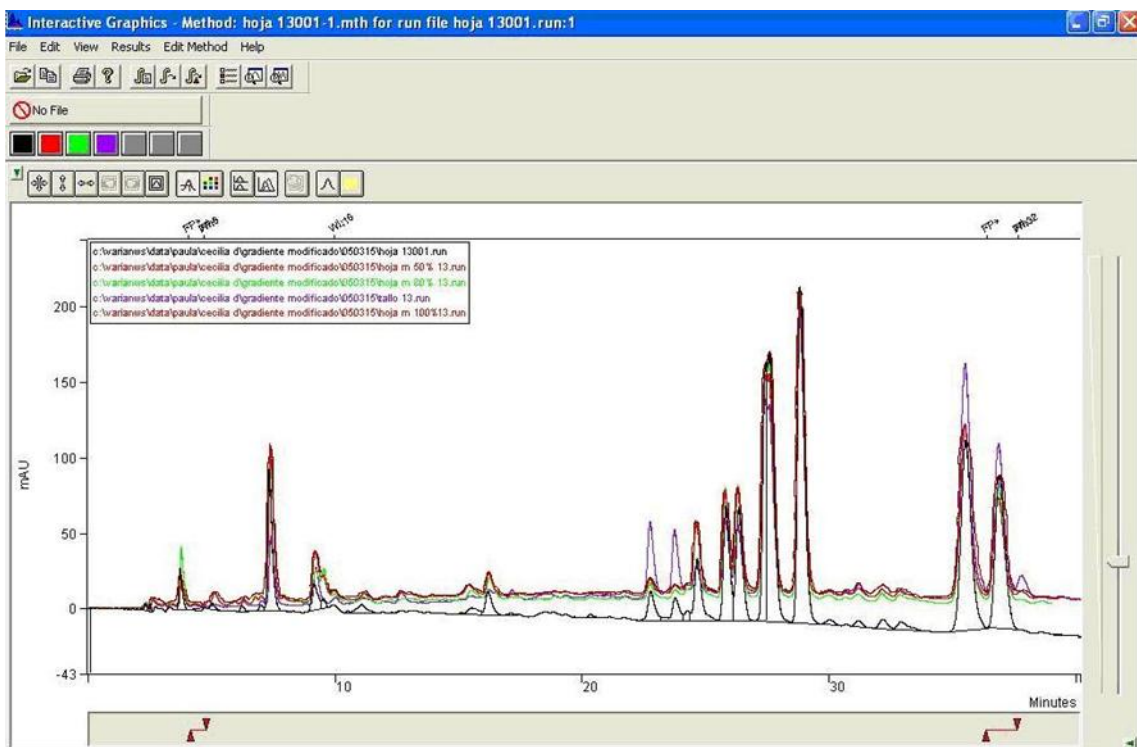
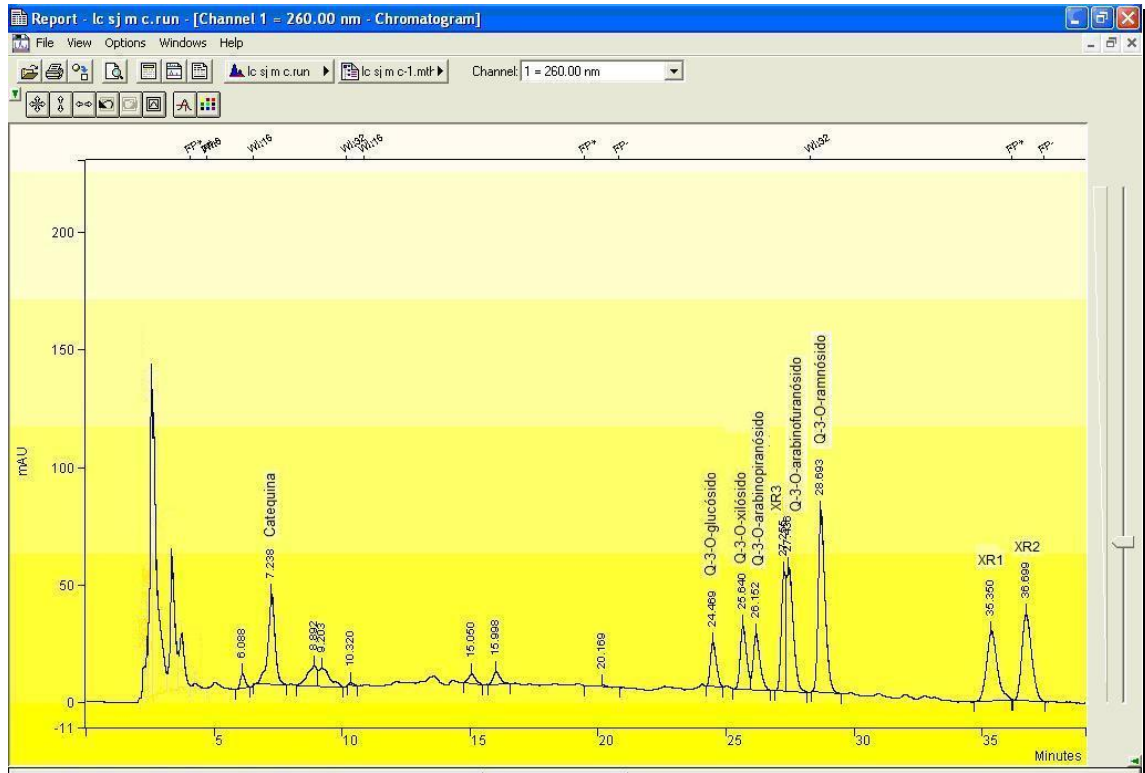


Figura 3.52.- Comparación de perfiles entre las fracciones acetato de etilo (hoja y tallo) en muestras de San Juan



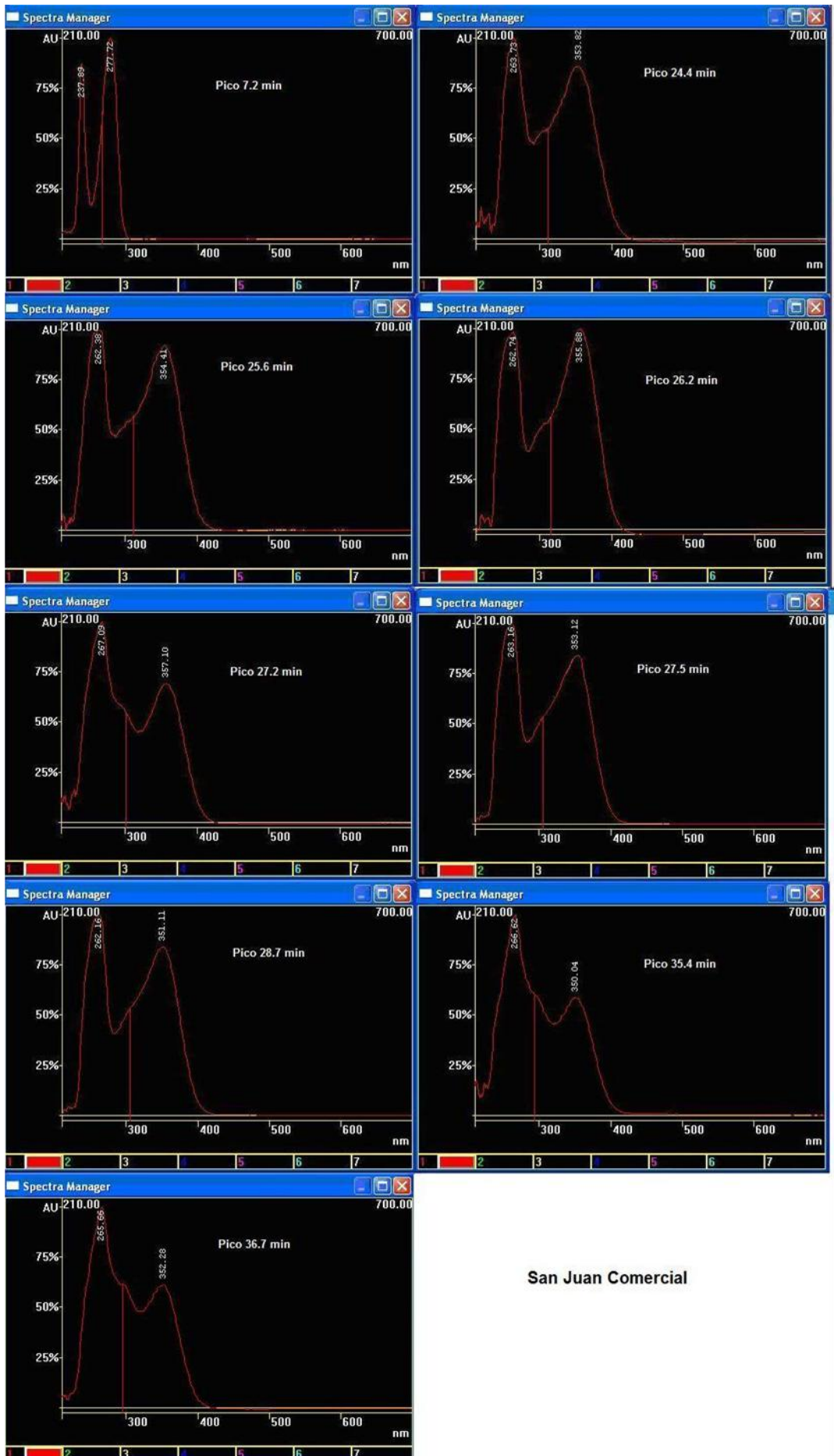
El perfil es similar para las fracciones acetato de etilo obtenidas a partir de la combinación de distintas proporciones de metanol en hoja y tallo y asimismo lo son los espectros de los picos principales.

Figura 3.53.- Extracto metanólico de la muestra comercial proveniente de San Juan



Los espectros de los picos principales se muestran en la figura 3.54.

Figura 3.54.- Espectros de los compuestos principales en la muestra comercial de San Juan



Los picos cuyos tiempos de retención y espectros coinciden con los testigos han sido preliminarmente identificados como catequina y glicósidos de quercetina tales como: quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido y quercetina-3-O-ramnósido. Hay tres compuestos cuyos espectros difieren y son semejantes a los observados en la fracción acetato de etilo de las muestras de San Juan. El resumen de los compuestos encontrados en las muestras de San Juan se muestra en la tabla 3.23.

Tabla 3.23.- Compuestos presentes en las muestras de San Juan

	Hoja Fracción acetato de etilo				Tallo Fracción acetato de etilo	Muestra comercial Hoja
	MeOH combinado	MeOH 100 %	MeOH 80 %	MeOH 50 %	MeOH combinado	MeOH 100 %
Compuestos	Catequina	Catequina	Catequina	Catequina	Catequina	Catequina
	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G
	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X
	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP
	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF
	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM
	XR1	XR1	XR1	XR1	XR1	XR1
	XR2	XR2	XR2	XR2	XR2	XR2
	XR3	XR3	XR3	XR3	XR3	XR3

Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido; Q-3-O-AF: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-RAM: quercetina-3-O-ramnósido; XR1, XR2, XR3: compuestos desconocidos.

A continuación, se muestran las corridas y los espectros de las muestras provenientes de Catamarca, sobre distintos hospedantes (“chañar”, “algarrobo”, “retama” y “olivo”).

Figura 3.55.- Extracto metanólico de la muestra proveniente de Catamarca
(hospedante “algarrobo”)

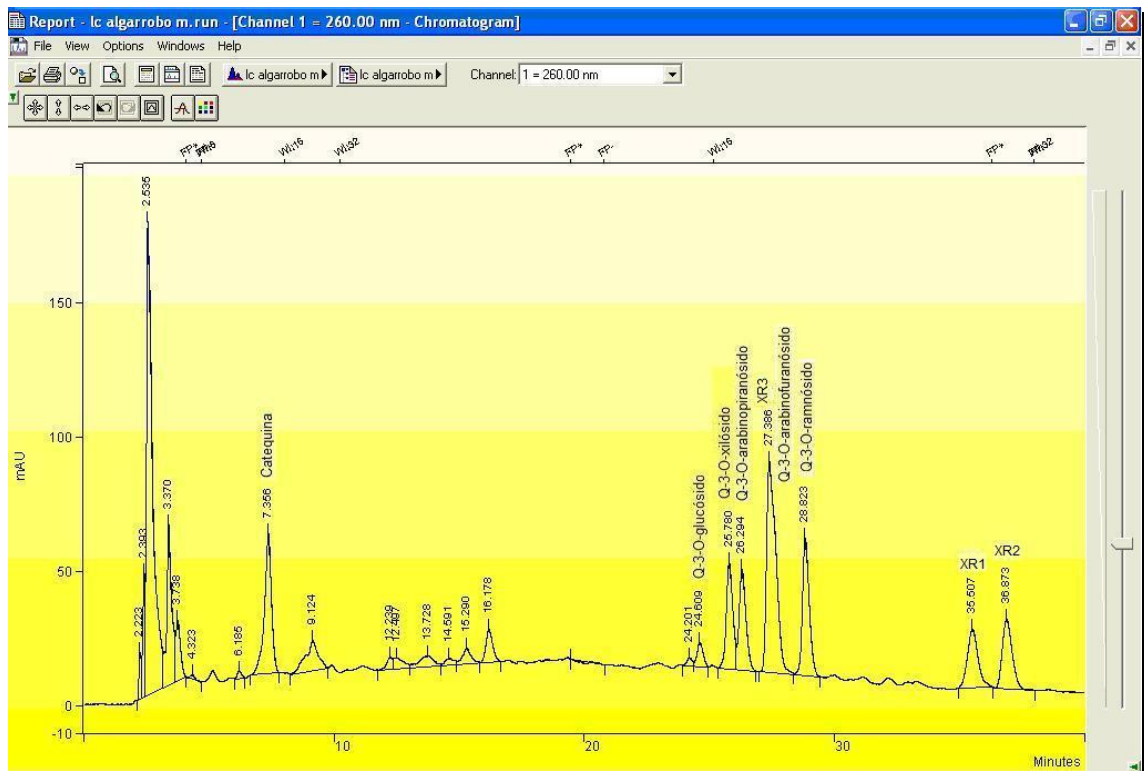
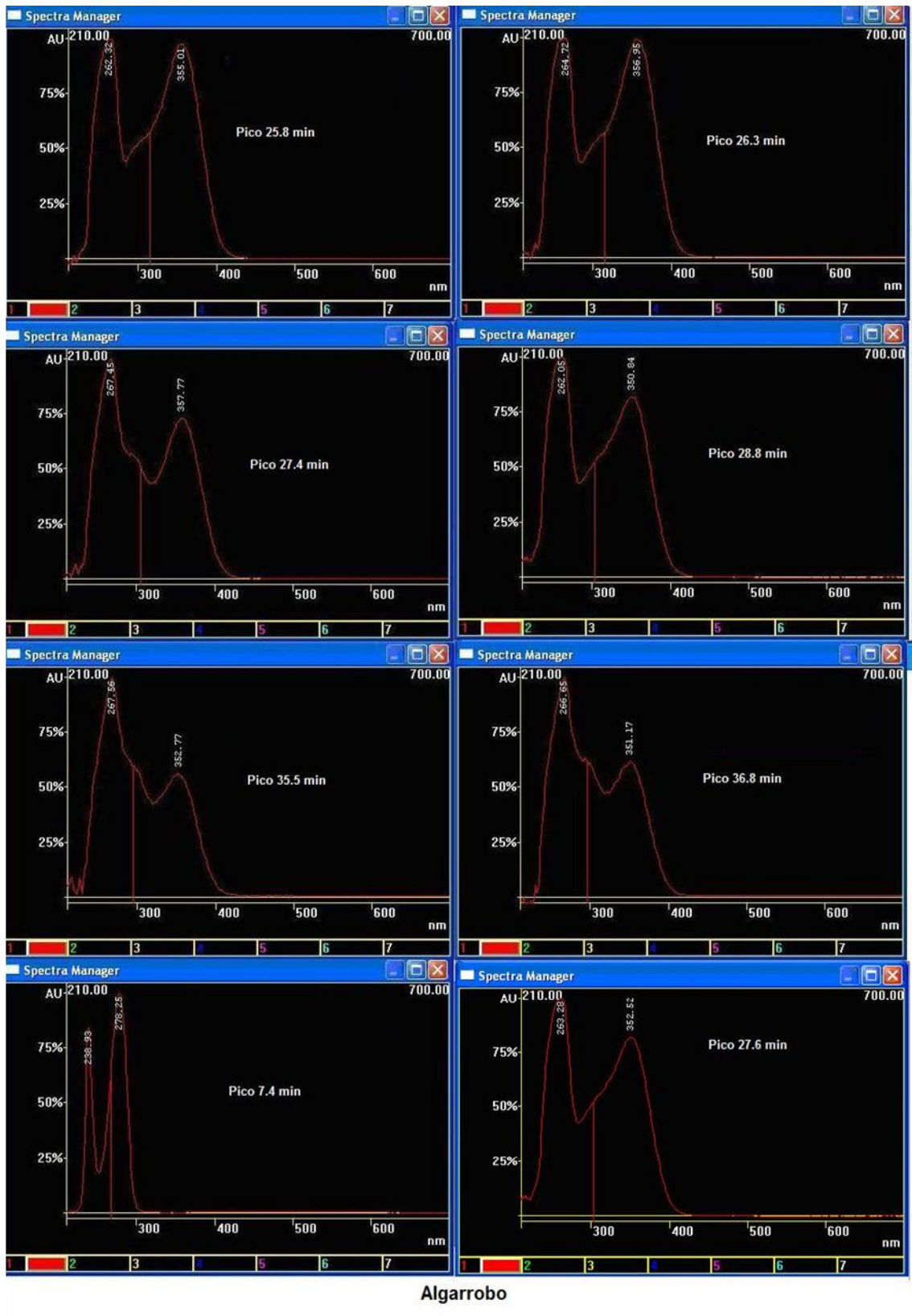


Figura 3.56.- Espectros de los picos principales de la muestra proveniente de Catamarca (hospedante “algarrobo”)



Como puede observarse, se detecta la presencia de catequina (por coincidencia del espectro y el tiempo de retención), así como también, de glicósidos de quercetina (quercetina-3-O-glucósido en baja concentración, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido y furanósido y quercetina-3-O-ramnósido). Se observan 3 picos desconocidos, con espectros similares entre sí y con respecto a las muestras de San Juan.

Figura 3.57.- Extracto metanólico de la muestra de Catamarca (hospedante “retama”)

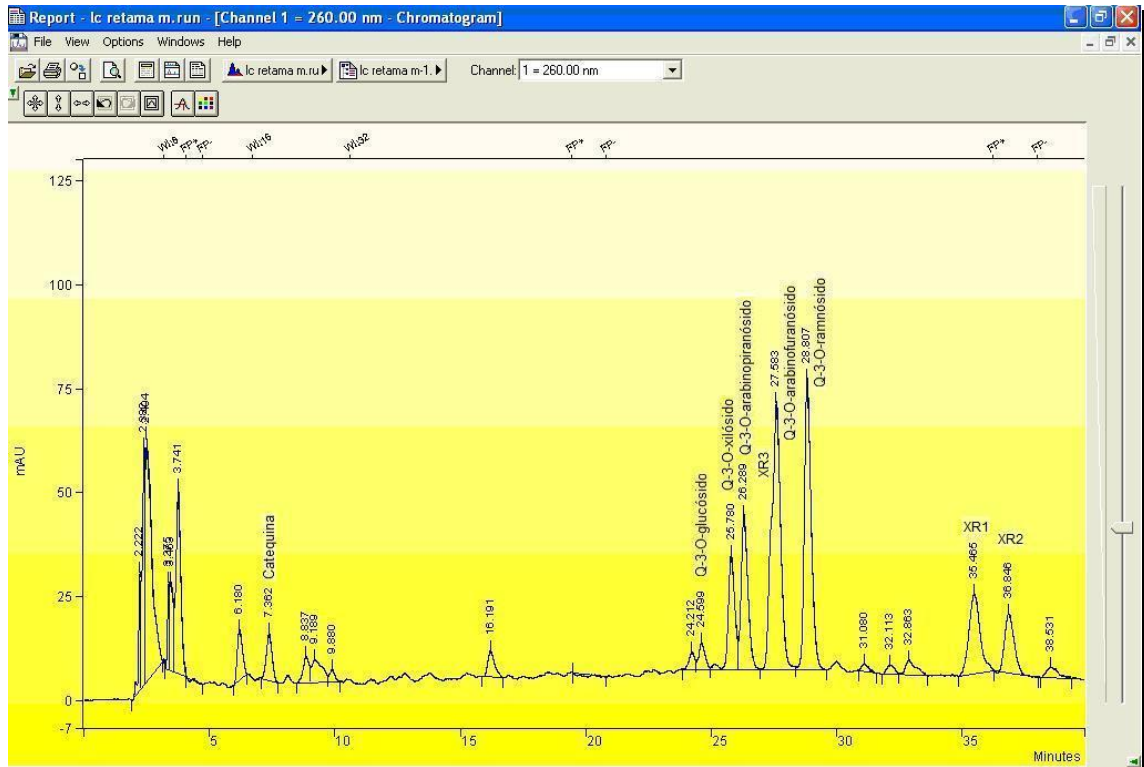
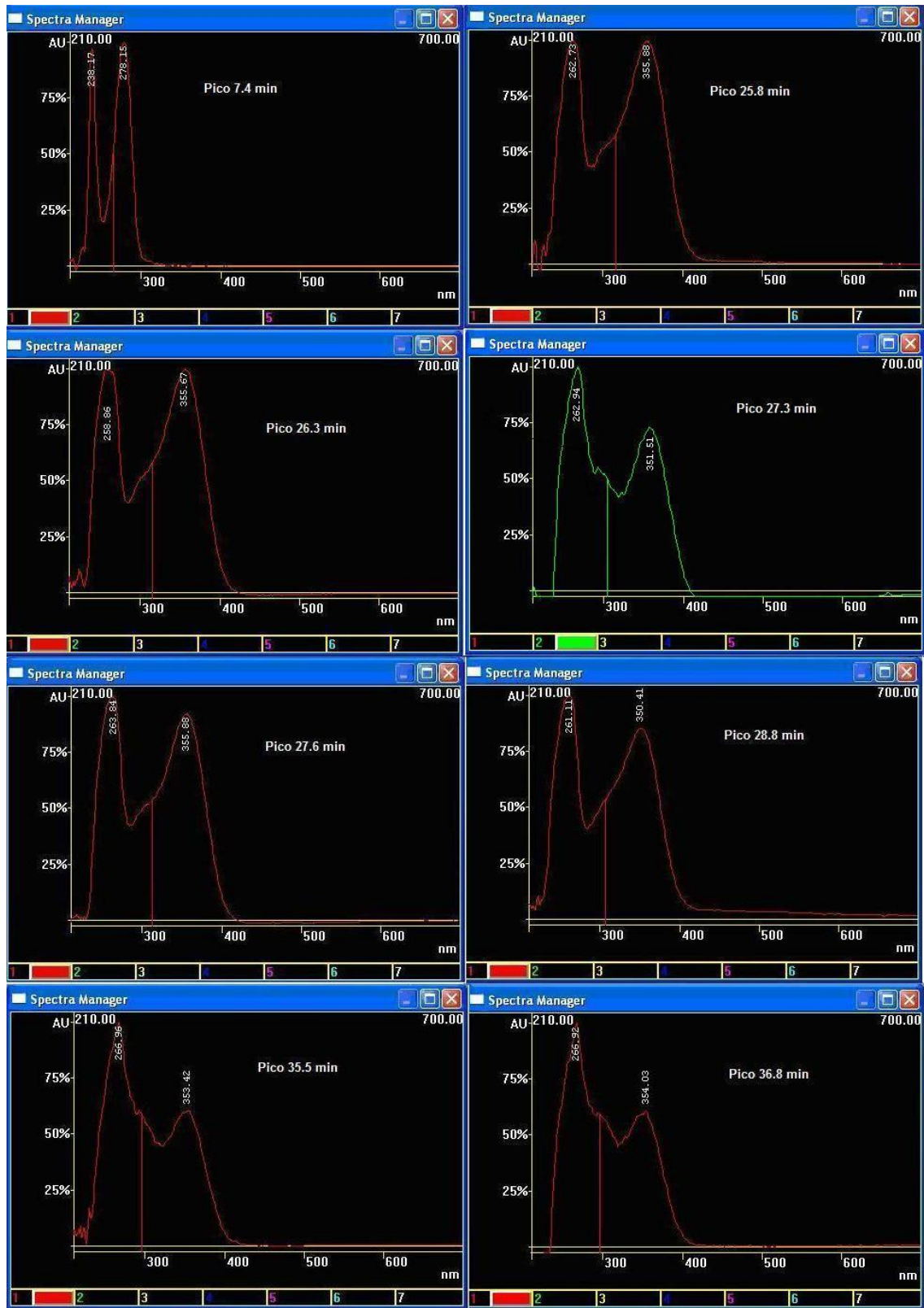


Figura 3.58.- Espectros de los picos principales de la muestra proveniente de Catamarca (hospedante “retama”)



Retama

Como puede observarse en forma preliminar, además de la presencia de catequina, puede presumirse (por similitud de los espectros y de los tiempos de retención con los correspondientes testigos) la presencia de glicósidos de quercetina, tales como, quercetina-3-O-glucósido (en baja concentración), quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido y furanosido y quercetina-3-O-ramnósido. Nuevamente, se observa la presencia de 3 compuestos desconocidos, cuyos espectros son similares entre sí y con respecto a las muestras de San Juan.

Figura 3.59.- Extracto metanólico de la muestra de Catamarca (hospedante “olivo”)

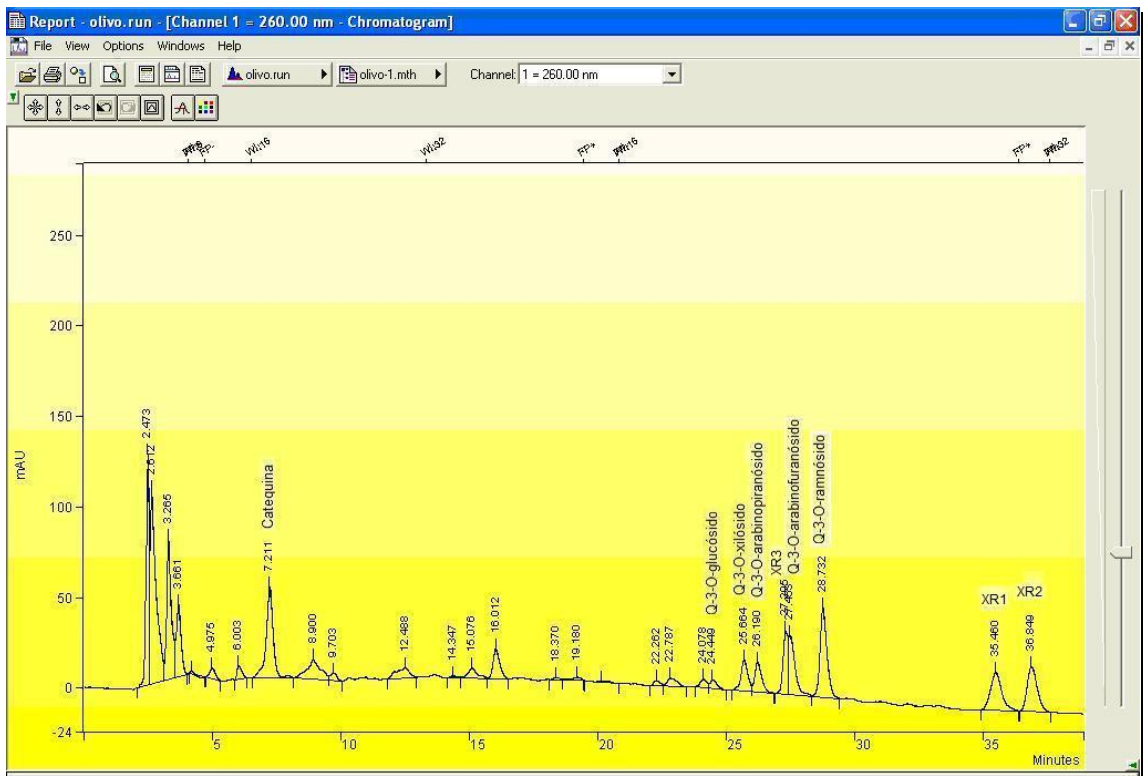
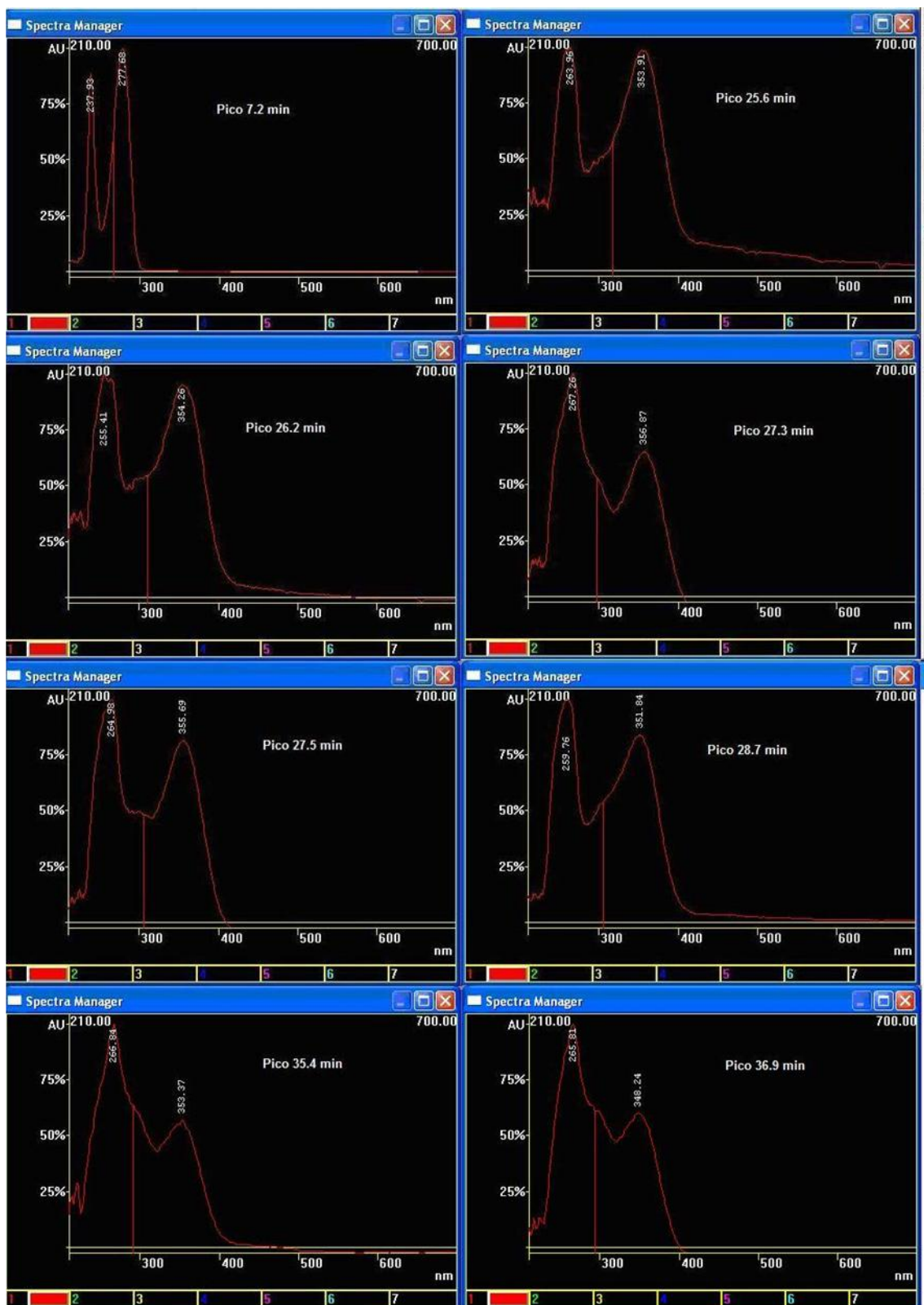


Figura 3.60.- Espectros de los picos principales de la muestra proveniente de Catamarca (hospedante “olivo”)



Olivo

Como puede observarse en forma preliminar, el perfil de los picos principales es similar a los dos hospedantes anteriores (“algarrobo” y “retama”). La presencia de catequina puede inferirse (por la similitud de los espectros y de los tiempos de retención con los correspondientes testigos) así como también la presencia de glicósidos de quercetina, tales como, quercetina-3-O-glucósido (en baja concentración), quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido y furanosido y quercetina-3-O-ramnósido. Nuevamente, se observa la presencia de 3 compuestos desconocidos, cuyos espectros son similares entre sí y respecto a las muestras de San Juan.

Figura 3.61.- Extracto metanólico de la muestra de Catamarca (hospedante “chañar”)

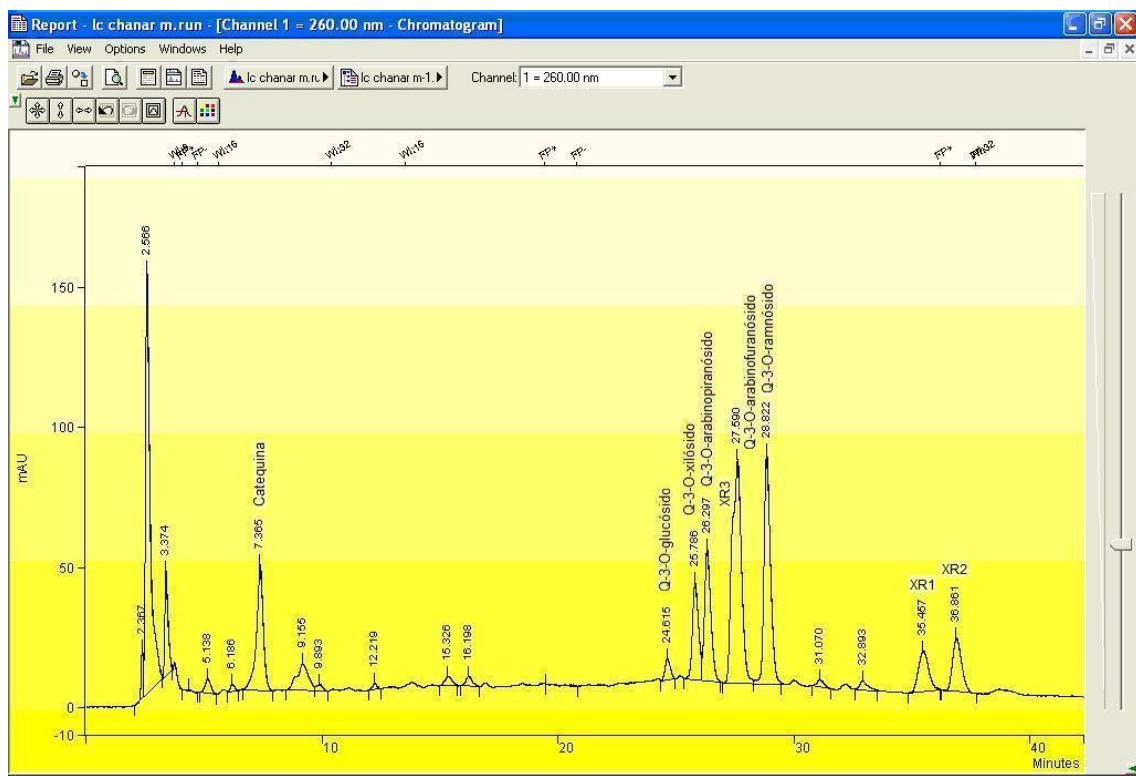
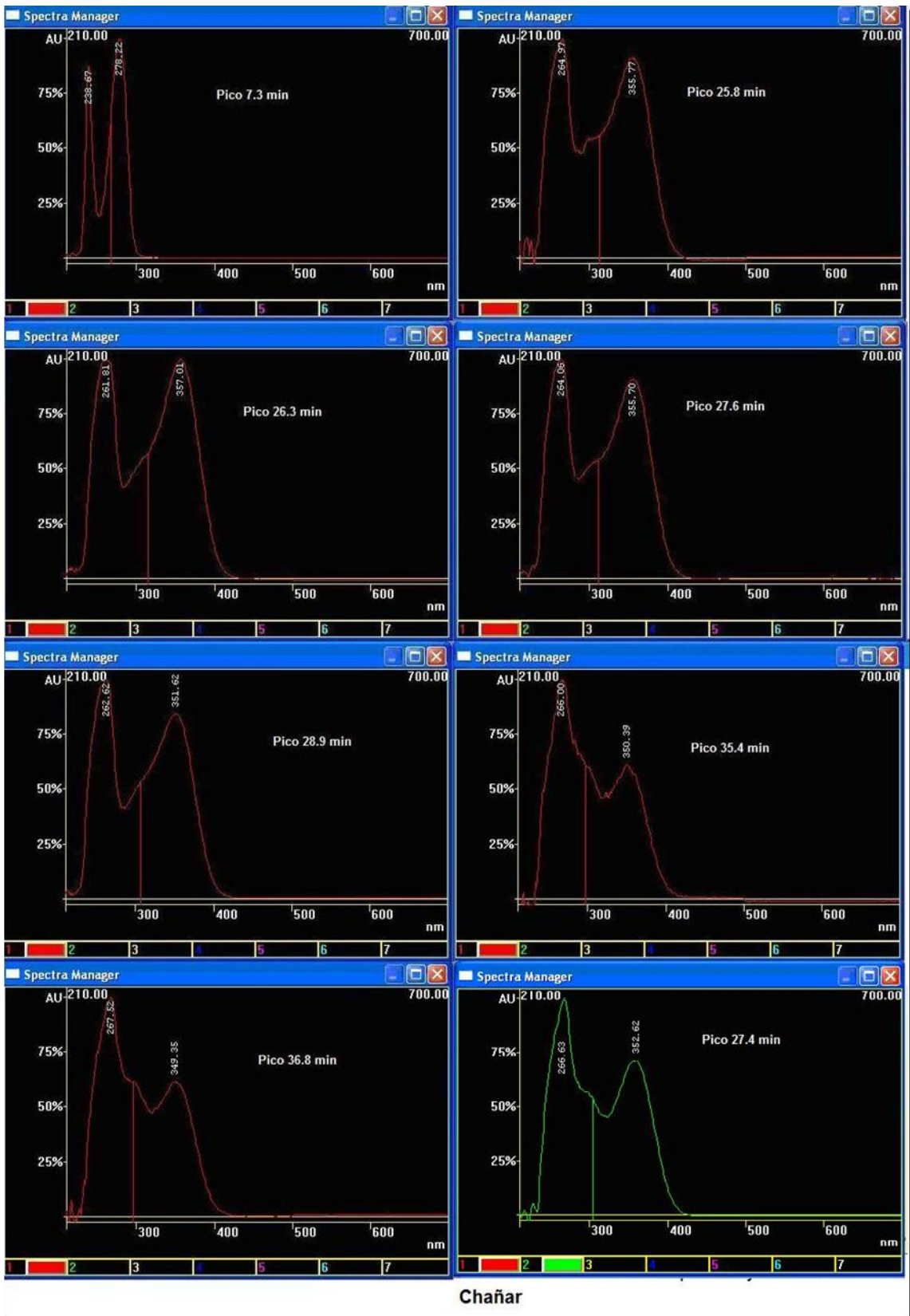
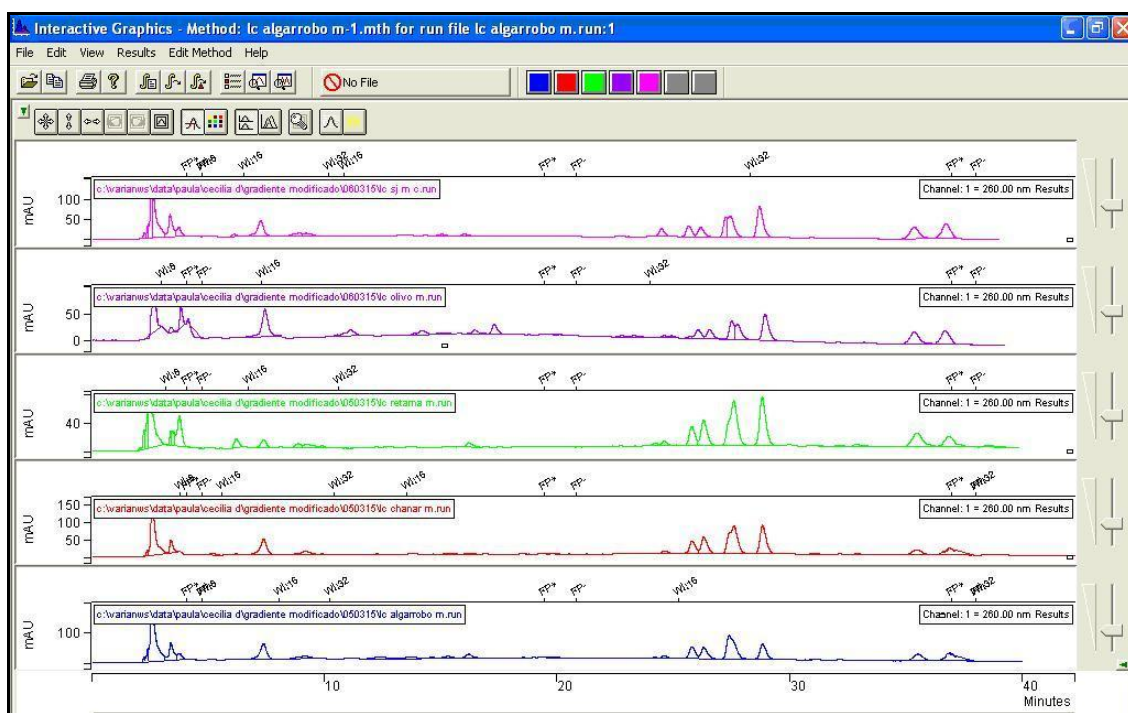


Figura 3.62.- Espectros de los picos principales de la muestra proveniente de Catamarca (hospedante “chañar”)



Como puede observarse en forma preliminar, el perfil de los picos principales es similar a los hospedantes anteriores (algarrobo, retama, olivo). La presencia de catequina puede inferirse (por similitud de espectros y de tiempos de retención con los correspondientes testigos) así como también la presencia de glicósidos de quercetina, tales como quercetina-3-O-glucósido (en baja concentración), quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranósido y furanósido y quercetina-3-O-ramnósido. Nuevamente, se observa la presencia de 3 compuestos desconocidos, cuyos espectros son similares entre sí y respecto a las muestras de San Juan.

Figura 3.63.- Comparación entre los distintos hospedantes (“chañar”, “algarrobo”, “retama” y “olivo”) para las muestras de Catamarca y la muestra de San Juan



De arriba hacia abajo: muestra de San Juan; hospedantes “olivo”, “retama”, “chañar” y “algarrobo”.

Los perfiles cromatográficos de las muestras de Catamarca son, preliminarmente, similares entre sí. En la tabla 3.24 se muestra un resumen de los compuestos encontrados en las muestras provenientes de Catamarca.

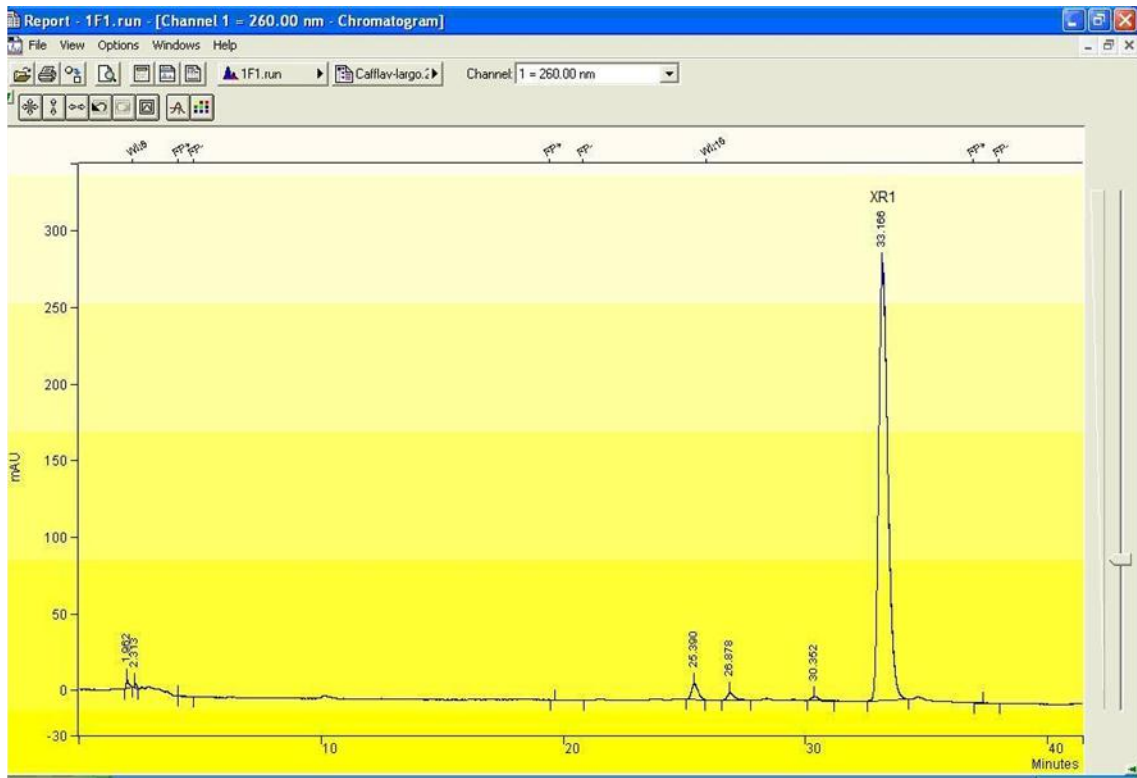
Tabla 3.24.- Compuestos presentes en las muestras de Catamarca

Catamarca				
Extractos metanólicos				
Hospedantes	“Chañar”	“Retama”	“Algarrobo”	“Olivo”
Compuestos	Catequina	Catequina	Catequina	Catequina
	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G
	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X
	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP
	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF
	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM	Q-3-O-RAM
	XR1	XR1	XR1	XR1
	XR2	XR2	XR2	XR2
	XR3	XR3	XR3	XR3

Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido; Q-3-O-AF: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-RAM: quercetina-3-O-ramnósido; XR1, XR2, XR3: compuestos desconocidos.

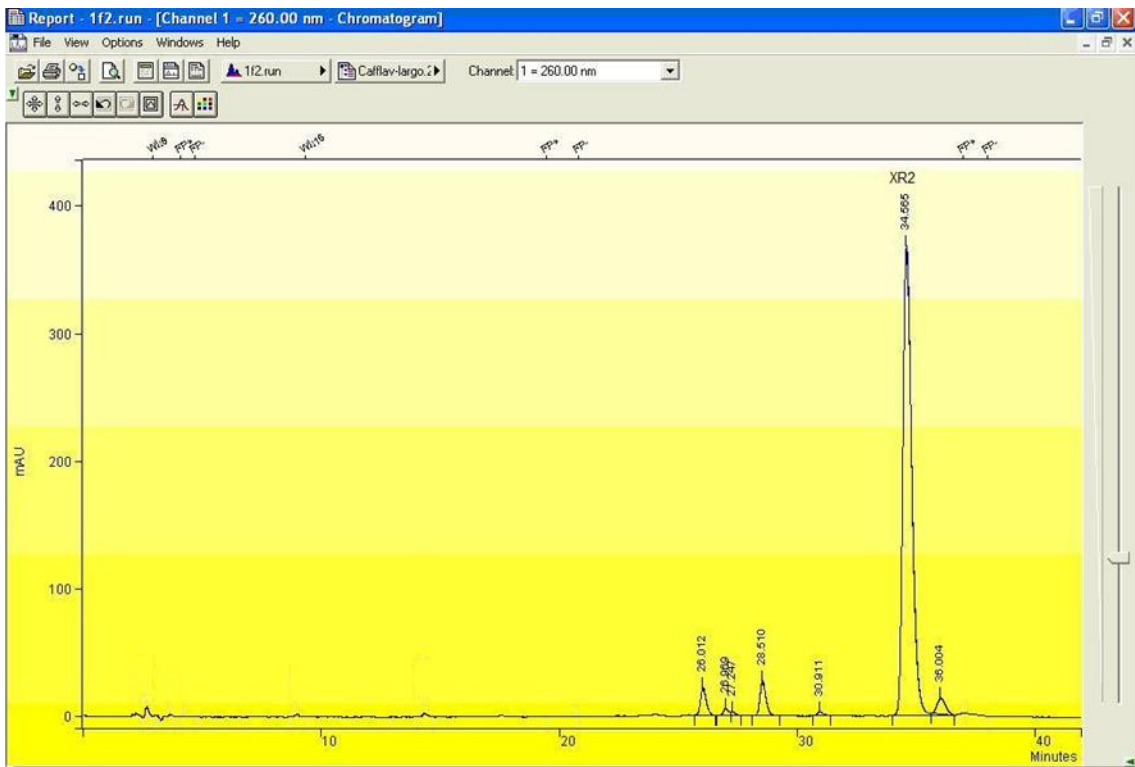
A continuación, se procede al estudio de las bandas purificadas a partir de la fracción acetato de etilo “MeOH combinado” (hoja), de las muestras provenientes de San Juan. En todos los casos, las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Figura 3.64.- Banda 1F1 purificada a partir de la fracción acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan (“MeOH combinado-AE”)



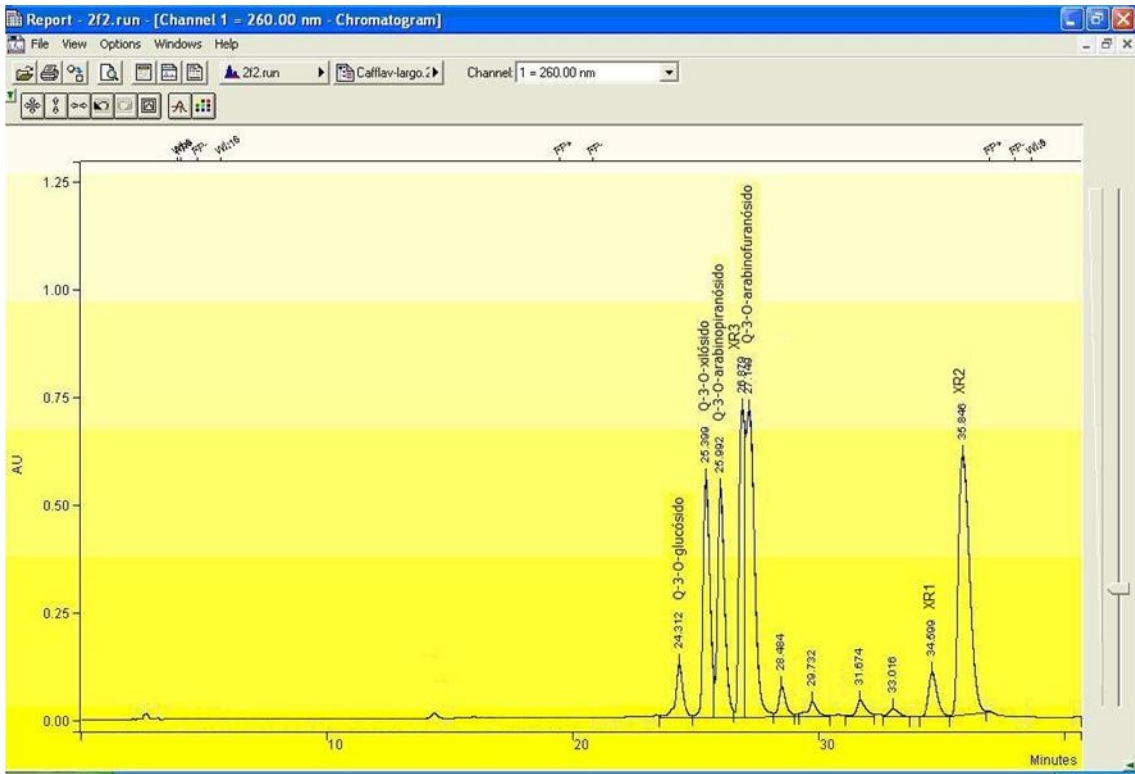
Se observa la presencia del compuesto desconocido XR1.

Figura 3.65.- Banda 1F2 purificada a partir de la fracción acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan (“MeOH combinado-AE”)



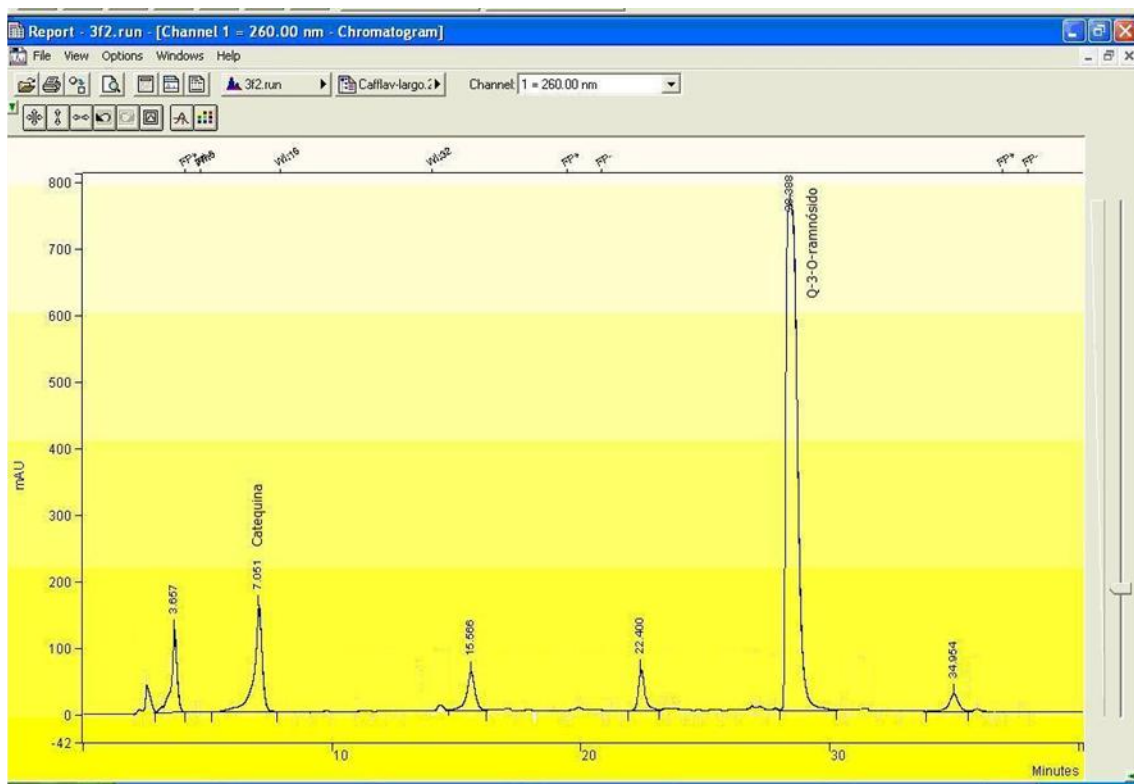
Se observa la presencia del compuesto desconocido XR2.

Figura 3.66.- Banda 2F2 purificada a partir de la fracción acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan (“MeOH combinado-AE”)



Se observa en forma preliminar la presencia de quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido y 3 compuestos desconocidos, denominados XR1, XR2 y XR3.

Figura 3.67.- Banda 3F2 purificada a partir de la fracción acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan (“MeOH combinado-AE”)



Se observa la presencia de catequina y de quercetina-3-O-ramnósido. El resumen de los compuestos encontrados en las bandas purificadas se presenta en la tabla 3.25.

Tabla 3.25.- Compuestos presentes en las bandas purificadas

	1F1	1F2	2F2	3F2
Compuestos	XR1	XR2	Q-3-O-glucósido	Catequina
			Q-3-O-xilósido	Q-3-O-ramnósido
			Q-3-O-arabinopiranósido	
			Q-3-O-arabinofuranósido	
			XR3	
			Q-3-O-ramnósido (baja concentración)	
			XR1 (baja concentración)	
			XR2	

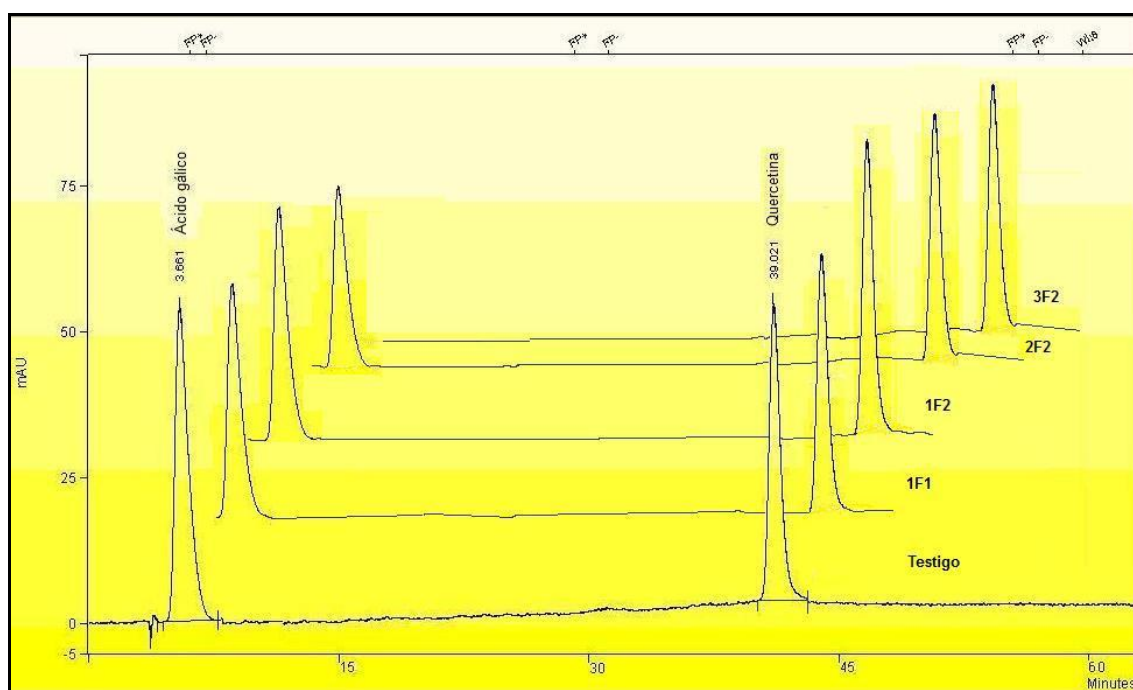
Q-3-O-glucósido: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-xilósido: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-arabinopiranósido: quercetina-3-O-arabinopiranósido; Q-3-O-arabinofuranósido: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-ramnósido: quercetina-3-O-ramnósido; XR1, XR2, XR3: compuestos desconocidos.

Posteriormente, se realizó los estudios sobre los hidrolizados de las bandas de interés.

Aglicona y ácido gálico

En una misma corrida cromatográfica se analizó la presencia de quercetina y ácido gálico. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Figura 3.68.- Comparación entre los hidrolizados de las bandas frente a los testigos de quercetina y ácido gálico



Se observa la presencia de quercetina como único aglicón para las bandas analizadas. El ácido gálico se detecta en las bandas 1F1, 1F2 y 2F2.

En la tabla 3.26 se presenta un resumen de los compuestos encontrados en los hidrolizados de las bandas purificadas.

Tabla 3.26.- Compuestos presentes en los hidrolizados de las bandas purificadas

	1F1	1F2	2F2	3F2
Compuestos	Quercetina Ácido gálico	Quercetina Ácido gálico	Quercetina Ácido gálico	Quercetina

3.4. Análisis estructural

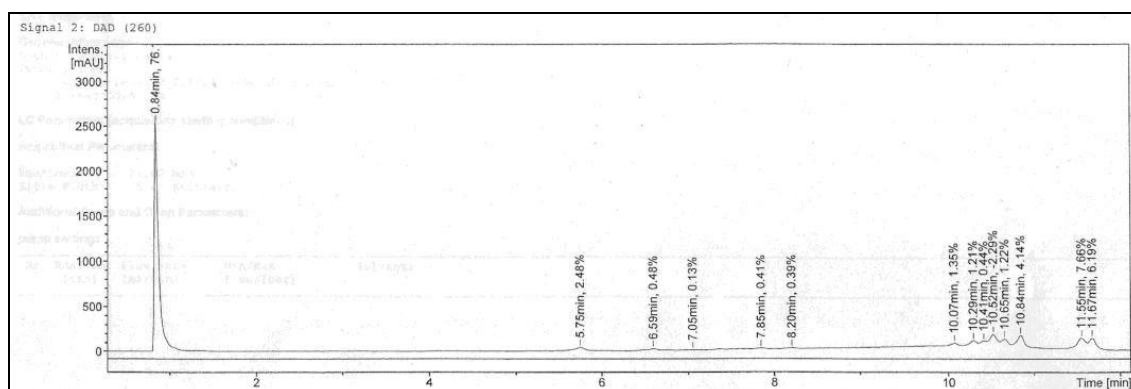
3.4.1. Espectroscopia UV-Visible

Sobre las bandas purificadas, se realizó el estudio con reactivos de desplazamiento por espectroscopia UV y los resultados obtenidos confirman los hallazgos previos (Wagner, 1993; Varela y col., 2001). En cuanto a los compuestos desconocidos, coinciden con la bibliografía (Iwagawa y col., 1990; Lin y col., 2002, Moharram y col., 2006).

3.4.2. HPLC-masa

Se realizó la corrida cromatográfica en un HPLC-masa (Q-TOF ESI-MS/MS) de la fracción acetato de etilo obtenida a partir de extracciones sucesivas con distintas proporciones de metanol sobre hoja, en la muestra proveniente de San Juan (hoja “MeOH combinado-AE”). Se determina el ión molecular y los fragmentos asociados.

Figura 3.69.- Fracción acetato de etilo de la muestra de San Juan (hoja-“MeOH combinado-AE”)



En las figuras 3.70, 3.71 y 3.72 se presentan los esquemas de los mecanismos de fragmentación para flavanoles y flavonoles. En la figura 3.73 se muestra el esquema del mecanismo de fragmentación propuesto para los glicósidos de flavonoles unidos al ácido gálico. El mecanismo de fragmentación es el propuesto por Wolfender y col. (2000), Cuyckens y col. (2004) y Liao y col. (2012). La nomenclatura utilizada es de acuerdo con Domon y Costello (1988), Ma y col. (1999) y Liao y col. (2012).

Figura 3.70.- Mecanismo de fragmentación y nomenclatura para los flavanoles

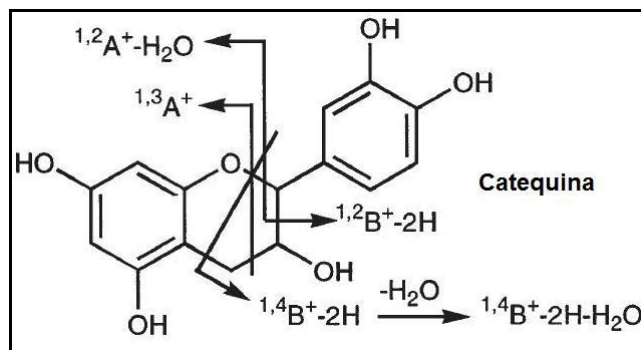


Figura 3.71.- Mecanismo de fragmentación y nomenclatura para los flavonoles

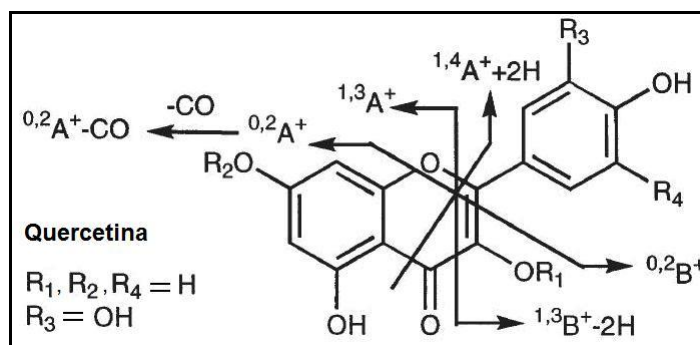


Figura 3.72.- Mecanismo de fragmentación propuesto y nomenclatura para los glicósidos de flavonoles

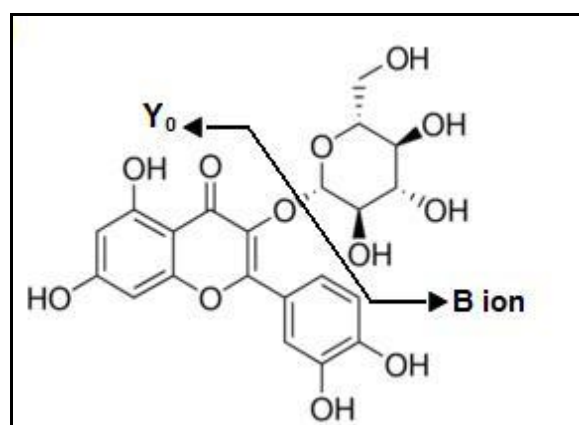
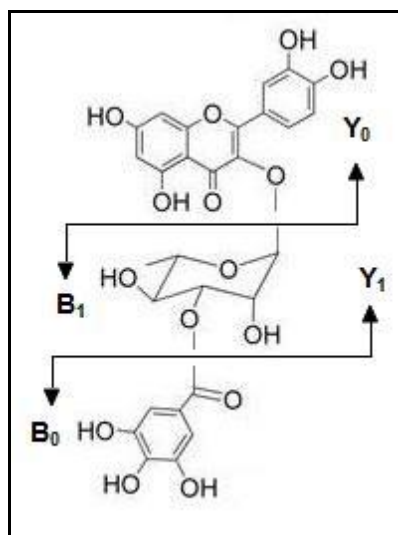


Figura 3.73.- Mecanismo de fragmentación y nomenclatura para los glicósidos de flavonoles unidos al ácido gálico



Se enumeran los picos analizados, los resultados obtenidos para el ión molecular y los fragmentos asociados y la asignación preliminar del compuesto correspondiente.

Tabla 3.27.- Los picos principales y los espectros de primer y segundo orden correspondientes

Tiempo de retención (minutos)	Ión Precursor		Fragmentos		
	m/z [M+H] ⁺	Fórmula	m/z [M+H] ⁺	Fórmulas	Mecanismo de fragmentación
5,8	291,08631	C ₁₅ H ₁₅ O ₆	123,04406	C ₇ H ₇ O ₂	^{1,2} B ⁺ -2H
			139,03897	C ₇ H ₇ O ₃	^{1,3} A ⁺
			147,04406	C ₉ H ₇ O ₂	^{1,4} B ⁺ -2H-H ₂ O
			165,05342		^{1,4} B ⁺ -2H
10,1	465,10275	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	303,04703	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	Y ₀ ⁺
10,3	435,09219	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₁	303,04703	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	Y ₀ ⁺
10,4	435,09219	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₁	303,04703	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	Y ₀ ⁺
10,5	587,10315	C ₂₇ H ₂₃ O ₁₅	303,04993	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	Y ₀ ⁺
			153,01824	C ₇ H ₅ O ₄	[B ₀] ⁺ [Galoilo] ⁺
			285,05746	C ₁₂ H ₁₃ O ₈	[B ₁] ⁺
			231,02880	C ₁₂ H ₇ O ₅	C ₁₂ H ₉ O ₆ - H ₂ O [B ₁ -3H ₂ O] ⁺
			249,03936	C ₁₂ H ₉ O ₆	C ₁₂ H ₁₁ O ₇ - H ₂ O [B ₁ -2H ₂ O] ⁺
			267,04993	C ₁₂ H ₁₁ O ₇	C ₁₂ H ₁₃ O ₈ - H ₂ O [B ₁ -H ₂ O] ⁺
10,65	435,09219	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₁	303,04703	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	Y ₀ ⁺
10,8	449,10784	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	303,04703	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	Y ₀ ⁺
11,6	601,11880	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₅	303,04703	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	Y ₀ ⁺
			207,02880	C ₁₀ H ₇ O ₅	
			219,06301		
			153,01824	C ₇ H ₅ O ₄	[B ₀] ⁺ [Galoilo] ⁺
			299,07614	C ₁₃ H ₁₅ O ₈	[B ₁] ⁺
			263,05501	C ₁₃ H ₁₁ O ₆	C ₁₃ H ₁₃ O ₇ - H ₂ O [B ₁ - 2 H ₂ O]
281,06331	C ₁₃ H ₁₃ O ₇	C ₁₃ H ₁₅ O ₈ - H ₂ O [B ₁ - H ₂ O]			
11,7	601,11880	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₅	303,04703	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	Y ₀ ⁺
			153,01824	C ₇ H ₅ O ₄	[B ₀] ⁺ [Galoilo] ⁺
			299,07614	C ₁₃ H ₁₅ O ₈	[B ₁] ⁺

En el caso del pico de tr 5,8 minutos, el ión molecular y los fragmentos asociados son propios de un flavanol. Por comparación con la literatura (Wolfender y col. 2000) y los resultados de los análisis cromatográficos previos puede inferirse la presencia de catequina.

Para los glicósidos, los iones moleculares obtenidos indican la presencia de un hexósido ($[M+H]^+$ 465), pentósidos ($[M+H]^+$ 435) y un desoxi-azúcar ($[M+H]^+$ 449).

Por fragmentación, en todos ellos se observa la presencia del ión molecular ($[M+H]^+$ 303) característico de la quercetina, como único aglicón.

En el caso de los compuestos desconocidos, los iones moleculares y los fragmentos asociados son consistentes con glicósidos de quercetina unidos a ácido gálico. El análisis de los hidrolizados se correlaciona con estos hallazgos. Esto también es coincidente con la bibliografía (Liao y col., 2012, 2013 y 2014; Iwagawa y col., 1990; Sannomiya y col., 2005 y 2007; Al-Sayed y col. 2012). Es posible inferir la naturaleza del azúcar por la información surgida de las hidrólisis de las bandas purificadas. En este caso, se trataría de ramnosa (para los picos de ión molecular 601) con el gálico unido en dos posiciones distintas (el orden de elución es el propuesto por Lu y col., 2010 y Liao y col., 2012 y 2013) y arabinosa o xilosa (para el pico de ión molecular 587).

De acuerdo con la información obtenida y los resultados de los análisis cromatográficos se pudo preliminarmente identificar los siguientes compuestos:

Tabla 3.28.- Asignación preliminar de compuestos

Tiempo de retención (minutos)	Compuesto
5,80	Catequina
10,10	Quercetina-3-O-glucósido
10,30	Quercetina-3-O-xilósido
10,40	Quercetina-3-O-arabinopiranosido
10,50	Galoil pentósido de quercetina
10,65	Quercetina-3-O-arabinofuranósido
10,80	Quercetina-3-O-ramnósido
11,60	Quercetina-3-O-(2''galoil)- ramnósido
11,70	Quercetina-3-O-(3''galoil)-ramnósido

3.4.3. RMN

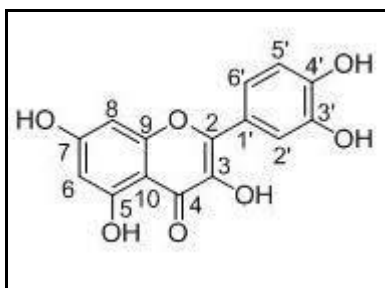
Se procedió a realizar el análisis por RMN sobre las bandas purificadas. Se efectuó también el análisis de los testigos quercetina, catequina y ácido gálico a fin de ubicar las principales señales.

Se trabajó con dos solventes, tetradeuterometanol (CD_3OD) y hexadeuterodimetil-sulfóxido ($DMSO-d_6$).

Los espectros que se muestran a continuación se realizan en un Sistema Bruker Avance III.

Quercetina testigo

Figura 3.74.- Quercetina



En la tabla 3.29 se observan las correlaciones correspondientes a 1H y ^{13}C vecinos (HSQC) y de larga distancia (HMBC). Se asignan las multiplicidades (d: doblete; s: singlete; dd: doble doblete) y los valores de J .

Tabla 3.29.- Asignación espectral para quercetina

Átomo	¹³ C	¹ H	<i>J</i>	HMBC
	δ ppm	δ ppm	Hz	
2	147,36			
3	135,83			
4	175,92			
5	161,11			
6	97,82	6,20 (1H; d)	2,0	7, 8, 5, 10
7	164,17			
8	92,99	6,40 (1H; d)	2,0	6, 7, 9, 10
9	156,82			
10	103,11			
1'	122,73			
2'	114,57	7,75 (1H; d)	2,2	1', 6', 3', 4'
3'	144,81			
4'	146,57			
5'	114,81	6,90 (1H; d)	8,5	6', 4', 3'
6'	120,26	7,65 (1H; dd)	8,5;2,1	2', 4', 5'

S:singlete; d: doblete; dd: doble doblete

Catequina testigo

Figura 3.75.- Catequina

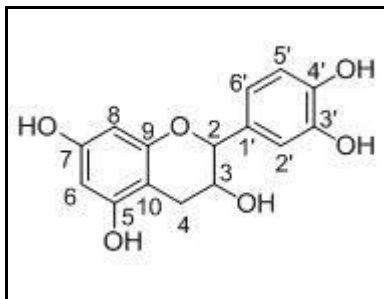


Tabla 3.30.- Asignación espectral para catequina

Átomo	¹³ C	¹ H	<i>J</i>	HMBC
	δ ppm	δ ppm	Hz	
2	81,47	4.58 (1H; d)	6.5	9, 6', 2', 1', 3, 4
3	67,42	3.99 (1H; m)		2, 1', 4, 10
4 α	27,12	2.52 (1H; dd)	16,36; 3,40	9, 10, 3, 2
4 β	27,12	2.87 (1H; dd)	16,36; 7,88	9, 10, 3, 2
5	156,19			
6	94,89	5.95 (1H; s)		8, 7, 5, 10
7	156,45			
8	94,10	5.87 (1H; s)		6, 7, 9, 10
9	155,53			
10	99,42			
1'	130,83			
2'	113,86	6.86 (1H; s)		1', 6', 3', 4'
3'	144,86			
4'	144,84			
5'	114,68	6.77 (1H; d)	8,23	1', 6', 4', 3'
6'	118,64	6.74 (1H; d)	8,23	2', 1', 5', 4'

S:singlete; d: doblete; dd: doble doblete

Ácido gálico testigo

Figura 3.76.- Ácido gálico

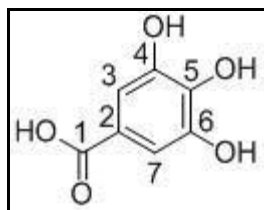


Tabla 3.31.- Asignación espectral para ácido gálico

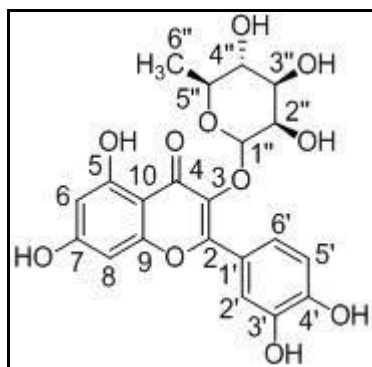
Átomo	¹³ C	¹ H	HMBC
	δ ppm	δ ppm	
1 (C=O)	170,18		
2	120,83		
3 y 7	110,01	6,98	1, 2, (4 y 6), (3 y 7)
4 y 6	138,01		
5	144,42		

Se procede a realizar el análisis RMN sobre las bandas purificadas.

Banda 3F2

Teniendo en cuenta los datos cromatográficos, la hidrólisis de la banda purificada, la información obtenida del HPLC-masa y la información de la bibliografía en lo que refiere a los compuestos hallados en esta especie, se concluye preliminarmente que la banda 3F2 presenta dos compuestos principales, quercetina-3-O- α -L-ramnósido y catequina. Esto se verifica mediante el análisis por RMN. En la figura 3.77 se muestra la quercetina-3- α -L-O-ramnósido.

Figura 3.77.- Quercetina-3-O- α -L-ramnósido



En la tabla 3.32 se presentan las correlaciones C-H vecinos y a larga distancia (HMBC), además de la multiplicidad y las *J*.

Tabla 3.32.- Asignación espectral para quercetina-3-O- α -L ramnósido

Átomo	^{13}C	^1H	<i>J</i>	HMBC
	δ ppm	δ ppm		
2	157,92			
3	134,94			
4 (C=O)	177,03			
5	161,90			
6	98,48	6,22 (1H; d)	2,11	5, 7, 8, 10
7	164,17			
8	93,33	6,40 (1H; d)	2,11	6, 7, 9, 10
9	157,1			
10	104,5			
1'	121,55			
2'	115,37	7,36 (1H, d)	2,2	2, 1', 3', 4'
3'	145,07			
4'	148,45			
5'	114,98	6,93 (1H; d)	8,4	3', 4', 6'
6'	121,47	7,33 (1H; dd)	8,40; 2,12	2, 2', 4'
1''	102,19	5,37 (1H; d)	1,68	3, 2'', 3'', 5''
2''	70,52	4,24 (1H; dd)	3,36; 1,68	1'', 3'', 4''
3''	70,71	3,77 (1H; dd)	9,46; 3,36	2'', 4'', 5''
4''	71,85	3,32 (1H; dd)	3,36; 1,66	2'', 3'', 5''
5''	70,65	3,44 (1H; dd)	9,46; 6,16	2'', 3'', 4'', 6''
6'' (CH ₃)	16,27	0,96 (1H; d)	6,25	4'', 5''

Los resultados obtenidos coinciden con la bibliografía (Fossen y col., 2006)

La presencia de la quercetina como aglicón se evidencia por comparación de las señales con el espectro de la quercetina testigo. La presencia de la ramnosa puede inferirse por el grupo metilo a 0,96 ppm. Como puede observarse, la unión de la ramnosa en la posición 3 de la quercetina se verifica en el HMBC por la conectividad existente entre el H del carbono anomérico (5,37 ppm) y el carbono 3 de la quercetina (134,94 ppm). La configuración α de la ramnosa se infiere por los pequeños valores de J del doblete correspondiente al H anomérico.

El segundo compuesto presente en la banda 3F2 sería la catequina. Esto también se correlaciona con la información obtenida a partir de las corridas en TLC, EC y HPLC y HPLC-masa. En la tabla 3.33 se muestra la asignación espectral correspondiente a la catequina.

Tabla 3.33.- Asignación espectral para catequina

Átomo	^{13}C	^1H	J	HMBC
	δ ppm	δ ppm	(Hz)	
2	81.47	4.58 (1H; d)	6.5	9, 6', 2', 1', 3, 4
3	67.42	3.99 (1H; m)		2, 1', 4, 10
4 α	27.12	2.52 (1H; dd)	16.36, 3.40	9, 10, 3, 2
4 β	27.12	2.87 (1H; dd)	16.36, 7.88	9, 10, 3, 2
5	156.19			
6	94.89	5.95 (1H; s)		8, 7, 5, 10
7	156.45			
8	94.10	5.87 (1H; s)		6, 7, 9, 10
9	155.53			
10	99.42			
1'	130.83			
2'	113.86	6.86 (1H; s)		1', 6', 3', 4'
3'	144.86			
4'	144.84			
5'	114.68	6.77 (1H; d)	8.23	1', 6', 4', 3'
6'	118.64	6.74 (1H; d)	8.23	2', 1', 5', 4'

Para ambos compuestos, los resultados obtenidos se correlacionan con la información cromatográfica, los espectros RMN de los testigos, las hidrólisis y la bibliografía (Fossen y col., 2006)

Las compuestos correspondientes a las bandas 1F1 y 1F2 que se muestran a continuación se corresponden con el ión molecular $[M+H]^+$ de 601. De acuerdo con el patrón de fragmentación por HPLC-masa obtenido y la bibliografía, puede inferirse que se trata de dos galoil ramnósidos de quercetina que difieren en la posición de unión del ácido gálico a la molécula del azúcar. De acuerdo con la bibliografía consultada (Lu y col., 2010; Liao y col., 2012 y 2013), en la corrida del HPLC la molécula en la cual el residuo galoilo se encuentra unido en la posición 2 de la ramnosa eluye antes que en la posición 3.

Banda 1F2

De acuerdo con la información obtenida de las técnicas cromatográficas y el análisis del hidrolizado de la banda 1F2 puede preliminarmente inferirse la presencia del compuesto que se muestra en la figura 3.78.

Figura 3.78.- Estructura propuesta para el compuesto en 1F2

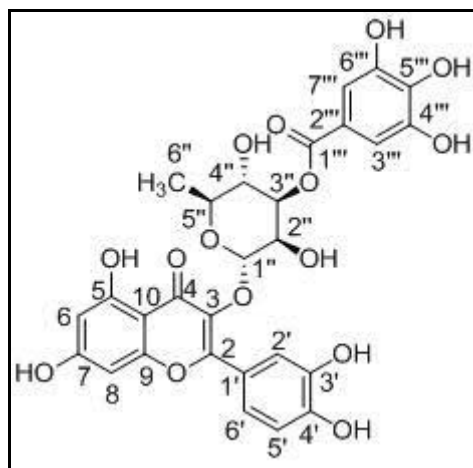


Tabla 3.34.- Asignación espectral para quercetina-3-O- α -L- (3''-O-galoil) ramnósido

Átomo	¹³ C	¹ H	<i>J</i>	HMBC
	δ ppm	δ ppm	(Hz)	
2	157,98			
3	134,85			
4 (C=O)	178,40			
5	163,05			
6	98,46	6,24 (1H; d)	2,11	5, 7, 8, 10
7	164,57			
8	93,35	6,42 (1H; d)	2,11	6, 7, 9, 10
9	157,20			
10	104,60			
1'	121,70			
2'	115,42	7,40 (1H, dd)	2,2	2, 1', 3', 4'
3'	145,12			
4'	148,60			
5'	115,15	6,97 (1H; d)	8,4	3', 4', 6'
6'	121,68	7,42 (1H; d)	2,12; 8,40	2', 4', 2
1''	102,07	5,41 (1H; d)	1,11	3, 2'', 3'', 5''
2''	68,55	4,50 (1H; dd)	3,34; 1,11	1'', 3'', 4''
3''	73,91	5,25 (1H; dd)	9,56; 3,34	2'', 4'', 5'', 1'''
4''	70,93	3,61 (1H; m)		2'', 3'', 5''
5''	69,44	3,69 (1H; m)		2'', 3'', 4'', 6''
6'' (CH ₃)	16,34	1,02 (1H; d)	6,11	4'', 5''
1'''(C=O)	166,80			
2'''	120,50			
3''' y 7'''	109,11	7,19		1''', 2''', (4''', y 6'''), (3''', y 7''')
4''' y 6'''	138,69			
5'''	145,11			

La presencia de la quercetina como aglicón se evidencia por comparación de las señales con el espectro de la quercetina testigo. La presencia de la ramnosa puede inferirse por el grupo metilo a 1,02 ppm. Como puede observarse, la unión de la ramnosa en la posición 3 de la quercetina se verifica en el HMBC por la conectividad a larga distancia existente entre el H-1, correspondiente al carbono anomérico (5,41 ppm) y el carbono 3 de la quercetina (134,85 ppm). La configuración α de la ramnosa se infiere por los

valores de J del H-1/H-2. La presencia de ácido gálico se verifica por las señales coincidentes con el testigo y la conexión con la ramnosa se evidencia en el HMBC por la conexión entre el H-3 del azúcar (5,25 ppm) y el carbonilo del ácido (166,80 ppm). Los resultados obtenidos coinciden con la bibliografía (Lin y col., 2002; Moharram y col., 2006)

Banda 1F1

Figura 3.79.- Estructura propuesta para el compuesto en 1F1

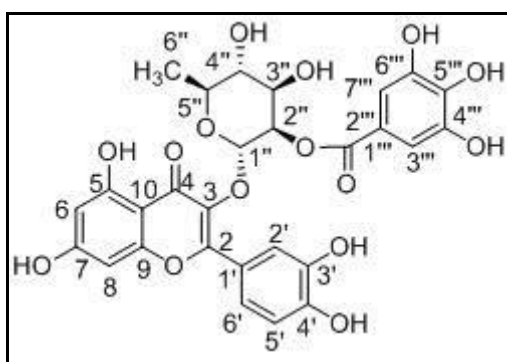


Tabla 3.35.- Asignación espectral para quercetina-3-O- α -L-(2''-O-galoil) ramnósido

Átomo	¹³ C	¹ H	<i>J</i>	HMBC
	δ ppm	δ ppm	(Hz)	
2	156,59			
3	133,51			
4 (C=O)	177,93			
5	164,96			
6	99,05	6,22 (1H; d)	2,1	5, 7, 8, 10
7	162,53			
8	94,10	6,42 (1H; d)	2,1	6, 7, 9, 10
9	157,57			
10	104,00			
1'	121,30			
2'	116,12	7,51 (1H, dd)	2,3; 7,4	2, 1', 3', 4'
3'	145,72			
4'	148,20			
5'	116,45	6,90 (1H; d)	8,4	3', 4', 6'
6'	121,38	7,56 (1H; d)	2,1	2', 4', 2
1''	98,81	5,51 (1H; d)	1,55	3, 2'', 3'', 5''
2''	72,16	5,46 (1H, dd)	3,33; 1,62	1'', 3'', 4'', 1'''
3''	70,10	3,79	9,56; 3,34	2'', 4'', 5''
4''	70,38	3,11		2'', 3'', 5''
5''	71,10	3,28		2'', 3'', 4'', 6''
6'' (CH ₃)	18,03	0,93 (1H; d)	6,01	4'', 5''
1'''(C=O)	165,46			
2'''	119,70			
3''' y 7'''	109,11	7,03		1''', 2''', (4''' y 6'''), (3''' y 7''')
4''' y 6'''	139,09			
5'''	145,93			

La presencia de quercetina como aglicón se evidencia por comparación de señales con el espectro de quercetina testigo. La presencia de ramnosa puede inferirse por el grupo metilo a 0,93 ppm. Como puede observarse, la unión de ramnosa en la posición 3 de quercetina se verifica en el HMBC por la conectividad existente entre el H-1, correspondiente al carbono anomérico (5,51 ppm) y el carbono 3 de quercetina (133,51 ppm). La configuración α de ramnosa se infiere por los valores de *J* del H-1/H-2. La

presencia de ácido gálico se verifica por las señales coincidentes con el testigo y la conexión con ramnosa se evidencia en el HMBC por la conexión entre el H-2 del azúcar (5,46 ppm) y el carbonilo del ácido (165,46 ppm).

Estos resultados coinciden con la bibliografía (Isobe y col., 1981; Peng y col., 2003; Estrada y col., 2005; Kim y col., 2000 y 2013; Lee y col., 2013)

En el caso de los compuestos presentes en las bandas 1F1 y 1F2, son reportados por primera vez en *Ligaria cuneifolia*.

Banda 2F2

El ensayo se realiza en DMSO-d6

DOSY (diffusion ordered spectroscopy)

La espectroscopia de difusión es una técnica de gradiente de pulso que permite la separación de compuestos presentes en una mezcla. Es también llamada cromatografía RMN y permite obtener coeficientes de difusión característicos de cada compuesto presente en la mezcla. Dado que en la banda 2F2 se encuentran presentes varios compuestos, se prueba esta metodología en forma complementaria a los ensayos comúnmente utilizados para la caracterización de compuestos.

Se presentan los resultados obtenidos correspondientes a los espectros de ^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC.

En el caso de los compuestos previamente encontrados en esta especie, se presentan solamente las asignaciones correspondientes al azúcar, ya que quercetina se presenta como único aglicón.

Figura 3.80- Quercetina-3- α -L-arabinofuranósido

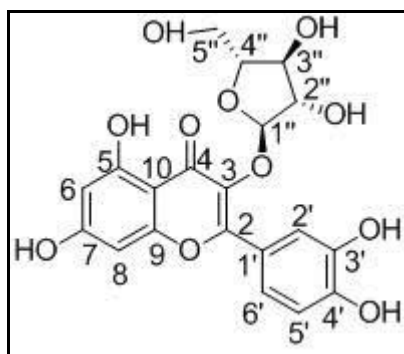


Tabla 3.36.- Asignación espectral para quercetina-3-O- α -L-arabinofuranósido

Átomo	^{13}C	^1H	<i>J</i>
	δ ppm	δ ppm	
1''	108,30	5,57 (1H, s)	
2''	82,61	4,18 (1H; dd)	5,5; 1,3
3''	77,28	3,73	
4''	86,27	3,58	
5''	61,8	3,32	

El siguiente compuesto se corresponde con el $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 587. De acuerdo con la información obtenida de las técnicas cromatográficas, las hidrólisis y la bibliografía consultada, se propone la estructura que se muestra en la figura 3.81-

Figura 3.81.- Quercetina-3-O- α -D-(2'' galoil)-arabinofuranósido

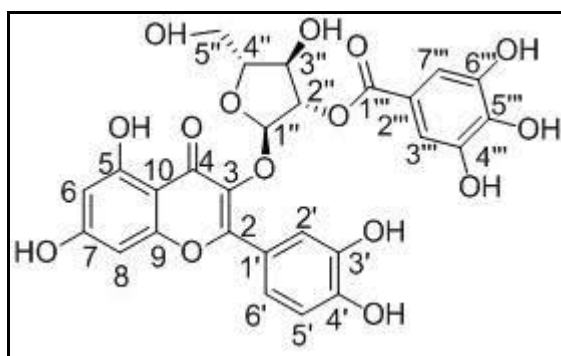


Tabla 3.37.- Asignación espectral para quercetina-3-O- α -D-(2''-O-galoi)-arabinofuranósido

Átomo	¹³ C	¹ H	<i>J</i>	HMBC
	δ ppm	δ ppm	(Hz)	
2	156,63			
3	133,57			
4 (C=O)	177,87			
5	165,15			
6	99,03	6,22 (1H; d)	2,1	5, 7, 8, 10
7	162,55			
8	94,15	6,42 (1H; d)	2,1	6, 7, 9, 10
9	157,63			
10	104,12			
1'	121,35			
2'	116,17	7,51 (1H, dd)	2,3; 7,4	2, 1', 3', 4'
3'	145,43			
4'	149,08			
5'	116,15	6,90 (1H; d)	8,4	3', 4', 6'
6'	121,43	7,56 (1H; d)	2,1	2', 4', 2
1''	108,30	5,59 (1H, d)	1	3, 2'', 3'', 5''
2''	72,10	5,34 (1H, d)	2,1	1'', 3'', 4'', 1'''
3''	77,28	3,73		2'', 4'', 5''
4''	86,27	3,58		2'', 3'', 5''
5''	61,80	3,32		2'', 3'', 4''
1'''(C=O)	165,51			
2'''	119,92			
3''' y 7'''	109,11	7,03		1''', 2''', (4''', y 6'''), (3''', y 7''')
4''' y 6'''	139,07			
5'''	145,97			

La presencia de quercetina como aglicón se evidencia por comparación de señales con el espectro de quercetina testigo. La presencia de arabinosa en su forma furanósica puede inferirse por la señal característica del C anomérico (108,3 ppm). Como puede observarse, la unión de arabinofuranosa en la posición 3 de quercetina se verifica en el HMBC por la conectividad existente entre el H-1, correspondiente al carbono

anomérico (5,59 ppm) y el carbono 3 de quercetina (133,57 ppm). La configuración α por los valores de J de H-1/H-2. La presencia de ácido gálico se verifica por las señales coincidentes con el testigo y la conexión con arabinofuranosa se evidencia en el HMBC por la conectividad entre el H-2 del azúcar (5,34 ppm) y el carbonilo del ácido (165,51 ppm).

La estructura propuesta coincide con la bibliografía consultada (Fan y col., 2010; Fossen y col., 2006)

Figura 3.82.- Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosido

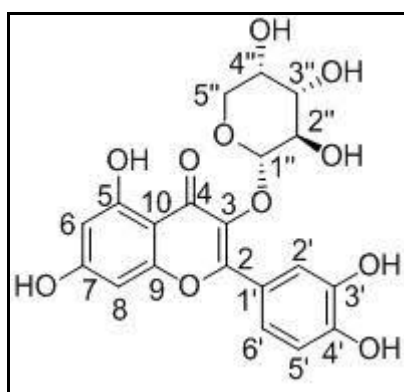


Tabla 3.38.- Asignación espectral para quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosido

Átomo	^{13}C	^1H	J
	δ ppm	δ ppm	Hz
1''	101,90	5,28 (1H, d)	5,3
2''	71,15	3,77	
3''	72,12	3,54	
4''	67,2	3,62	
5''	64,6	3,38	

El siguiente compuesto se corresponde con el $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 587. De acuerdo con la información obtenida de las técnicas cromatográficas, las hidrólisis y la bibliografía consultada, se propone la estructura que se muestra en la figura 3.83.

Figura 3.83.- Quercetina-3-O- α -L-(2''-O-galoil)-arabinopiranosido

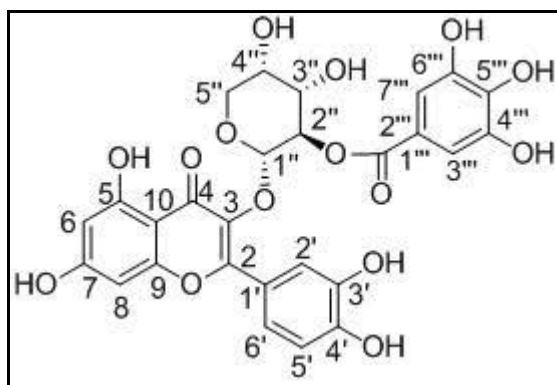


Tabla 3.39.- Asignación espectral para quercetina-3-O- α -L-(2''-O-galoi)-arabinopiranosido

Átomo	¹³ C	¹ H	<i>J</i>	HMBC
	δ ppm	δ ppm	Hz	
2	156,63			
3	133,59			
4 (C=O)	177,89			
5	165,113			
6	99,05	6,22 (1H; d)	2,1	5, 7, 8, 10
7	162,59			
8	94,17	6,42 (1H; d)	2,1	6, 7, 9, 10
9	157,65			
10	104,15			
1'	121,41			
2'	116,25	7,51 (1H, dd)	2,3; 7,4	2, 1', 3', 4'
3'	145,48			
4'	149,12			
5'	116,17	6,90 (1H; d)	8,4	3', 4', 6'
6'	121,48	7,56 (1H; d)	2,1	2', 4', 2
1''	99,16	5,60 (1H, d)	6,16	3, 2'', 3'', 5''
2''	72,10	5,32 (1H, s)		1'', 3'', 4'', 1'''
3''	70,20	3,76		2'', 4'', 5''
4''	69,02	3,51		2'', 3'', 5''
5''	66,40	3,62		2'', 3'', 4''
1'''(C=O)	165,53			
2'''	119,98			
3''' y 7'''	109,17	7,03		1''', 2''', (4''', y 6'''), (3''', y 7''')
4''' y 6'''	139,23			
5'''	145,99			

La presencia de quercetina como aglicón se evidencia por la comparación de las señales con el espectro de quercetina testigo. La presencia de arabinosa en su forma piranósica puede inferirse por la señal del C anomérico (99,16 ppm). Como puede observarse, la unión de arabinopiranososa en la posición 3 de quercetina se verifica en el HMBC por la conectividad existente entre el H-1, correspondiente al carbono anomérico (5,60 ppm) y el carbono 3 de quercetina (133,59 ppm). La configuración α se infiere por los valores de *J* de H-1/H-2. La presencia de ácido gálico se verifica por las señales coincidentes

con el testigo y la conexión con arabinopiranososa se evidencia en el HMBC por la conectividad entre el H-2 del azúcar (5,32 ppm) y el carbonilo del ácido (165,53 ppm).

Los resultados obtenidos coinciden con la bibliografía consultada (Iwagawa y col., 1990).

Figura 3.84.- Quercetina-3-O-β-D-xilósido

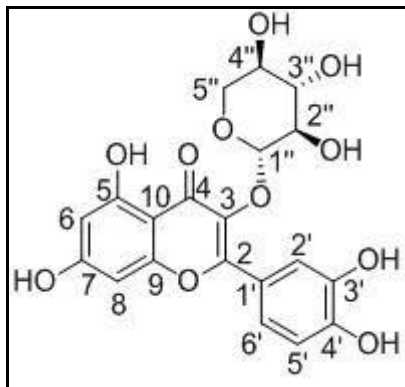


Tabla 3.40.- Asignación espectral para quercetina-3-O-β-D-xilósido

Átomo	¹³ C	¹ H	<i>J</i>
	δ ppm	δ ppm	
1''	102,20	5,35 (1H, d)	2,6
2''	74,01	3,32	
3''	76,43	3,20	
4''	70,07	3,31	
5''	66,41	2,97	

Figura 3.85.- Quercetina-3-O-β-D-glucósido

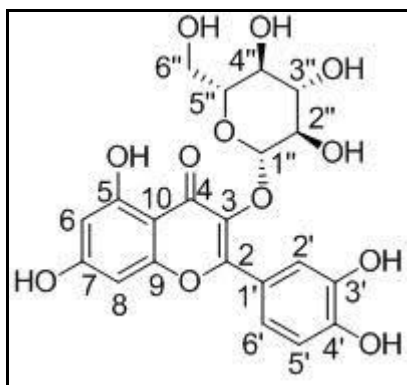


Tabla 3.41.- Asignación espectral para quercetina-3-O-β-D-glucósido

Átomo	¹³ C	¹ H	<i>J</i>
	δ ppm	δ ppm	Hz
1''	102,22	5,36 (1H, d)	7,3
2''	74,05	3,20	
3''	76,43	3,23	
4''	70,25	3,31	
5''	77,66	3,10	
6''	61,22	3,36	

En base a los resultados de las técnicas cromatográficas, la información obtenida del HPLC-masa en cuanto a los iones moleculares y los patrones de fragmentación, las hidrólisis y los datos espectroscópicos se verifica la presencia de catequina, quercetina-3-O-β-D-glucósido, quercetina-3-O-β-D-xilósido, quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosido, quercetina-3-O-α-L-arabinofuranósido y quercetina-3-O-α-L-ramnósido. Estos compuestos han sido previamente reportados en *Ligaria cuneifolia* (Wagner, 1993; Varela y col., 2001). A diferencia de lo reportado por Soberón y col. (2014), no se detectó rutina, quercetina-3-O-galactósido ni derivados glicosilados de camferol.

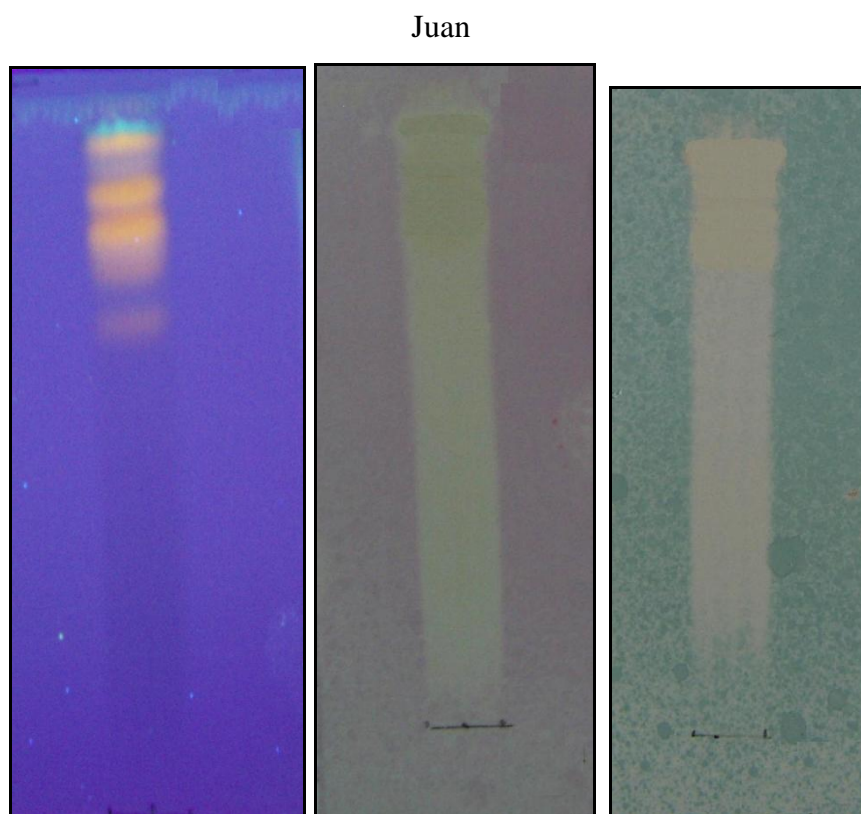
Los compuestos que se reportan por primera vez en *Ligaria cuneifolia* son glicósidos de quercetina unidos a ácido gálico. Tal es el caso de quercetina-3-O- α -L-(2''-O-galoil)-arabinopiranosido, quercetina-3-O- α -D-(2''-O-galoil)-arabinofuranosido, quercetina-3-O- α -L-(2''-O-galoil) ramnósido y quercetina-3-O- α -L-(3''-O-galoil) ramnósido.

3.5. Actividad antioxidante

3.5.1. Autografía por TLC

Se realizó una corrida en distintos sistemas de la fracción acetato de etilo obtenida a partir de extracciones sucesivas, con distintas proporciones de metanol, sobre las hojas de ejemplares provenientes de la provincia de San Juan. Posteriormente, se reveló con NP para visualizar los compuestos o con DPPH o ABTS para visualizar los que tienen capacidad antioxidante.

Figura 3.86.- Fracción acetato de etilo (hoja-“MeOH combinado”) proveniente de San



Izquierda: revelado con NP y visualización con UV a 366 nm.

Centro: revelado con DPPH

Derecha: revelado con ABTS

Fase estacionaria: sílica gel 60 F254

Fase móvil: acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26)

Detección: UV 254 y 366 nm.

Revelador: NP y visualización UV 366 nm; DPPH 1 mg/ml; ABTS

Los compuestos atrapadores de radicales libres se observan como manchas amarillas contra un fondo violeta, en el caso del DPPH y fondo verde, en el caso del ABTS. Esto es consistente con la reacción de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto con los reactivos reveladores. Es un método rápido y simple que permite estimar la capacidad antioxidante total de una mezcla de compuestos y de sus componentes individuales con buena sensibilidad (Lu y col. 2010; Zampini y col. 2010).

3.5.2. Métodos espectroscópicos

Se determina la capacidad antioxidante mediante los métodos de DPPH y ABTS en la fracción acetato de etilo proveniente de las muestras de San Juan, los extractos metanólicos de las muestras de Catamarca y la muestra comercial de San Juan. Para evaluar si existen diferencias significativas se aplica el test de comparaciones múltiples de Tuckey con un $p < 0,05$.

3.5.2.1 DPPH

Tabla 3.42.- DPPH en ejemplares de *L. cuneifolia*

Muestra				Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto) Promedio (n=5) \pm ESM	
San Juan	<i>Prosopis Geoffroea</i>	Material colectado	Hoja	MeOH combinado-AE	48,1 \pm 1,9
			Hoja	MeOH 100 %-AE	47,9 \pm 1,6
				MeOH 80 %-AE	46,7 \pm 1,7
				MeOH 50 %-AE	44,9 \pm 1,9
		Tallo	MeOH combinado-AE	40,2 \pm 2,0	
		Comercial	Hoja	MeOH 100 %	25,6 \pm 1,7
Catamarca	Material colectado	Planta entera	Retama		9,8 \pm 1,3
			Algarrobo	MeOH 100 %	23,8 \pm 1,8
			Chañar		33,0 \pm 1,8
			Olivo		31,6 \pm 2,2

*ESM: error estándar de la media. AE: acetato de etilo. MeOH combinado-AE: extracciones sucesivas sobre la misma muestra con MeOH 100 %, 80 % y 50 % y posterior partición con acetato de etilo.

Los valores más altos corresponden a la fracción “MeOH combinado-AE”. No existen diferencias significativas entre sí para las fracciones acetato de etilo de las hojas de los ejemplares provenientes de San Juan. La muestra comercial de San Juan presenta valores intermedios y similares a los obtenidos para las muestras de Catamarca. Entre las muestras de Catamarca no existen diferencias significativas, con la excepción de los ejemplares que crecen sobre “retama” cuyos valores son significativamente bajos.

Se aplica el test de Pearson a fin de evaluar los resultados obtenidos mediante el método de DPPH y su correlación con la determinación del contenido de polifenoles.

Tabla 3.43.- Coeficiente de correlación Pearson (*r*) entre ensayos

	Fenoles totales	Flavonoides totales	Taninos condensados	Ácidos hidroxicinámicos	Taninos totales
DPPH	0,8693	0,7416	0,8549	0,8359	0,8639

Existe una correlación entre los fenoles totales, los taninos condensados, los ácidos hidroxycinámicos y los taninos totales y es algo menor para el caso de los flavonoides totales. Esto último puede explicarse debido a que los flavonoides constituyen un grupo diverso cuya capacidad antioxidante varía ampliamente de acuerdo con las características estructurales de los mismos, por ejemplo, la glicosilación, la presencia de grupos galilo, entre otros (Yokozawa y col., 1998).

3.5.2.2. ABTS

Tabla 3.44.- ABTS en ejemplares de *Ligaria cuneifolia*

Muestra				Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol Trolox/ g}$ extracto) Promedio ($n = 5$) \pm ESM	
San Juan	<i>Prosopis Geoffroea</i>	Material colectado	Hoja	MeOH combinado-AE	16279 \pm 355
				MeOH 100 %-AE	14508 \pm 423
			MeOH 80 %-AE	14648 \pm 732	
			MeOH 50 %-AE	15072 \pm 539	
			Tallo	MeOH combinado-AE	11963 \pm 1141
		<i>Prosopis Geoffroea</i>	Comercial	Hoja	MeOH 100 %
Catamarca	Retama				7229 \pm 459
	Algarrobo	Material colectado	Planta entera	MeOH 100 %	8321 \pm 307
	Chañar				11354 \pm 500
	Olivo				9554 \pm 439

*ESM: error estándar de la media. AE: acetato de etilo. MeOH combinado-AE: extracciones sucesivas sobre la misma muestra con MeOH 100 %, 80 % y 50 % y posterior partición con acetato de etilo

Los valores más altos corresponden a la fracción acetato de etilo obtenida a partir de extracciones sucesivas sobre hoja con distintas proporciones de metanol, mientras que

el tallo presenta los valores más bajos. Entre las muestras de Catamarca, los ejemplares que crecen sobre retama presentan los valores más bajos mientras que la muestra que crece sobre “chañar” presenta los valores más altos del grupo y similares al tallo en la fracción acetato de etilo. La muestra comercial de San Juan también presenta valores intermedios entre los dos grupos y similar a los resultados obtenidos para los ejemplares que crecen sobre “chañar”.

Se aplicó el test de Pearson a fin de evaluar los resultados obtenidos mediante el método de ABTS.

Se estudió la correlación entre el contenido de fenoles totales, flavonoides totales, proantocianidinas y taninos totales con los valores obtenidos de ABTS.

Tabla 3.45.- Coeficiente de correlación Pearson (*r*) entre ensayos

	Fenoles totales	Flavonoides totales	Taninos condensados	Ácidos hidroxicinámicos	Taninos totales
ABTS	0,9111	0,7893	0,8064	0,8449	0,8144

Mediante la aplicación del test de Pearson se determina que existe una correlación significativa para cada uno de ellos. La mejor correlación se observa para el ensayo de fenoles totales.

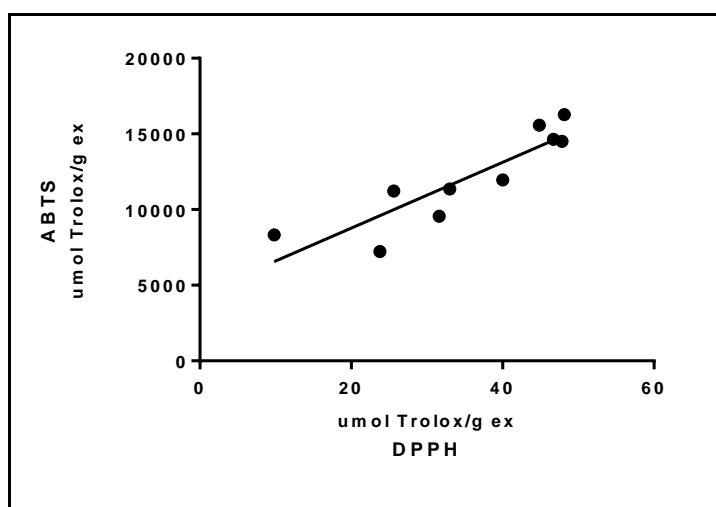
Tanto para ABTS como para DPPH, la mejor correlación se observa con el contenido de fenoles totales y la más baja, con los flavonoides totales. A su vez, los valores más altos de capacidad antioxidante para ambos métodos corresponden a la fracción acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan, lo cual se correlaciona con los resultados del contenido de polifenoles. En cuanto a las muestras de Catamarca, los ejemplares que crecen sobre “chañar” presentan los valores más altos de capacidad antioxidante por ABTS y DPPH y también en cuanto a fenoles totales, taninos condensados y totales. Los ejemplares que crecen sobre “retama” registran los valores más bajos de capacidad antioxidante para ambos métodos, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos para taninos condensados y totales.

A su vez, se observa una correlación significativa entre los métodos de ABTS y DPPH

Tabla 3.46.- Coeficiente de correlación Pearson (r) entre ABTS y DPPH

	ABTS
DPPH	0,8872

Figura 3.87.- Correlación entre los ensayos de ABTS y DPPH



3.5.3. Electroforesis capilar

Se utiliza la metodología analítica desarrollada para el análisis de los extractos. La determinación de la capacidad antioxidante se realiza sobre la base de los trabajos de Helmja y col. (2007, 2008 y 2009). Se estudian distintas variables a fin de optimizar y adaptar la metodología a las muestras en estudio. En todos los casos, las determinaciones se efectúan por triplicado.

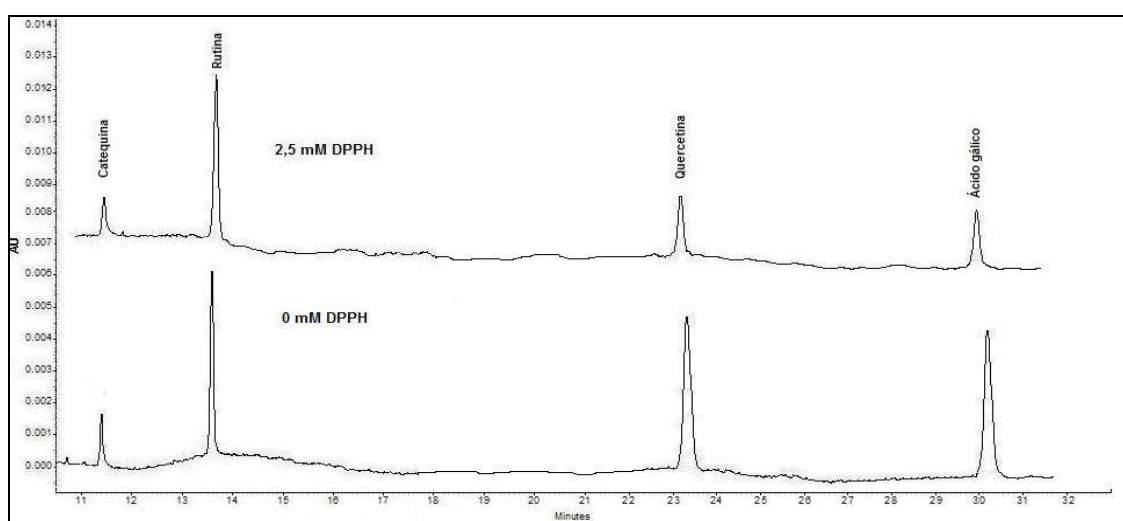
Para probar el método, se trabaja inicialmente con una mezcla de testigos (catequina, rutina, quercetina y ácido gálico) en concentración 1 mg/ml y se prueba la reacción con DPPH en concentración 2,5 mM. Los resultados se muestran en la tabla 3.47.

Tabla 3.47.- Determinación del porcentaje de no oxidado frente a 2,5 mM DPPH

Compuesto	Porcentaje no oxidado
Catequina	42,5
Rutina	51,9
Quercetina	15,7
Ácido gálico	16,6

Los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con la bibliografía en cuanto a que la quercetina exhibe el mayor poder antioxidante por sus características estructurales, seguida del ácido gálico (Rice-Evans y col., 1996, Yokozawa y col., 1998) Se acepta que la glicosilación disminuye la capacidad antioxidante, por lo cual la rutina registra un mayor porcentaje de no oxidación. La catequina constituye la unidad monomérica de los taninos condensados y exhibe un valor intermedio. Si bien la quercetina tiene un número idéntico de grupos hidroxilo y en la misma posición que la catequina, también contiene el doble enlace 2,3 en el anillo C y la función 4-oxo, lo cual le confiere un mayor poder antioxidante (Rice-Evans y col., 1996).

Figura 3.88.- Mezcla de testigos (0,1 mg/ml) frente a 2,5 mM DPPH



Se trabajó con la fracción “MeOH combinado-AE” de la hoja, proveniente de las muestras colectadas en San Juan para optimizar la metodología.

Las condiciones evaluadas se detallan en la tabla 3.48.

Tabla 3.48.- Variables estudiadas para la optimización del método

Concentración extracto (mg/ml)	Concentración DPPH (mM)
1,0; 2,5; 5,0 y 10,0	0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 y 10,00

Condición 1

Se trabajó con una concentración fija de DPPH (0,50 mM) y concentraciones variables del extracto (1,0 - 10,0 mg/ml)

El porcentaje no oxidado para cada compuesto se determina como la relación entre el área del pico correspondiente a la muestra intacta y la tratada con 0,50 mM de DPPH.

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 3.49.

Tabla 3.49.- Determinación del porcentaje no oxidado de cada compuesto a distintas concentraciones del extracto y concentración fija de DPPH (0,50 mM)

Compuesto	Porcentaje no oxidado			
	10,0 mg/ml	5,0 mg/ml	2,5 mg/ml	1,0 mg/ml
Catequina	80,8	48,9	31,9	ND
X1	76,1	38,7	12,0	ND
X2	79,2	36,0	13,0	ND
X3	61,1	40,0	12,5	ND
Q-3-O-glucósido	79,7	51,8	43,4	10,1
Q-3-O-xilósido	70,7	53,3	20,6	ND
Q-3-O-ramnósido	71,3	62,5	46,4	15,2
Q-3-O-a-furanósido	70,9	56,4	43,7	12,1
Q-3-O-a-piranósido	71,0	48,8	36,9	ND
X4	66,9	25,8	10,0	ND
QGG-1	52,9	35,6	17,0	ND
QGG-2	54,1	39,1	15,9	ND
X5	82,5	60,0	32,0	ND
QGG-3	52,0	42,4	22,5	ND

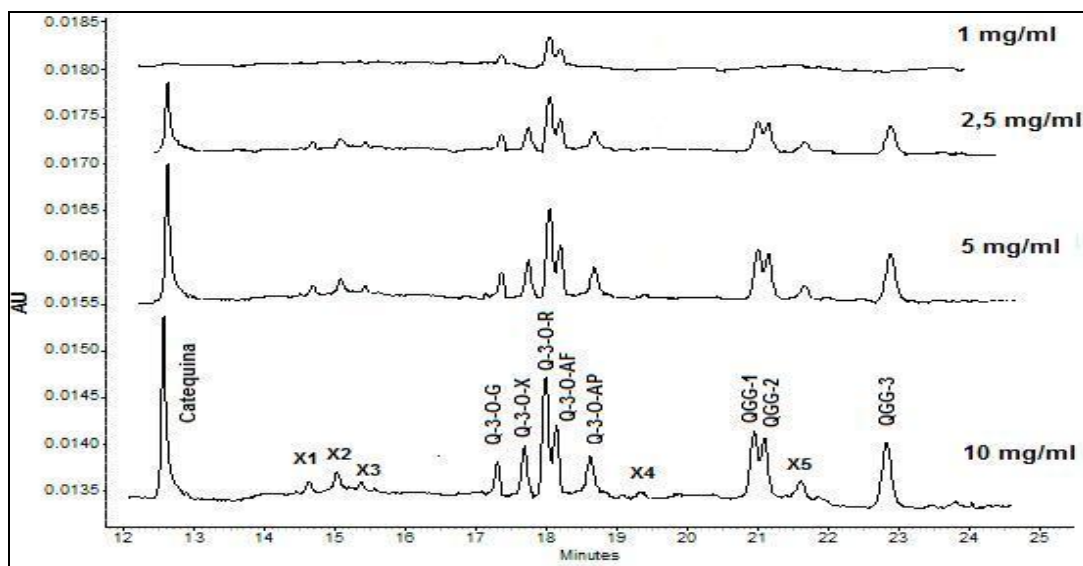
X: compuestos desconocidos menores; QGG: quercetina galoil glicósidos.

Como puede observarse, con una concentración de extracto de 1,0 mg/ml prácticamente todos los compuestos son oxidados. Con concentraciones superiores es posible observar el distinto comportamiento de los compuestos. En general, se observa que los galoil glicósidos de quercetina se oxidan más que sus contrapartes no galoiladas. Esto es congruente con el hecho de que la glicosilación disminuye la capacidad antioxidante en comparación con la aglicona (quercetina) mientras que la presencia de ácido gálico en la molécula, incrementa su potencial antioxidante (Peng y col., 2003). Una posible explicación atribuye a la glicosilación una reducción en el número de grupos hidroxilo libres o una disrupción de la estructura *orto*-difenólica.

Por otra parte, la unión del azúcar puede dificultar el acceso de la molécula atrapadora de radicales libres al centro radicalario del DPPH (Yokozawa y col., 1998).

A continuación, se presentan los electroferogramas obtenidos para las distintas concentraciones de la fracción acetato de etilo (hoja “MeOH combinado-AE”) frente a una concentración fija de DPPH (0,50 mM). Se indican los nombres de los compuestos ya identificados (Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-R: quercetina-3-O-ramnósido; Q-3-O-AF: quercetina 3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido). También se nombran los compuestos que han sido preliminarmente identificados como galoil glicósidos de quercetina. Existen compuestos minoritarios desconocidos (denominados con la letra x).

Figura 3.89.- Fracción “MeOH combinado-AE” de las hoja, proveniente de ejemplares colectados en San Juan en distintas concentraciones frente a concentración fija de DPPH



Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-R: quercetina-3-O-ramnósido; Q-3-O-AF: quercetina 3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido. QGG: galoil glicósidos de quercetina.

Condición 2

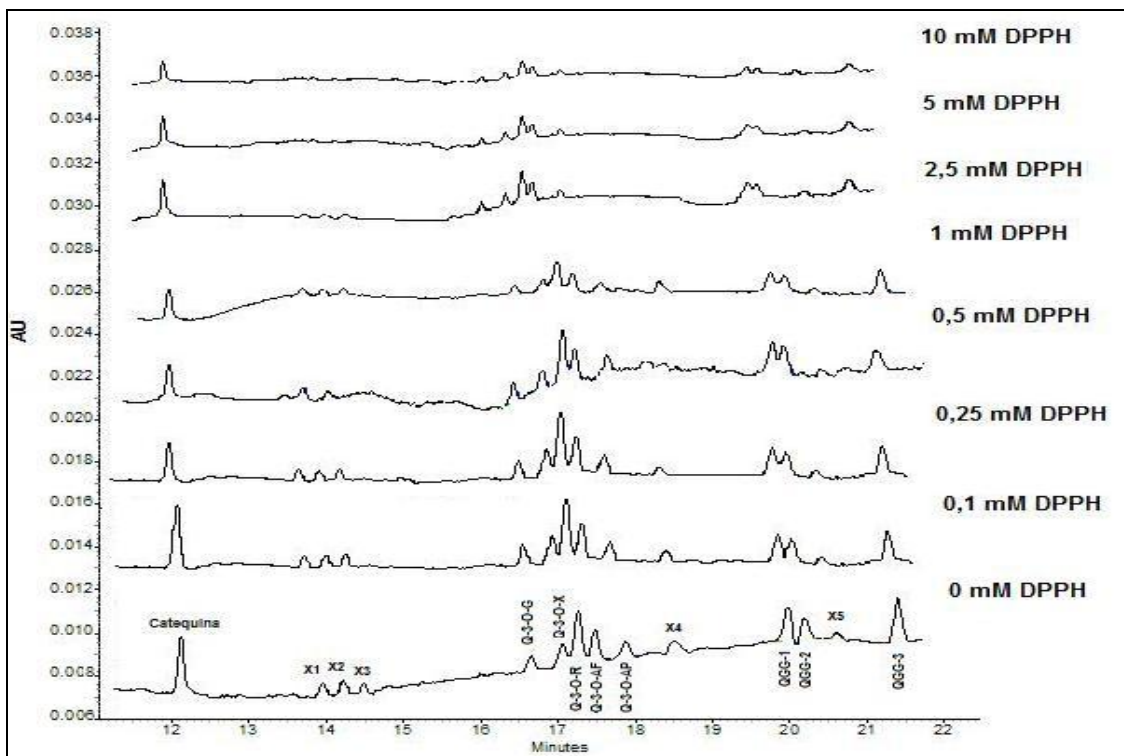
Se trabajó con una concentración fija del extracto (10,0 mg/ml) y concentraciones variables de DPPH (0,10 – 10,00 mM)

Tabla 3.50.- Determinación del porcentaje no oxidado de cada compuesto a concentración fija del extracto (10,0 mg/ml) y concentración creciente de DPPH (0,10 mM – 10,00 mM)

Compuesto	Porcentaje no oxidado						
	0,10 mM	0,25 mM	0,50 mM	1,00 mM	2,50 mM	5,00 mM	10,00 mM
Catequina	89,0	84,9	80,8	66,7	41,9	34,7	18,5
X1	90,0	85,3	76,1	72,5	64,6	55,8	2,5
X2	89,2	84,0	79,2	41,1	42,5	7,7	4,1
X3	88,3	80,0	61,1	54,5	43,8	24,9	2,2
Q-3-O-G	83,2	74,0	79,7	41,9	36,0	22,3	12,4
Q-3-O-X	86,1	74,6	70,7	40,5	30,2	10,4	8,9
Q-3-O-R	85,2	79,7	71,3	55,2	37,7	24,7	18,2
Q-3-O-a-f	87,1	73,3	70,9	53,8	42,2	27,6	19,6
Q-3-O-a-p	93,4	84,8	71,0	46,5	37,4	28,2	10,4
X4	90,1	83,2	66,9	55,8	42,1	27,3	9,1
QGG-1	89,3	76,8	52,9	30,5	22,2	12,9	3,1
QGG-2	86,7	95,9	54,1	28,1	17,3	10,5	2,7
X5	93,7	86,1	82,5	78,5	46,3	21,3	1,1
QGG-3	94,1	87,3	52,0	46,7	37,6	20,7	5,5

X: compuestos desconocidos menores; QGG: quercetina galoil glicósidos.

Figura 3.90.- Fracción “MeOH combinado-AE” de las hojas, proveniente de San Juan en concentración 10,0 mg/ml frente a concentración variable de DPPH



Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-R: quercetina-3-O-ramnósido; Q-3-O-AF: quercetina 3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido. QGG: galoil glicósidos de quercetina.

Puede observarse que al igual que en la condición 1, los compuestos con ácido gálico exhiben mayor capacidad antioxidante que sus contrapartes glicosiladas.

Estudio comparativo

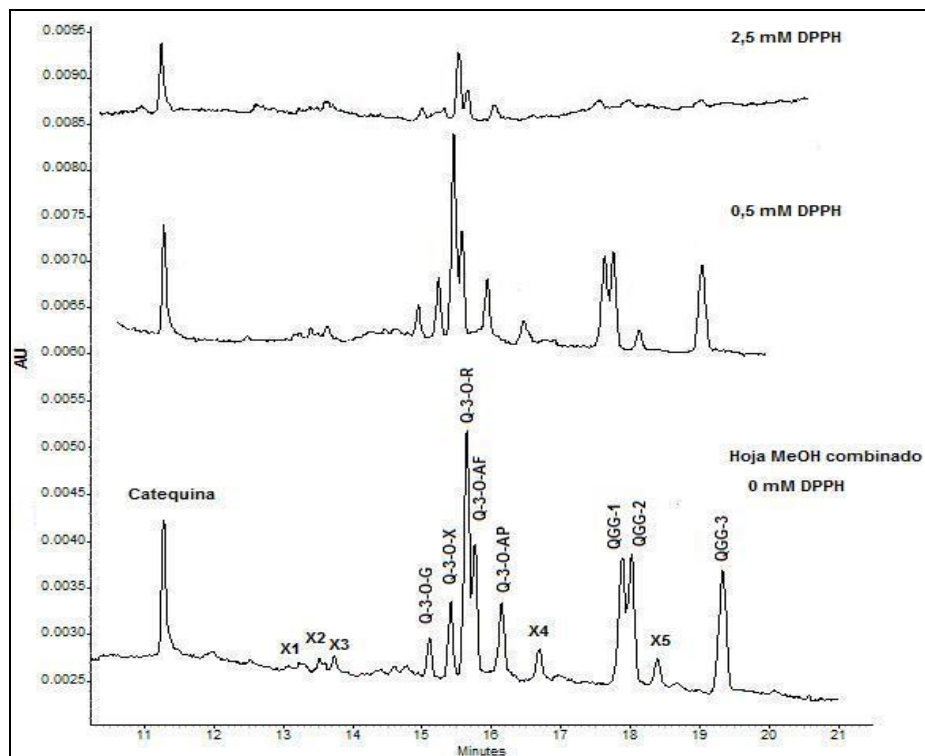
Se trabajó con las fracciones de acetato de etilo de las hojas y los tallos de los ejemplares colectados en San Juan. Las fracciones fueron obtenidas a partir de extracciones con distintas proporciones de metanol. Además, se trabajó con extractos metanólicos provenientes de Catamarca y con la muestra comercial de San Juan. Se utilizó una concentración fija de extracto (10,0 mg/ml) y dos concentraciones de DPPH (0,50 mM y 2,50 mM). Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Tabla 3.51.- Determinación del porcentaje no oxidado de cada compuesto en la muestra proveniente de San Juan, a una concentración fija de extracto (10,0 mg/ml) y dos concentraciones de DPPH (0,50 mM y 2,50 mM)

Compuesto	Porcentaje no oxidado									
	Hoja MeOH combinado		Hoja MeOH 100%		Hoja MeOH 80%		Hoja MeOH 50%		Tallo	
	0,50 mM	2,50 mM	0,50 mM	2,50 mM	0,50 mM	2,50 mM	0,50 mM	2,50 mM	0,50 mM	2,50 mM
Catequina	80,8	41,9	83,3	35,3	86,5	37,2	85,1	44,1	84,7	43,3
X1	76,1	64,6	74,8	61,2	81,5	63,2	80,9	60,7	82,9	60,8
X2	79,2	42,5	73,9	51,3	80,9	48,5	83,4	50,2	81,3	49,7
X3	61,1	43,8	78,7	45,9	79,5	46,4	79,3	42,5	77,9	41,7
Q-3-O-G	79,7	36,0	80,6	39,4	83,7	41,3	79,2	40,9	82,3	39,8
Q-3-O-X	74,3	38,2	73,8	38,7	83,4	35,6	74,8	37,2	77,7	40,2
Q-3-O-R	74,7	37,7	77,6	41,2	82,1	38,3	78,3	42,5	77,9	41,7
Q-3-O-a-f	75,6	42,2	75,7	44,0	80,1	47,8	80,9	46,5	78,7	44,2
Q-3-O-a-p	74,8	37,4	76,6	40,3	76,2	39,5	79,6	43,2	81,6	41,8
X4	66,9	42,1	82,7	44,4	72,5	40,9	67,1	41,6	78,3	43,5
QGG-1	52,9	22,2	59,3	25,3	59,4	27,3	57,8	26,3	59,8	28,4
QGG-2	54,1	17,3	50,5	20,5	56,3	21,9	52,4	23,8	58,9	24,8
X5	82,5	46,3	69,6	47,2	70,2	48,4	56,3	44,2	74,3	45,7
QGG-3	52,0	17,6	56,4	20,3	59,7	20,3	59,3	22,9	55,2	21,8

Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-R: quercetina-3-O-ramnósido; Q-3-O-AF: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido. QGG: galoil glicósidos de quercetina.

Figura 3.91.- Fracción “MeOH combinado-AE” de las hojas, proveniente de San Juan, en concentración 10,0 mg/ml frente a dos concentración de DPPH (0,50 y 2,50 mM).

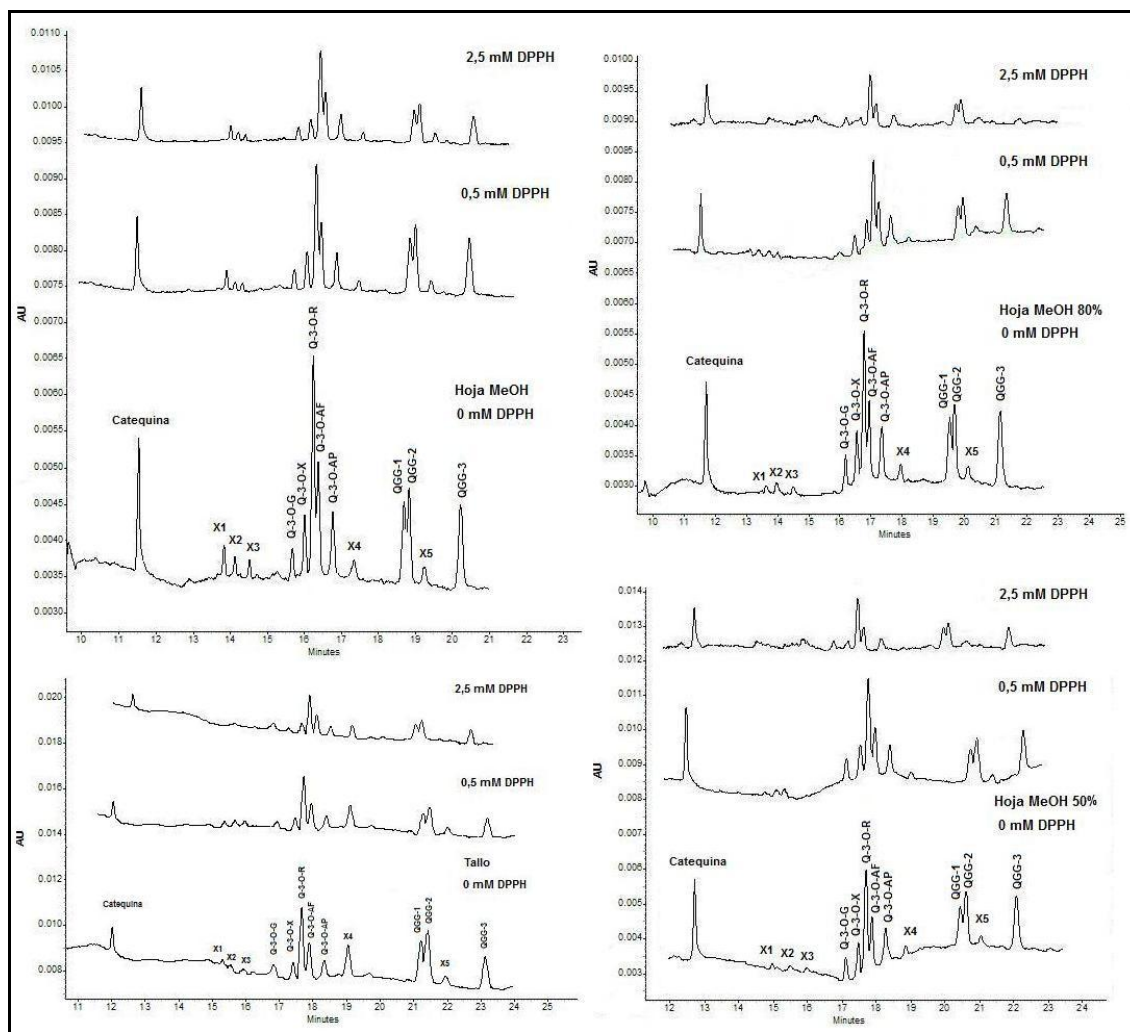


Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-R: quercetina-3-O-ramnósido; Q-3-O-AF: quercetina 3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido. QGG: galoil glicósidos de quercetina. X1, X2, X3, X4 y X5: compuestos minoritarios desconocidos.

Puede observarse que los derivados de glicósidos de quercetina unidos a gálico exhiben mayor capacidad antioxidante que sus contrapartes. La catequina tiene un comportamiento intermedio. Los valores obtenidos son semejantes entre las fracciones acetato de etilo de las hojas y los tallos obtenidas a partir de distintas proporciones de metanol.

En la figura 3.92 se observa la comparación entre las fracciones acetato de etilo. Los perfiles son similares.

Figura 3.92.- Análisis comparativo de las fracciones acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan en concentración 10,0 mg/ml frente a dos concentraciones de DPPH (0,50 y 2,50 mM).



De izquierda a derecha: Hoja MeOH; Hoja MeOH 80 %; Tallo; Hoja MeOH 50%.

Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-R: quercetina-3-O-ramnósido; Q-3-O-AF: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido. GGG: galoil glicósidos de quercetina. X1, X2, X3, X4 y X5: compuestos minoritarios desconocidos.

En las muestras correspondientes a Catamarca y la muestra comercial de San Juan, los compuestos han sido preliminarmente identificados de acuerdo con la coincidencia con testigos en tiempos de migración y espectros.

En el caso de los extractos metanólicos, se trabaja con una concentración de 20,0 mg/ml.

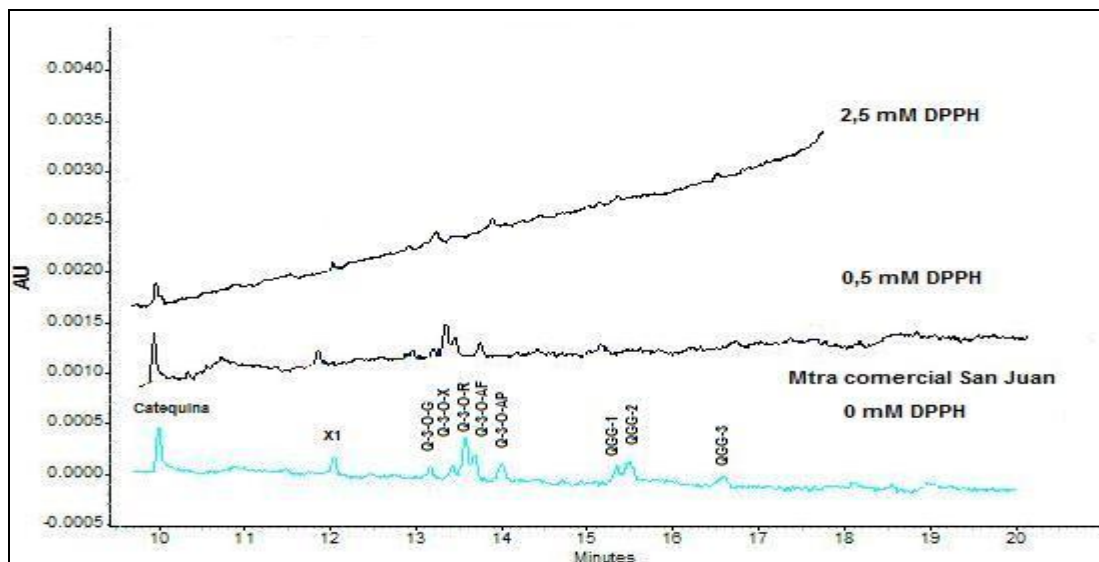
Tabla 3.52.- Determinación del porcentaje no oxidado de cada compuesto en las muestras provenientes de Catamarca y la muestra comercial de San Juan, a una concentración fija de extracto (20,0 mg/ml) y dos concentraciones de DPPH (0,50 mM y 2,50 mM)

Compuesto	Porcentaje no oxidado									
	San Juan		Chañar		Algarrobo		Olivo		Retama	
	0,50 mM	2,50 mM	0,50 mM	2,50 mM	0,50 mM	2,50 mM	0,50 mM	2,50 mM	0,50 mM	2,50 mM
Catequina	91,7	36,4	85,3	43,5	69,3	42,2	82,5	39,2	74,8	ND
X1	89,1	18,4	81,7	73,5	52,2	43,5	60,2	22,9	---	---
X2	---	----	62,4	25,2	77,3	57,5	72,7	19,2	---	---
X3	---	---	---	----	71,1	61,3	32,3	5,1	---	---
Q-3-O-G	73,6	43,2	75,6	46,6	63,0	43,9	67,4	28,9	57,6	ND
Q-3-O-X	62,5	40,1	63,9	31,8	69,6	38,2	73,2	34,8	42,9	ND
Q-3-O-R	81,5	38,2	73,6	43,7	70,2	48,0	65,7	30,8	55,2	ND
Q-3-O-a-f	79,9	39,0	67,8	39,1	72,0	21,8	71,7	28,3	50,3	ND
Q-3-O-a-p	77,8	38,9	72,9	38,7	64,4	44,9	65,5	13,9	53,6	ND
X4	---		69,1	12,3	---	----	---	---	---	---
QGG-1	58,5	15,0	56,2	16,6	57,7	15,9	63,9	18,3	12,3	ND
QGG-2	53,5	16,3	58,5	25,0	57,9	12,7	61,1	22,2	10,3	ND
X5	---	----	60,1	15,4	---	---	---	---	---	---
QGG-3	59,7	21,2	60,1	22,2	61,1	11,0	61,7	25,0	14,7	ND

Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-R: quercetina-3-O-ramnósido; Q-3-O-AF: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido. QGG: galoil glicósidos de quercetina. X1, X2, X3, X4 y X5: compuestos minoritarios desconocidos.

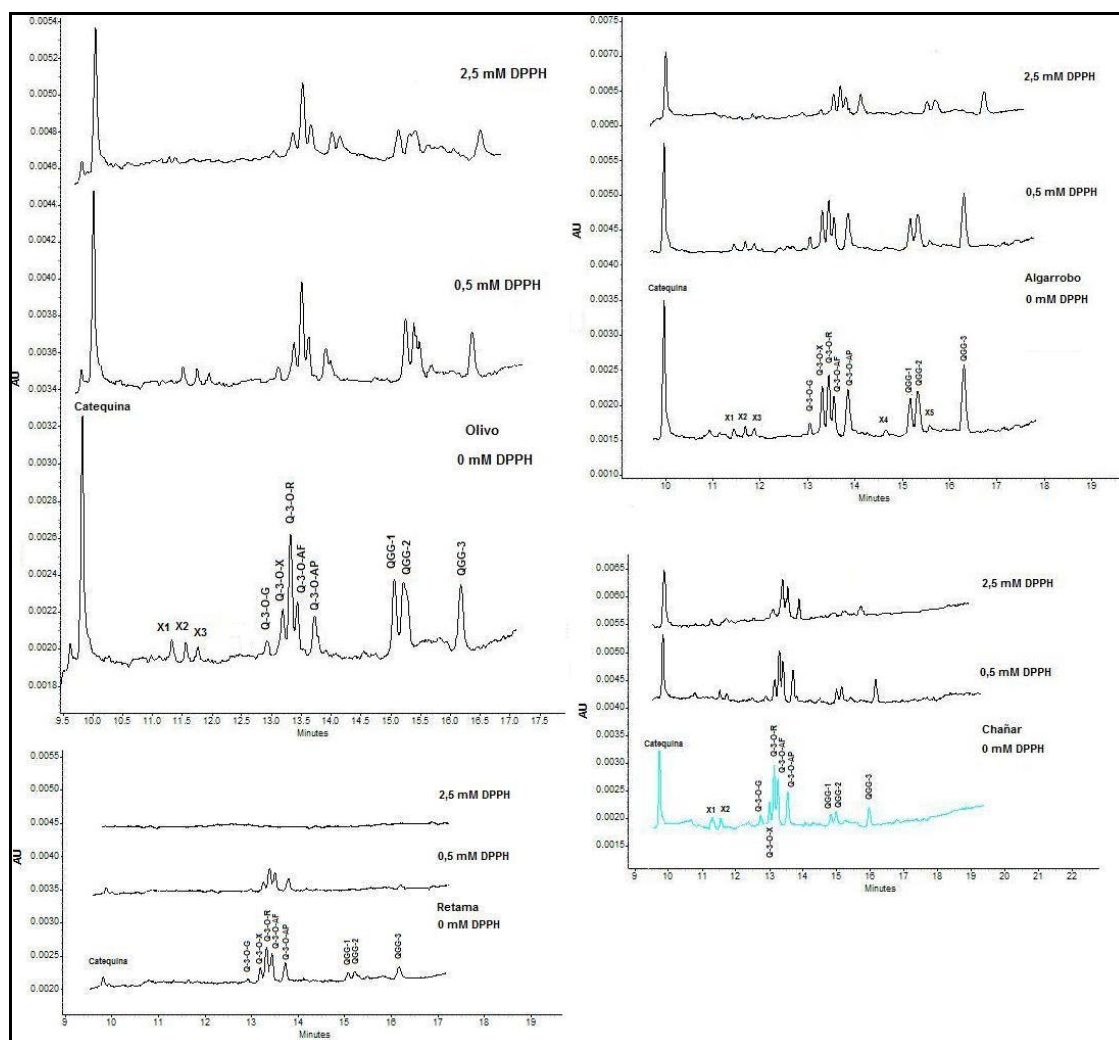
Los electroferogramas de los ejemplares provenientes de Catamarca que crecen sobre diferentes hospedantes y la muestra comercial de San Juan se presentan a continuación.

Figura 3.93.- Extracto metanólico de la muestra comercial de San Juan en concentración 20,0 mg/ml frente a dos concentraciones de DPPH (0,50 y 2,50 mM)



Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-R: quercetina-3-O-ramnósido; Q-3-O-AF: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranósido. QGG: galoil glicósidos de quercetina. X1: compuestos minoritarios desconocidos.

Figura 3.94.- Extractos metanólicos de las muestras provenientes de Catamarca, en concentración 20,0 mg/ml frente a dos concentraciones de DPPH (0,50 y 2,50 mM) sobre distintos hospedantes.



De izquierda a derecha: “olivo”, “algarrobo”, “retama”, “chañar”.

Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-R: quercetina-3-O-ramnósido; Q-3-O-AF: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranósido. QGG: galoil glicósidos de quercetina. X1, X2, X3, X4, X5: compuestos minoritarios desconocidos.

Se observa que los compuestos glicosilados tienen proporcionalmente, menor poder antioxidante que aquellos que contienen ácido gálico en su estructura (Peng y col., 2003). La catequina presenta un comportamiento relativamente similar a los de los glicósidos. A su vez, entre los glicósidos, no se observan diferencias significativas.

3.5.4. Ensayos *ex vivo*

Se trabajó sobre la fracción acetato de etilo de las hojas provenientes de ejemplares colectados en San Juan. Las fracciones se obtuvieron a partir de extracciones sucesivas con metanol y metanol-agua, en distintas proporciones.

3.5.4.1. Homogeneizados de tejido

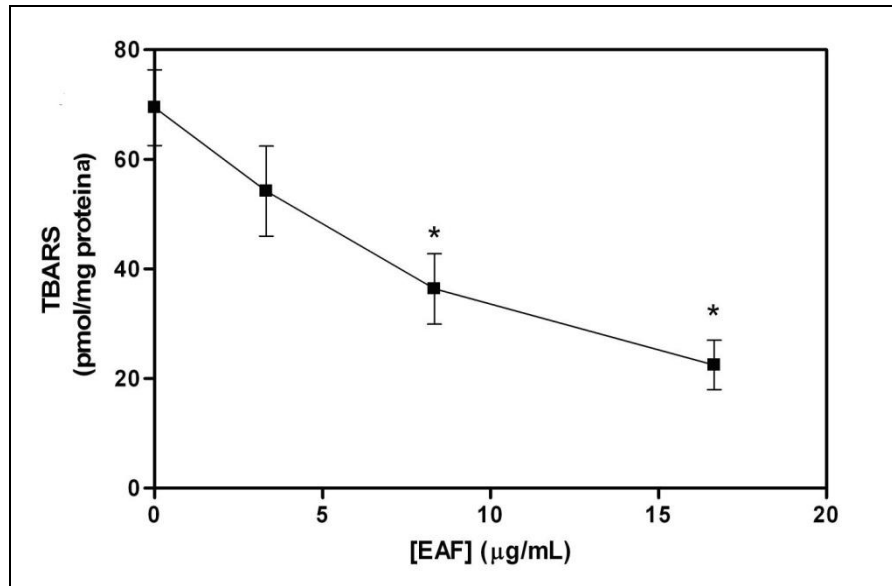
Se realizan dos ensayos para estudiar la capacidad antioxidante de la fracción acetato de etilo (EAF) como inhibidor de la peroxidación lipídica: a) niveles de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) inducidos por ter-butil-hidroperóxido en homogeneizados de hígado de rata y b) QL (quimioluminiscencia) emitida debido a la auto-oxidación de homogeneizados de cerebro de rata. El ensayo de TBARS es una medida indirecta del daño oxidativo a los lípidos y puede ser empleado para determinar el grado de peroxidación lipídica que sufre un tejido (Fraga y col., 1998). La QL debida a la auto-oxidación es un indicador útil de la extensión de los procesos de peroxidación lipídica (Boveris y col., 1980).

En el ensayo de inhibición de la producción de TBARS, las muestras de tejido fueron incubadas con ter-butil-hidroperóxido (3 mM) y concentraciones crecientes de EAF por 60 minutos a 37 °C. Luego del período de incubación, los TBARS fueron extraídos con n-butanol y determinados por fluorescencia.

La emisión de QL en las muestras de cerebro es medida en un contador de centelleo líquido luego de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, con concentraciones crecientes de EAF.

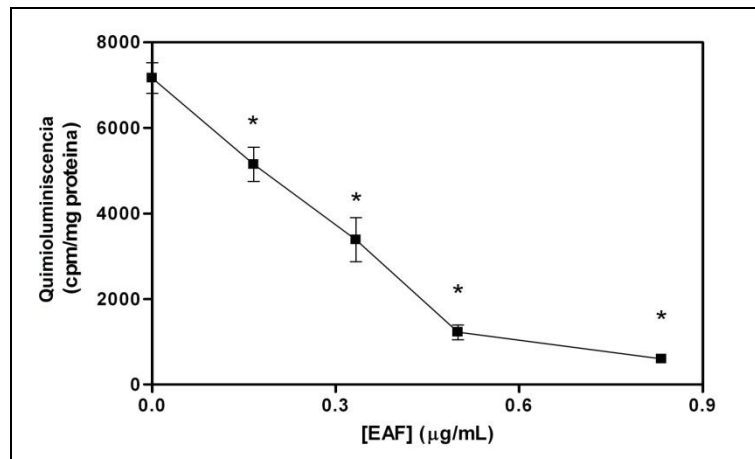
La inhibición de la producción de TBARS en homogeneizados de hígado de rata y de la auto-oxidación de homogeneizados de cerebro de rata muestra valores de IC₅₀ de 14,5 y 0,27 /mL de EAF, respectivamente (Figuras 3.95 y 3.96). Ambos valores son relativamente bajos e indican que la EAF es un eficiente antioxidante si se compara con compuestos polifenólicos puros analizados en similares condiciones (Rufier y col., 2006). La diferencia entre ambos valores de IC₅₀ puede deberse a la alta sensibilidad del método de QL (Lissi y col., 1986).

Figura 3.95.- Inhibición de la oxidación fosfolipídica en homogeneizados de hígado de rata por la fracción acetato de etilo (EAF)



* $p < 0,05$ vs. 0 µg/mL de EAF

Figura 3.96.- Inhibición de la auto-oxidación en homogeneizado de cerebro de rata por la fracción acetato de etilo (EAF)



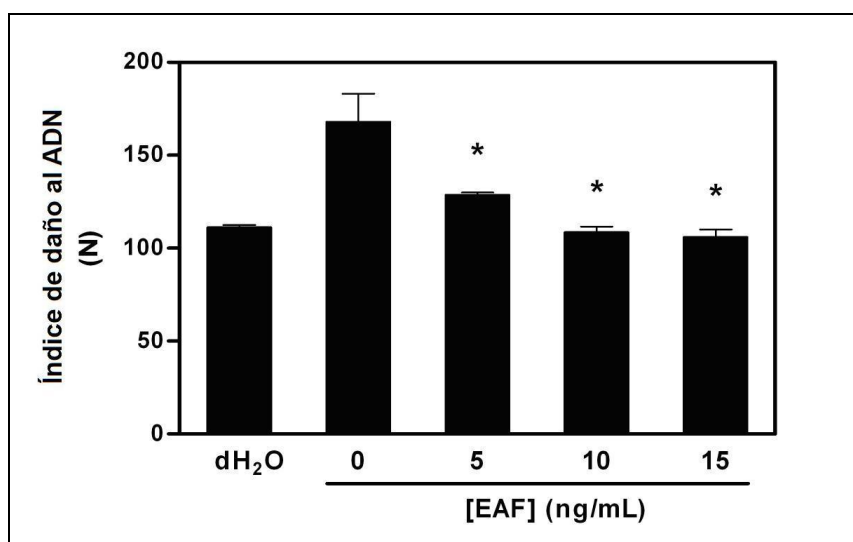
* $p < 0.001$ vs. 0 µg/mL of EAF

Se observa que la EAF es capaz de inhibir la producción de TBARS iniciada por ter-butyl-hidroperóxido y la QL debida a la auto-oxidación.

3.5.4.2. Inhibición de daño al ADN inducido por H₂O₂

El ensayo del cometa es utilizado para evaluar la capacidad de la fracción EAF de inhibir el daño al ADN. Se emplea H₂O₂ como inductor del daño oxidativo al ADN. Cuando éste se incubaba con las células se observa un aumento en la longitud del cometa que disminuye cuando se realiza el tratamiento previo con EAF. Las células sanguíneas mononucleares son incubadas durante 3 horas a 37 °C con concentraciones crecientes de EAF. Luego, las muestras son incubadas con H₂O₂ (50 µM) durante 30 minutos a 4 °C a fin de inducir el daño oxidativo al ADN. Se usa agua destilada (dH₂O) como control negativo. Como se muestra en la figura 3.97, la incubación con la EAF disminuye significativamente el largo de la cola del cometa en cada concentración ensayada, en comparación con el control positivo (0 ng/mL EAF).

Figura 3.97.- Inhibición del daño al ADN inducido por H₂O₂ por la fracción acetato de etilo (EAF), evaluada por el ensayo del cometa



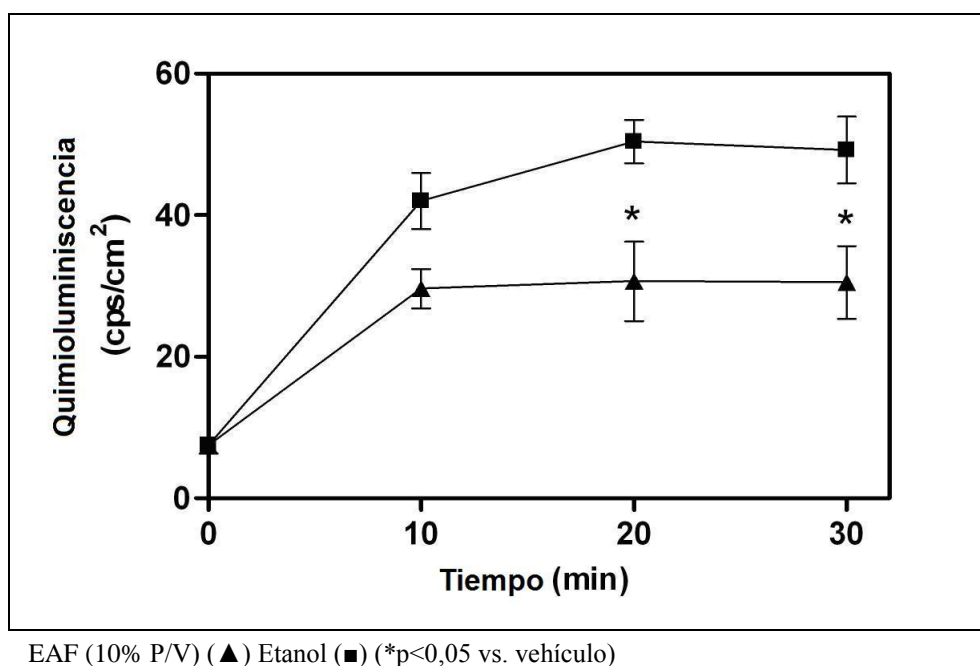
*p<0,005 vs. 0 ng/mL de EAF

3.5.5. Inhibición de la QL *in vivo* en piel

Se acepta que la luz UVA (320 - 380 nm) ha estado involucrada en muchas de las consecuencias de la exposición de los animales a la luz, incluyendo la carcinogénesis y el envejecimiento (Ichihashi y col., 2003). Las especies reactivas del oxígeno y el estrés oxidativo causados por UVA han sido reconocidos como participantes en estas condiciones patológicas en la piel (Sander y col., 2004). En reportes previos, la QL *in vivo* en tiempo real ha sido utilizada para analizar el estrés oxidativo producido en la piel por la exposición a la radiación UVA (Evelson y col., 1997; Yasui y col., 2006).

Incrementos en la QL *in vivo* reflejan un incremento de la concentración intracelular en estado estacionario de especies excitadas del oxígeno y la ocurrencia del estrés oxidativo (Boveris y col., 1980). Las mediciones de QL *in vivo* son no invasivas, no destructivas y órgano específicas y, en consecuencia, son adecuadas para evaluar el efecto de aplicaciones tópicas de antioxidantes y agentes fotoprotectores. Como se ha hecho previamente con α -tocoferol y β -caroteno (Evelson y col., 1997), la EAF se evaluó en este modelo para establecer el rol como antioxidante *in vivo*. La superficie dorsal de los ratones fueron irradiadas con UVA por 30 minutos (dosis total: 7,5 J/m²). El efecto de la aplicación tópica con EAF (10 % P/V) sobre la QL *in vivo* se determinó usando etanol como vehículo. Controles apropiados con el vehículo no mostraron efectos del solvente sobre la QL de la piel del ratón, con o sin irradiación.

Figura 3.98.- Inhibición *in vivo* de la QL en la piel irradiada con UVA por la fracción acetato de etilo (EAF) de *Ligaria cuneifolia*



Como se muestra en la figura 3.98, la aplicación tópica con la EAF (10 % P/V) produjo un decremento del 38 % en la QL en la piel luego de 30 minutos de irradiación con UVA, lo cual indica que la EAF de *L. cuneifolia* no sólo es eficiente en condiciones *in vitro* y *ex vivo*, sino que también puede aliviar el estrés oxidativo *in vivo* producido por la exposición a UVA. Efectos similares se habían logrado con antioxidantes probados tales como el α -tocoferol y β -caroteno (Evelson y col., 1997).

4. DISCUSIÓN FINAL

4.1 Aspectos generales

El creciente desarrollo de la medicina tradicional y consecuentemente, del uso de las drogas vegetales, incrementa la preocupación acerca de la calidad y seguridad de dichos productos. Es por ello que la Organización Mundial de la Salud y otras agencias regulatorias tales como la Agencia de drogas y alimentos de los Estados Unidos (FDA: *Food and drug administration*) y la agencia europea de medicamentos (EMA: *European Medicines Agency*) iniciaron programas con el fin de establecer parámetros que permitan confeccionar guías para el control de calidad. El control de calidad de los productos naturales es de extrema importancia ya que la efectividad de las drogas vegetales depende de la concentración de ciertos componentes activos que ellos contienen. Sin embargo, la concentración de los principios activos se ve afectada por numerosos factores, tales como, el clima, las condiciones de cultivo, la época de recolección, el secado, el almacenamiento, entre otros. Debido a ello, las concentraciones pueden variar y de esta manera, la efectividad del producto.

Actualmente, el control de calidad y la seguridad de las drogas vegetales y las medicinas tradicionales están basados en estándares de calidad establecidos en las correspondientes monografías publicadas por los organismos regulatorios, por ejemplo, la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), Farmacopea de Estados Unidos (USP) y frente a las cuales el producto debe cumplir. La identificación y el control de calidad se establecen mediante el análisis macro y microscópico y el uso de compuestos marcadores. Sin embargo, el uso de marcadores puede no ser siempre adecuado debido a la falta de compuestos químicos únicos y a los efectos sinérgicos entre sus componentes. Para superar estos inconvenientes, la OMS aceptó el uso del *fingerprint* como metodología para la evaluación de los productos naturales. El *fingerprint* puede definirse como un perfil característico que refleja la compleja composición química de la muestra analizada y que puede obtenerse por la combinación de técnicas espectroscópicas, cromatográficas y electroforéticas. Mientras que las técnicas espectroscópicas se realizan sobre la muestra entera, las técnicas cromatográficas y electroforéticas son más informativas.

Un gran desafío se plantea en aquellos casos donde no existe una monografía para la droga vegetal y en consecuencia, deben establecerse pautas para un efectivo control de calidad. En este sentido, la aplicación de un análisis por *fingerprint* representa una estrategia adecuada y viable. Tal y como se ha mencionado en la introducción, *L. cuneifolia* es considerada el sustituto del muérdago europeo y se le han atribuido numerosas propiedades farmacológicas, es ampliamente utilizada en medicina popular y es por ello que se hace indispensable establecer un efectivo control de calidad por medio de la generación de *fingerprints*.

4.2. Obtención de los extractos

La investigación se centró sobre los ejemplares recolectados en la provincia de San Juan, sobre hospedantes tales como *Prosopis* spp y *Geoffroea decorticans*, además de una muestra comercial. En forma complementaria, se han evaluado ejemplares de la provincia de Catamarca en hospedantes tales como *Olea europaea* (“olivo”), *Geoffroea decorticans* (“chañar”), *Retama sp* (“retama”) y *Prosopis sp* (“algarrobo”) con fines comparativos para establecer un perfil fitoquímico característico.

Las partes utilizadas para la obtención de los extractos son las hojas y los tallos jóvenes herbáceos. Dado que son las hojas las usadas tradicionalmente, son objeto de un estudio más exhaustivo, por lo que se analizaron diferentes combinaciones de metanol agua (metanol 100 %, 80 % y 50 %, solos o asociados). En el caso del tallo, se utilizó la combinación de los extractos metanólicos. Luego de la eliminación de la fase orgánica, se procedió a la partición con acetato de etilo y butanol. El estudio se basó en la fracción acetato de etilo ya que tiene la mayor concentración de flavonoles. La fracción butanólica, más rica en proantocianidinas de alto peso molecular, será objeto de estudios posteriores. La investigación principal así como el aislamiento e identificación de los compuestos se realizó sobre la muestra procedente de San Juan.

Como es de esperar, los mejores rendimientos se obtuvieron de la combinación de los solventes ya que con esto se logra un agotamiento del material.

En las muestras de Catamarca se trabajó sobre la planta entera y se analizó el extracto metanólico al 100 %.

4.3. Determinación del contenido de polifenoles

En cuanto al contenido de fenoles totales, los valores más altos correspondieron a las fracciones acetato de etilo provenientes de las muestras de San Juan. Esto es esperable ya que la partición con acetato de etilo produce un enriquecimiento en los compuestos de interés. El rango de valores se encuentra entre 53,8 y 59,8 mg ácido gálico /100 mg extracto, correspondientes a las muestras “MeOH combinado-AE” de tallo y “MeOH combinado-AE” de hoja, respectivamente. Como se observa en la tabla 3.2, la fracción obtenida a partir del agotamiento de la hoja por sucesivas extracciones con distintas proporciones de metanol presentó el resultado más elevado del grupo. La muestra comercial de San Juan presentó resultados intermedios (32,1 mg ácido gálico/100 mg extracto). En cuanto a las muestras de Catamarca, si bien no hay diferencias significativas entre las distintas muestras, en los ejemplares que crecen sobre “chañar” se registraron los valores más altos (21,0 mg ácido gálico/100 mg de extracto).

En la determinación de taninos condensados (o proantocianidinas) se observaron valores significativamente bajos para los ejemplares que crecen sobre “retama” (0,07 A/ mg extracto). En el resto de las muestras provenientes de Catamarca, el rango de valores se encuentra entre 0,36 A/ mg extracto (para el ejemplar que crece sobre “olivo”) y 0,47 A/mg extracto (para el ejemplar que crece sobre “chañar”). Las fracciones acetato de etilo de hoja registraron los resultados más elevados. Entre ellas, a medida que la proporción acuosa del solvente de extracción se incrementa, también lo hacen los valores (0,50 A/mg de muestra para metanol 100 % vs 0,59 A/mg de muestra para metanol 50%). Como es esperable, la fracción “MeOH combinado-AE” de hoja presentó los valores más altos (0,67 A/mg extracto). La fracción “MeOH combinado-AE” de tallo (0,43 A/mg extracto) registró valores similares a la muestra comercial de San Juan (0,42 A/mg extracto).

En lo que respecta a los flavonoides totales, la tendencia que se verifica es la de valores más altos para las fracciones acetato de etilo (entre 6,7 mg rutina/100 mg extracto para la muestra de hoja-“MeOH 50%” y 8,5 mg rutina/100 mg extracto para la muestra hoja “MeOH-combinado”). Entre las muestras de Catamarca, destaca la correspondiente a “retama”, que triplica los valores respecto al mismo grupo (3,5 mg rutina/100 mg

extracto para el ejemplar que crece sobre “retama” mientras que el resto se encuentra entre 1,2 mg rutina/100 mg extracto para los ejemplares que crecen sobre “olivo” y 1,5 mg rutina/100 mg extracto para los ejemplares que crecen sobre “chañar”). La muestra comercial de San Juan registra valores similares a los de las muestras de Catamarca (1,1 mg rutina/100 mg extracto).

Es notoria la diferencia entre las fracciones acetato de etilo y los extractos metanólicos en el caso de la determinación de ácidos hidroxicinámicos para el cual la diferencia es 10 a 1, respectivamente (16,4 mg ácido clorogénico/100 mg extracto para la fracción “MeOH combinado-AE” de hoja y 1,6 mg ácido clorogénico/100 mg extracto para el ejemplar que crece sobre “retama”, que registró los valores más altos dentro del grupo perteneciente a Catamarca). Los valores más altos entre los extractos metanólicos correspondieron a la muestra comercial de San Juan (2,1 mg ácido clorogénico/100 mg extracto).

Los ejemplares de Catamarca que crecen sobre “chañar” y “olivo” presentan los valores significativamente más elevados de taninos totales, entre los extractos metanólicos (11,9 mg ácido gálico/100 mg extracto y 11,4 mg ácido gálico/100 mg extracto, respectivamente). Los ejemplares que crecen sobre “retama” presentaron los valores más bajos (1,6 mg ácido gálico/100 mg extracto). La muestra comercial de San Juan presentó valores intermedios (8,1 mg ácido gálico/100 mg extracto) entre los ejemplares de Catamarca y las fracciones acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan. Las fracciones acetato de etilo registraron los valores más elevados (entre 12,1 mg ácido gálico/100 mg extracto para la muestra de tallo y 14,0 mg ácido gálico/100 mg extracto para hoja “MeOH combinado-AE”).

4.4. Estudio de los flavonoides

4.4.1. Cromatografía en capa delgada (TLC)

4.4.1.1. Flavonoles

Glicósidos de flavonoles

Se realizó un estudio con el fin de obtener el perfil de los extractos y explorar los potenciales compuestos de interés cuya identidad fue luego confirmada por técnicas complementarias. Este estudio también permitió identificar estrategias de aislamiento. Además, se efectuó un estudio comparativo entre las muestras provenientes de San Juan y las de Catamarca.

Se llevó a cabo una evaluación del perfil de los glicósidos de flavonoles a través de distintos sistemas. En todos ellos, pudo observarse la presencia de compuestos del tipo orto-difenólicos, consistente con la presencia de glicósidos de quercetina. En el caso de la fracción acetato de etilo obtenida a partir de las hojas por extracciones sucesivas con metanol, se realizó una corrida frente a testigos sobre la fase estacionaria sílica gel F254 y se usó como fase móvil acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26). Por coincidencia de R_f, pudo preliminarmente determinarse la presencia de quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido y quercetina-3-O-ramnósido. Estos hallazgos son consistentes con investigaciones previas (Wagner, 1993; Varela y col., 2001). A diferencia de lo reportado por Soberón y col. (2014) no se detectó la presencia de rutina, quercetina-3-O-galactósido ni glicósidos de camferol. Se observó también la presencia de compuestos desconocidos. Por otro lado, los extractos de Catamarca presentaron un perfil similar a las muestras de San Juan.

A partir de los sistemas ensayados se definió la estrategia de aislamiento más apropiada. Se trabajó sobre la fracción acetato de etilo proveniente de las muestras de San Juan, obtenida a partir del agotamiento de las hojas por extracciones sucesivas con metanol en distintas proporciones. Se utilizó la cromatografía descendente en papel y una combinación de fases móviles consistentes en una corrida inicial en butanol-ácido acético-agua (6:1:2) y posteriores en ácido acético al 15 %. Es así que se obtuvieron cuatro bandas (1F1, 1F2, 2F2 y 3F2) las cuales fueron objeto de estudios posteriores.

De forma preliminar y por comparación con el R_f de los correspondientes testigos se puede observar lo siguiente (tabla 4.1.):

Tabla 4.1.- Compuestos preliminarmente identificados en las bandas purificadas

	1F1	1F2	2F2	3F2
Compuestos	Compuesto desconocido (mayoritario)	Compuesto desconocido (mayoritario)	Q-3-O-glucósido Q-3-O-xilósido Q-3-O-arabinopiranosido Q-3-O-arabinofuranósido Q-3-O-ramnósido Compuestos desconocidos	Q-3-O-ramnósido

Posteriormente, se realizó el tratamiento ácido para evaluar la aglicona, el azúcar y el ácido gálico.

Aglicona

En todos los sistemas ensayados, se verificó la presencia de quercetina como único aglicón, por coincidencia con el Rf del testigo de quercetina. Esto es consistente con investigaciones previas (Wagner, 1993; Fernández y col., 1998; Varela y col., 2001) y con la información preliminar surgida del análisis de la fracción acetato de etilo frente a testigos en distintos sistemas.

Azúcar

Los azúcares encontrados para cada banda en los distintos sistemas ensayados son consistentes con los correspondientes glicósidos de flavonoles detectados frente a testigos. Esto también es consistente con la bibliografía (Wagner, 1993; Fernández y col., 1998; Varela y col., 2001). Son los siguientes:

- 1F1: ramnosa, como azúcar principal
- 1F2: ramnosa, como azúcar principal
- 2F2: ramnosa, arabinosa, glucosa y xilosa
- 3F2: ramnosa

Ácido gálico

La presencia de ácido gálico se estudió en los hidrolizados de las bandas purificadas. En el sistema cromatográfico ensayado se detectó en las bandas 1F1, 1F2 y 2F2. Debe tenerse en cuenta que los compuestos mayoritarios presentes en las bandas 1F1 y 1F2 son desconocidos pero consistentes con la presencia de un anillo orto-difenólico y tienen quercetina como único aglicón. Es presumible entonces inferir que puede tratarse de un glicósido unido a ácido gálico.

En la tabla 4.2 se resume la información obtenida del análisis de los hidrolizados.

Tabla 4.2.- Compuestos presentes en los hidrolizados de las bandas purificadas

	1F1	1F2	2F2	3F2
Aglicona	Quercetina	Quercetina	Quercetina	Quercetina
Ácido gálico	Presente	Presente	Presente	Ausente
Azúcares	Ramnosa (principal)	Ramnosa (principal)	Ramnosa Arabinosa Glucosa Xilosa	Ramnosa

4.4.1.2. Taninos condensados (o proantocianidinas)

La presencia de taninos condensados (o proantocianidinas) en los extractos y las fracciones obtenidas a partir de las hojas y los tallos herbáceos de *Ligaria cuneifolia* se evidencia por la presencia de manchas de color rojo en los cromatogramas, en los distintos sistemas ensayados, al ser tratados con el reactivo vainillina clorhídrico.

Se realizó un estudio de esos compuestos por medio de distintos sistemas cromatográficos y frente a testigos de catequina y procianidina B2 (dímero). En todos ellos, se verificó la presencia de catequina, en importante concentración y otros compuestos menores. Se observó también la presencia de proantocianidinas de alto peso molecular. Esto también fue verificado previamente (Wagner, 1993; Fernández y col., 1998; Varela y col., 2001).

Entre las muestras provenientes de Catamarca también se verificó la presencia de catequina y de proantocianidinas de alto peso molecular. Cabe destacar que en el caso de los ejemplares que crecen sobre “retama”, la concentración de taninos condensados

parece ser significativamente menor comparado con el resto del grupo. Esto es consistente con los bajos valores informados para el ensayo de taninos condensados determinados por los métodos espectroscópicos (0,07 A/mg extracto).

En lo que respecta a las bandas purificadas, se detecta la presencia de catequina únicamente en la 3F2.

4.4.2. Electroforesis capilar

Desarrollo del método

El buffer borato ha sido ampliamente utilizado para el análisis de los flavonoides dada su capacidad de formar complejos con los grupos *cis*-diol, a través de sus dos grupos OH. Si bien la relación carga/peso molecular es determinante de la movilidad electroforética, la capacidad del borato de formar complejos puede, adicionalmente, modificar la migración (Marchart y col., 2003b). Se forman complejos móviles, cargados, de anillos de 5 miembros (con los grupos 1,2-diol) y de 6 miembros (con los grupos 1,3-diol) (Schmitt-Kopplin y col., 1998). Se trabajó entonces con un rango de molaridad de entre 20 y 30 mM y un pH entre 7 y 9. Como la formación del complejo se ve favorecida a pH alto, se decidió trabajar con un pH superior a 7. Se obtiene así una buena capacidad buffer con un amperaje bajo. Si bien esto mejoraba la resolución de los compuestos en estudio, no se logró una completa separación. En algunos casos, en especial para los compuestos con estructura similar pero diferente lipofilicidad, el uso de las micelas representa una ventaja ya que el comportamiento electroforético de los analitos se ve afectado por más factores, en comparación con la electroforesis zonal, los cuales pueden ser apropiadamente manipulados y optimizados (concentración del surfactante, agregado de un modificador orgánico, entre otros) (Jáč y col., 2006). Se evaluó entonces la aplicación de un sistema micelar, mediante el uso de SDS 50 mM y pH 8,3 (este pH resultó óptimo, tal como lo indica Pietta y col., 1994). Se buscó en este caso, no sólo separar los analitos por su movilidad electroforética, sino también, establecer un equilibrio de partición con la micela que resultara en una mejora de la resolución. Se observó que el sistema respondió mejor que la electroforesis zonal. Se decidió entonces el uso del sistema micelar y se evaluaron mejoras mediante el uso de aditivos. En este sentido, se ensayaron ciclodextrinas de distinto tipo, nativas y modificadas, neutras y cargadas, en distintas concentraciones y combinaciones. Las ciclodextrinas son ampliamente utilizadas como selectores quirales y dado que entre los analitos a resolver se encuentran la catequina y la epicatequina, resultaron una opción

apropiada. Los mejores resultados se obtuvieron con la β -CD en concentración 5 mM. Dado que las CD son también capaces de ejercer un reconocimiento selectivo por un mecanismo no quiral (Escuder-Gilabert y col., 2014), el agregado de una segunda ciclodextrina, la β -CD sulfatada, resultó en una significativa mejora de la resolución. También se estudió el uso de modificadores orgánicos, solos o en combinación. Los mejores resultados se asociaron a la utilización de metanol 10 %. Se ensayaron asimismo distintas condiciones de corrida tales como voltaje, volumen de inyección, aplicación de presión y temperatura. Se trabajó a dos longitudes de onda, a saber: 255 nm para los glicósidos de flavonoles y 280 nm para los taninos condensados (o proantocianidinas).

Validación

Una vez que se optimizó el método, se procedió a su validación, de acuerdo con el enfoque habitualmente utilizado para compuestos naturales. Los parámetros estudiados consistieron en el límite de detección y la cuantificación (LOD y LOQ, respectivamente), precisión en el día y entre días y la linealidad. Los resultados obtenidos para cada uno de estos ensayos fueron altamente satisfactorios, considerando la complejidad de los extractos vegetales en los cuales es deseable detectar múltiples analitos. Los límites de detección reportados en la literatura varían entre 0,01 – 6,00 $\mu\text{g/ml}$ en general, dependiendo del tipo de flavonoide, la longitud de onda de trabajo, la sección interna del capilar y la naturaleza del buffer de corrida y el pH (Gotti y col., 2011). Debido a que el contenido de los flavonoides en los extractos es relativamente alto, la sensibilidad de detección no representó un desafío inmediato. El método optimizado permitió la detección de 10 analitos y los resultados de la precisión de las áreas de los picos (entre 1,6 y 3,2 % RSD, dependiendo del compuesto) y de la precisión asociada al tiempo de migración (entre 0,2 y 0,7 % RSD, dependiendo del compuesto) fueron ampliamente satisfactorios, como así también los obtenidos para el ensayo de linealidad (r^2 entre 0,9923 y 0,9978). El método desarrollado, en consecuencia, resultó apto para el análisis de los compuestos de interés y permitió la detección simultánea de los glicósidos de flavonoles y los taninos condensados. Además, representó una ventaja respecto al HPLC convencional por su simplicidad, bajo costo, menores requerimientos de muestra, tiempos de análisis reducidos y menor uso de solventes orgánicos (bajo impacto ambiental).

Aplicación

Glicósidos de flavonoles y taninos condensados (o proantocianidinas)

Se procedió al análisis de las fracciones acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan y los extractos metanólicos de Catamarca y la muestra comercial de San Juan con el objetivo de desarrollar el *fingerprint* o los “patrones cromatográficos” para cada uno de ellos. Se realizó la corrida frente a testigos. Por coincidencia de tiempos de migración, co-cromatografía y comparación de espectros se concluyó preliminarmente que para la fracción acetato de etilo (“MeOH combinado”) proveniente de las muestras de San Juan los compuestos presentes en las muestras son quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido, quercetina-3-O-ramnósido y catequina. Se observó también 3 compuestos mayoritarios desconocidos que se denominan XR1, XR2 y XR3.

Se observaron perfiles similares para las fracciones acetato de etilo de las muestras de San Juan, obtenidas a partir de extracciones con distintas proporciones de metanol-agua. Los perfiles de las hojas y los tallos herbáceos son también semejantes, con leves variaciones cuantitativas. La muestra comercial de San Juan es también similar al resto de las muestras de la misma región. En cuanto a las muestras provenientes de Catamarca, sobre distintos hospedantes, se observan perfiles similares entre sí y al de las muestras de San Juan. Preliminarmente, podría suponerse la presencia de quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido, quercetina-3-O-ramnósido y catequina.

Un resumen de la información obtenida puede verse en la tabla 4.3.

Tabla 4.3.- Compuestos preliminarmente identificados en las muestras provenientes de San Juan y Catamarca

San Juan					Catamarca				
Fracciones acetato de etilo					Extracto metanólico		Extractos metanólicos		
Hoja			Tallo		Hoja	Planta entera			
MeOH comb	MeOH 100 %	MeOH 80 %	MeOH 50 %	MeOH Comb	Muestra comercial	Retama	Algarrobo	Chañar	Olivo
Compuestos	Quercetina-3-O-glucósido				Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G	Q-3-O-G
	Quercetina-3-O-xilósido				Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X	Q-3-O-X
	Quercetina-3-O-arabinopiranosido				Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP	Q-3-O-AP
	Quercetina-3-O-arabinofuranósido				Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF	Q-3-O-AF
	Quercetina-3-O-ramnósido				Q-3-O-R	Q-3-O-R	Q-3-O-R	Q-3-O-R	Q-3-O-R
	XR1				XR1	XR1	XR1	XR1	XR1
	XR2				XR2	XR2	XR2	XR2	XR2
	XR3				XR3	XR3	XR3	XR3	XR3
	Catequina				Catequina	Catequina	Catequina	Catequina	Catequina

MeOH comb: metanol combinado; Q-3-O-G: quercetina-3-O-glucósido; Q-3-O-X: quercetina-3-O-xilósido; Q-3-O-AP: quercetina-3-O-arabinopiranosido; Q-3-O-AF: quercetina-3-O-arabinofuranósido; Q-3-O-R: quercetina-3-O-ramnósido; XR1, XR2 y XR3: compuestos desconocidos.

Las cuatro bandas que se obtuvieron a partir de la purificación por cromatografía en papel de la muestra “MeOH combinado-AE” proveniente de San Juan fueron sometidas a estudios posteriores. De igual manera que para el caso de la TLC y por comparación frente a testigos se obtuvo lo siguiente:

- 1F1: compuesto desconocido (mayoritario)
- 1F2: compuesto desconocido (mayoritario)
- 2F2: posible presencia de quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido, quercetina-3-O-ramnósido, y compuestos desconocidos.
- 3F2: posible presencia de Q-3-O-ramnósido y catequina.

En el caso de los compuestos desconocidos, se observó que los espectros UV de los tres son similares. La evaluación de estos permite observar un desplazamiento del máximo de la banda II a 266 nm.

De la hidrólisis de las bandas por tratamiento ácido se procedió al análisis de la aglicona resultante y del ácido gálico.

Aglicona

De igual manera que en el caso de la TLC, se verificó la presencia de quercetina como único aglicón para todos los hidrolizados.

Ácido gálico

El método desarrollado permitió detectar la presencia de ácido gálico y quercetina en una única corrida cromatográfica. En este caso, el gálico se encuentra presente en los hidrolizados de la bandas 1F1, 1F2 y 2F2.

4.4.3. HPLC

Glicósidos de flavonoles y taninos condensados (o proantocianidinas)

El HPLC se utiliza como metodología complementaria a la TLC y la electroforesis capilar para obtener patrones específicos o *fingerprints*. El método utilizado se emplea habitualmente en el análisis de los flavonoides. Se realizó ajustes menores al gradiente para adecuarlo a las muestras en estudio. Se hizo un monitoreo a dos longitudes de onda (260 y 280 nm) para la detección de los glicósidos de flavonoles y los taninos condensados, respectivamente. Las muestras analizadas consistieron en las fracciones acetato de etilo de las hojas y los tallos herbáceos obtenidas a partir de extracciones con distintas proporciones de metanol-agua recolectadas en la provincia de San Juan, los extractos metanólicos de los ejemplares de Catamarca que se desarrollan sobre los hospedantes “chañar”, “retama”, “algarrobo” y “olivo” y una muestra comercial de San Juan.

Se trabajó con los testigos correspondientes a los compuestos previamente detectados por EC y TLC.

En el caso de las fracciones acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan, tanto por similitud de tiempos de retención, comparación de espectros y co-cromatografía se verificó la presencia de quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-furanósido, quercetina-3-O-ramnósido y catequina, en concordancia con lo obtenido para TLC y EC. Se observaron

también al menos tres compuestos desconocidos, mayoritarios con espectros similares entre sí y con un desplazamiento de la banda II hacia 266 nm.

Las muestras de Catamarca presentaron un perfil similar. Se observaron niveles muy bajos de lo que preliminarmente se trataría de quercetina-3-O-glucósido y se detectó la posible presencia de quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-furanósido, quercetina-3-O-ramnósido y catequina, de forma semejante a lo obtenido por TLC y EC. También pudo observarse al menos tres compuestos desconocidos, mayoritarios, que de manera similar a las muestras de San Juan presentan un desplazamiento de la banda II respecto a los espectros obtenidos para el resto de los glicósidos.

Como resultado del proceso de aislamiento de los compuestos de interés en la fracción acetato de etilo de la hoja (“MeOH combinado-AE”) en las muestras provenientes de San Juan, se obtuvieron cuatro bandas purificadas (1F1, 1F2, 2F2 y 3F2) que fueron objeto de un estudio posterior.

De igual manera que para las técnicas anteriores, se obtuvo lo siguiente:

- 1F1: compuesto desconocido (mayoritario)
- 1F2: compuesto desconocido (mayoritario)
- 2F2: posible presencia de quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido, quercetina-3-O-ramnósido, y compuestos desconocidos.
- 3F2: posible presencia de quercetina-3-O-ramnósido y catequina.

Posteriormente, se efectuó el estudio sobre los hidrolizados de las bandas purificadas a fin de investigar la naturaleza de la aglicona y la posible presencia de ácido gálico.

Aglicona y ácido gálico

Se efectuó la corrida cromatográfica de los hidrolizados de cada banda purificada frente al testigo combinado de quercetina y ácido gálico. Los resultados obtenidos concuerdan con las técnicas anteriores siendo la quercetina el único aglicón y el ácido gálico presente en las bandas 1F1, 1F2 y 2F2. Precisamente, en las bandas 1F1 y 1F2 se

encuentran los compuestos desconocidos cuyos espectros tienen un desplazamiento hacia 266 nm, lo cual es consistente con la presencia de ácido gálico como parte integrante del compuesto.

4.4.4. Comparación entre las técnicas cromatográficas

Se presenta un resumen de la información obtenida por medio de las tres técnicas cromatográficas empleadas (Tablas 4.4 y 4.5) para las muestras de San Juan y Catamarca. Las bandas purificadas y las hidrólisis se obtuvieron a partir de la fracción “MeOH combinado-AE”.

Tabla 4.4.- Comparación de la información obtenida de las distintas técnicas cromatográficas empleadas para las muestras de San Juan

	Muestras	Compuestos			
		TLC	EC	HPLC	
	Fracciones	Catequina	Catequina	Catequina	
	acetato de etilo	Q-3-O-glucósido	Q-3-O-glucósido	Q-3-O-glucósido	
	y	Q-3-O-xilósido	Q-3-O-xilósido	Q-3-O-xilósido	
	extracto	Q-3-O-arabinopiranosido	Q-3-O-arabinopiranosido	Q-3-O-arabinopiranosido	
	metanólico	Q-3-O-arabinofuranósido	Q-3-O-arabinofuranósido	Q-3-O-arabinofuranósido	
	muestra	Q-3-O-ramnósido	Q-3-O-ramnósido	Q-3-O-ramnósido	
	comercial	Compuestos desconocidos	3 compuestos desconocidos	3 compuestos desconocidos	
	1F1	Compuesto desconocido	Compuesto desconocido	Compuesto desconocido	
	1F2	Compuesto desconocido	Compuesto desconocido	Compuesto desconocido	
	Bandas purificadas		Q-3-O-glucósido	Q-3-O-glucósido	Q-3-O-glucósido
		Q-3-O-xilósido	Q-3-O-xilósido	Q-3-O-xilósido	
		Q-3-O-arabinopiranosido	Q-3-O-arabinopiranosido	Q-3-O-arabinopiranosido	
2F2		Q-3-O-arabinofuranósido	Q-3-O-arabinofuranósido	Q-3-O-arabinofuranósido	
		Q-3-O-ramnósido	Q-3-O-ramnósido	Q-3-O-ramnósido	
		(muy baja concentración)	(muy baja concentración)	(muy baja concentración)	
		Compuestos desconocidos	Compuestos desconocidos	Compuestos desconocidos	
3F2		Q-3-O-ramnósido	Q-3-O-ramnósido	Q-3-O-ramnósido	
Hidroлизован	Aglicona		Catequina	Catequina	
		1F1	Quercetina	Quercetina	Quercetina
		1F2	Quercetina	Quercetina	Quercetina
		2F2	Quercetina	Quercetina	Quercetina
	Ácido gálico	3F2	Quercetina	Quercetina	Quercetina
		1F1	Presente	Presente	Presente
		1F2	Presente	Presente	Presente
		2F2	Presente	Presente	Presente
	Azúcares	3F2	Ausente	Ausente	Ausente
		1F1	Ramnosa (principal)		
		1F2	Ramnosa (principal)		
		2F2	Ramnosa, arabinosa, glucosa, xilosa		
	3F2	Ramnosa			

Tabla 4.5.- Comparación de la información obtenida de las distintas técnicas cromatográficas empleadas para las muestras de Catamarca

Muestras	TLC	EC	HPLC
Catamarca	Catequina	Catequina	Catequina
	Q-3-O-glucósido (baja concentración)	Q-3-O-glucósido (baja concentración)	Q-3-O-glucósido (baja concentración)
	Extractos	Q-3-O-xilósido	Q-3-O-xilósido
	metanólicos	Q-3-O-arabinopiranosido	Q-3-O-arabinopiranosido
		Q-3-O-arabinofuranósido	Q-3-O-arabinofuranósido
		Q-3-O-ramnósido	Q-3-O-ramnósido
		Compuestos desconocidos	3 compuestos desconocidos

Las tres técnicas cromatográficas permitieron observar la similitud entre los perfiles de las muestras de San Juan y Catamarca y determinar preliminarmente la presencia de quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido, quercetina-3-O-ramnósido, catequina y compuestos desconocidos. Se verificó asimismo la presencia de quercetina como único aglicón y de ácido gálico en los hidrolizados de las bandas purificadas. En cuanto a los azúcares, se determinó la presencia de xilosa, glucosa, arabinosa y ramnosa. En los compuestos desconocidos se observó un desplazamiento de la banda II hacia 266 nm, consistente con la presencia de ácido gálico unido a quercetina. Esto es concordante con la información bibliográfica (Iwagawa y col., 1990; Lin y col., 2002, Moharram y col., 2006; Liao y col., 2013). Además, como resultado de la hidrólisis de estos compuestos, se observó la presencia de ramnosa como parte integrante. Todo esto permite inferir la presencia de dos compuestos conformados por quercetina, ramnosa y ácido gálico. Existe un tercer compuesto desconocido, también consistente con la presencia de ácido gálico unido a quercetina y a un azúcar.

Asimismo, se realizó una comparación entre las técnicas de electroforesis capilar y HPLC (tabla 4.6). Entre los aspectos más relevantes de la electroforesis capilar se cuenta el menor tiempo de análisis (25 minutos, incluyendo el acondicionamiento del capilar y los lavados) con respecto al HPLC (50 minutos, incluyendo el acondicionamiento de la columna y su estabilización), el costo reducido en reactivos y solventes lo cual se traduce en una metodología ecológicamente amigable y en el uso del capilar que requiere un tratamiento rápido y sencillo para su acondicionamiento, que

representa una ventaja respecto a la columna, ya que en general se requiere el uso de una guardacolumna para preservar la vida útil de ésta.

Tabla 4.6.- Comparación entre las técnicas de electroforesis capilar y HPLC

EC	HPLC
Frentes de solvente no parabólicos. Mayor eficiencia.	Frente de solvente parabólico.
Bajo consumo de solventes (<10 ml/día)	Mayor Consumo de FM (≈500 ml/día)
Bajo consumo de reactivos	
Cortos tiempos de análisis (25 minutos corrida).	Mayores tiempos de análisis (50 minutos)
El capilar requiere un mantenimiento simple (2 minutos de lavado con KOH 0,1M y 2 minutos de lavado con agua, entre corridas).	Uso de gradiente: mayor tiempo de estabilización.
Estabilización rápida del capilar entre corridas (4 minutos de lavado y 2 minutos con electrolito).	Debe utilizarse un guardacolumna para aumentar la vida útil de la columna
	Mayor tiempo para el acondicionamiento de la columna (10 minutos de lavado de la columna post corrida con metanol y 10 minutos de estabilización con la proporción inicial)
Bajo costo	Mayores costos: columna, guardacolumna, reactivos y solventes.
Menor uso de solvente orgánico. Menor impacto ambiental	Mayor uso de solventes orgánicos requeridos para el gradiente.
Volumen de inyección de muestra (5-20 nL)	Mayor cantidad de muestra para inyección (20 µl)
Versatilidad y mayor selectividad	Menor versatilidad. La selectividad depende de cada columna

4.5. Análisis estructural

4.5.1. HPLC-masa

Se aplicó el análisis de HPLC-masa a la fracción acetato de etilo obtenida a partir de extracciones sucesivas con distintas proporciones de metanol-agua, sobre las hojas, en las muestras provenientes de San Juan. El análisis efectuado consistió en un espectro de primer orden que brindó información sobre el ión precursor y sobre éste, se realizó una fragmentación para obtener datos adicionales para la dilucidación estructural. Dado que se trabajó con ESI en modo positivo, se obtuvieron los $[M+H]^+$. La información recabada se complementó con lo obtenido por los otros métodos cromatográficos. Los hidrolizados de las bandas purificadas brindaron información sobre la aglicona, la naturaleza del azúcar y la presencia de ácido gálico. En este caso, pudo verificarse la presencia de quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranósido y quercetina-3-O-ramnósido. Con respecto a los compuestos de iones moleculares 587 y 601, de acuerdo con la bibliografía (Liao y col., 2012, 2013 y 2014; Iwagawa y col., 1990; Sannomiya y col., 2005 y 2007; Al-Sayed y col., 2012; Lu y col., 2010) y la información suministrada por los métodos cromatográficos, puede concluirse que se trata de galoil glicósidos de quercetina. Los fragmentos derivados de los iones precursores también confirman tal inferencia, al visualizarse la aglicona ($[M+H^+]$ 303) el residuo galoil ($[M+H^+]$ 153) y sus sucesivas deshidrataciones. Esto se complementa con los resultados obtenidos de la hidrólisis de las bandas purificadas. En la literatura (Liao y col., 2012 y 2013) se plantea una diferenciación en los patrones de fragmentación que serían indicativos de la distinta posición de unión del ácido gálico a la molécula de ramnosa. Además, también se observa una correspondencia con los espectros UV obtenidos por los reactivos de desplazamiento (Iwagawa y col., 1990; Lin y col., 2002, Moharram y col., 2006) y por HPLC para estos compuestos respecto a la información suministrada por la bibliografía (Liao y col., 2012) en donde se observa un corrimiento de la banda II respecto de los glicósidos de quercetina hacia 266 nm, lo cual es concordante con la presencia de ácido gálico en la molécula. Es por esto que preliminarmente se asigna la identidad de estos compuestos como quercetina-3-(2'' galoil)-ramnósido y quercetina-3-(3'' galoil)-ramnósido (Isobe y col., 1990; Liao y col., 2012, 2013 y 2014; Lin y col., 2002; Kim y col., 2013; Peng y col., 2003; Estrada y col., 2005; Moharram y col., 2006). El orden de elución propuesto es en primer lugar el galato unido en posición 2 de la ramnosa y en segundo lugar, el galato unido en posición 3 (Lu y col., 2010 y Liao y col., 2012 y

2013). En el caso del ión molecular de 587, puede inferirse que se trata de un galoil pentósido de quercetina, dado que se encuentra contenido en la banda 2F2 que presenta una mezcla de compuestos. En cuanto a la naturaleza del azúcar, esta podría ser arabinosa o xilosa.

En la bibliografía se reportan derivados de arabinopiranososa y arabinofuranosa unidas a ácido gálico en distintas posiciones así como también, xilosa (Iwagawa y col., 1990; Okamura y col., 1993; Sannomiya y col., 2005 y 2007; Fan y col., 2010; Al-Sayed y col., 2012)

4.5.2. RMN

Los resultados obtenidos se complementan con la información asociada a las técnicas cromatográficas, los datos del ión molecular y los patrones de fragmentación por HPLC-masa y las hidrólisis. Se observó la presencia de quercetina como única aglicona por las señales características de ^1H en la región aromática de H-2' (7,75 ppm, doblete), 5' (6,90 ppm, doblete) y 6' (7,65 ppm, doblete) propios de un anillo B 3',4'-dihidroxi. A su vez, los dos dobletes *meta* H-6 (6,20 ppm) y H-8 (6,40 ppm) consistentes con un anillo 5,7-dihidroxi. Esto también se verificó por comparación del espectro de los compuestos con el testigo de quercetina y bibliografía (Fossen y col. 2006). La unión de la quercetina al glicósido en posición 3 se verificó en todos los casos por el HMBC (conectividad a larga distancia) entre el ^1H del carbono anomérico del azúcar y el C-3 de la quercetina. Se verificó la presencia de quercetina-3-O- β -D-glucósido, quercetina-3-O- β -D-xilósido, quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosido, quercetina-3-O- α -L-arabinofuranósido y quercetina-3-O- α -L-ramnósido. La naturaleza de los azúcares se verificó por las señales características de los C anoméricos y de los H asociados. La presencia de ramnosa pudo inferirse por la señal propia del ^1H singlete correspondiente al CH_3 , alrededor de 0,9 ppm. La presencia de catequina se confirmó por los resultados de los ensayos cromatográficos y la presencia de señales características en la región aromática de 6,86 (1H, s), 6,77 (1H; d) y 6,74 (1H; d). Por otra parte, la *J* correspondiente al H-2 permite deducir la esteoquímica 2,3 como propia de la catequina. Estos compuestos han sido previamente reportados en *Ligaria cuneifolia* (Wagner 1993, Fernandez y col., 1998; Varela y col. 2001). A diferencia de

lo reportado por Soberón y col. (2014), no se detectó rutina, quercetina-3-O-galactósido ni derivados glicosilados de camferol.

A su vez, se detectó la presencia de glicósidos de quercetina unidos a ácido gálico, por primera vez en esta especie. La presencia del ácido gálico se verificó por la señal de ^1H en 7,0 ppm (singlete) correspondientes a H-2 y H-6. La conectividad entre el azúcar y el ácido gálico quedó establecida por el HMBC donde se observó la correlación entre el ^1H del azúcar y la señal propia del carbonilo del ácido gálico. Es el caso de quercetina-3-O- α -L-(2''-O-galoil)-arabinopiranosido, quercetina-3-O- α -D-(2''-O-galoil)-arabinofuranósido, que se encuentran en la banda 2F2, quercetina-3-O- α -L-(2''-O-galoil) ramnósido (presente en la banda 1F1) y quercetina-3-O- α -L-(3''-O-galoil) ramnósido (banda 1F2). La identidad de estos compuestos se asignó mediante la información obtenida de las técnicas cromatográficas y las hidrólisis, además de la búsqueda en bases de datos, la comparación con el espectro de los testigos y bibliografía (Fan y col. 2010, Fossen y col. 2006, Lin y col. 2002, Moharram y col. 2006; Peng y col. 2003; Estrada y col. 2005; Kim y col. 2000 y 2013; Lee y col. 2013; Iwagawa y col. 1990, Al-Sayed y col. 2012).

Para el caso de los compuestos presentes en la banda 2F2, que constituye una mezcla, se aplicó en forma complementaria a los ensayos habituales (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY y TOCSY), la espectroscopia de difusión (DOSY). Ha sido aplicada a la fracción acetato de etilo de un extracto (Rodrigues y col., 2009). Es también llamada cromatografía RMN y permite obtener coeficientes de difusión característicos de cada compuesto presente en la mezcla. Si bien esta metodología se está poniendo a punto, se obtuvieron resultados preliminares que permitieron obtener información respecto al número de compuestos presentes en la mezcla y sus componentes (aglicón, azúcar, presencia de ácido gálico).

4.6. Actividad antioxidante

4.6.1. Autografía por TLC

El objetivo consistió en realizar una evaluación rápida de la capacidad antioxidante de la fracción acetato de etilo mediante una autografía (Lu y col., 2010; Zampini y col., 2010). Se estudió la fracción acetato de etilo de las hojas, obtenida mediante

extracciones sucesivas con distintas proporciones de metanol y metanol-agua, de las muestras provenientes de San Juan. La ventaja consiste en poder utilizar como reveladores los reactivos que se utilizan habitualmente en los métodos espectroscópicos como generadores de radicales libres. Los compuestos atrapadores de radicales libres se observan como manchas amarillas contra un fondo violeta, en el caso del DPPH y fondo verde, en el caso del ABTS, por decoloración de los reactivos reveladores. Pudo observarse que los glicósidos de quercetina y catequina poseen capacidad antioxidante, lo cual es consistente con su naturaleza polifenólica.

4.6.2. Métodos espectroscópicos

La determinación se realizó sobre las fracciones acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan, los extractos metanólicos de las muestras de Catamarca y la muestra comercial de San Juan.

4.6.2.1. DPPH

Los valores más altos se registraron en la fracción acetato de etilo y entre las muestras correspondientes a las hojas, no existen diferencias significativas, si bien, como es de esperarse, los valores más altos pertenecieron a la fracción “MeOH combinado-AE” (entre 40,2 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para la muestra de tallo “MeOH combinado-AE” y 48,1 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para la muestra de hoja “MeOH combinado-AE”). Entre las muestras de Catamarca, los ejemplares que crecen sobre “retama” presentan valores significativamente bajos (9,8 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto) y los más altos, corresponden a los ejemplares que crecen sobre “chañar” (33,0 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto). Como se ha observado, los ejemplares que crecen sobre “retama” presentaron un comportamiento significativamente diferente del resto del grupo, lo cual es también consistente con los valores más bajos registrados para taninos condensados (0,07 A/mg de extracto) y taninos totales (1,6 mg ácido gálico/100 mg extracto). La muestra comercial de San Juan (25,6 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto) presenta valores similares a las muestras de Catamarca (entre 23,8 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para los ejemplares que crecen sobre “algarrobo” y 33,0 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para los ejemplares que crecen sobre “chañar”, que tiene los valores más altos del grupo).

Se aplicó el test de Pearson para evaluar la correlación entre el método de DPPH y las determinaciones asociadas al contenido de polifenoles. La correlación es significativa

para todos los ensayos, y es algo menor para los flavonoides totales. Debe tenerse en cuenta la diversidad estructural de éstos, ya que la presencia de los residuos glicosídicos y de grupos galilo tienen un efecto significativo sobre la capacidad antioxidante (Yokozawa y col. 1998).

4.6.2.2. ABTS

De igual manera que lo observado para el ensayo de DPPH, los valores más altos se registraron en la fracción acetato de etilo de las muestras de San Juan correspondientes a las hojas (entre 14508 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para la fracción “MeOH 100 %-AE” y 16279 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto para la fracción “MeOH combinado-AE”). Entre las muestras de Catamarca, los valores más bajos son los correspondientes a los ejemplares que crecen sobre “retama” (7229 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto) y los más altos, los correspondientes a los ejemplares que crecen sobre “chañar” (11354 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto). La muestra comercial de San Juan presentó valores similares a este último (11220 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto).

La aplicación del test de Pearson demostró que la correlación es significativa con todos los ensayos asociados a la determinación del contenido polifenólico y es algo menor para los flavonoides totales. Nuevamente, esto es atribuible a la diversidad de este último grupo en cuanto a sus características estructurales (glicosilación, presencia de residuos galóilo, entre otros).

A su vez, se observó una correlación significativa entre los ensayos de ABTS y DPPH.

Esto es consistente con los resultados obtenidos para la fracción acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan, que exhibieron los mayores valores de capacidad antioxidante por ambos métodos, hecho que se correlaciona con el mayor contenido de polifenoles. Además en las muestras provenientes de Catamarca y para ambos métodos, los ejemplares que crecen sobre “retama” mostraron los valores más bajos de capacidad antioxidante así como también, de taninos condensados y totales mientras que los ejemplares que crecen sobre “chañar” registraron los valores más altos de capacidad antioxidante como así también de fenoles totales, taninos condensados y totales.

4.6.3. Electroforesis capilar

Si bien la medición de la capacidad antioxidante por los métodos espectroscópicos tradicionales es simple, la principal desventaja de tales técnicas es la evaluar todos los antioxidantes encontrados en la muestra. Los compuestos polifenólicos individuales, con sus características estructurales propias presentan diferente capacidad antioxidante y este efecto no puede ser monitoreado a través de estos métodos (Helmja y col., 2007; 2008 y 2009). Esto es especialmente importante en el caso de los flavonoides para los cuales las diferencias estructurales tienen gran peso sobre su potencial antioxidante. En consecuencia, los métodos que permiten evaluar la capacidad antioxidante relativa de cada componente de una mezcla son muy requeridos. En este sentido, el método de electroforesis capilar desarrollado para el análisis de los extractos fue aplicado al monitoreo de la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en las muestras. Se utilizó como base la metodología desarrollada por Helmja y col. (2007, 2008 y 2009) para la determinación de la capacidad antioxidante de los componentes de un extracto mediante la reacción con DPPH.

Se trabajó inicialmente con una solución mezcla de testigos, a manera de compuestos marcadores, a saber: quercetina, catequina, rutina y ácido gálico. Los resultados obtenidos están de acuerdo con la bibliografía (Rice-Evans y col., 1996; Yokozawa y col., 1998). En este sentido, la quercetina exhibe el mayor poder antioxidante lo cual es consistente con sus características estructurales. Posee la estructura *orto*-dihidroxi en el anillo B que confiere alta estabilidad al radical formado y contribuye a la deslocalización. El doble enlace 2,3 en conjugación con el grupo 4-oxo en el anillo C es responsable de la deslocalización del anillo B. Los grupos 3-OH y 5-OH en conjugación con la función 4-oxo en los anillos A y C son requeridos para la máxima capacidad antioxidante. Es por esto que, al satisfacer todos estos requisitos, la quercetina es mejor antioxidante que la catequina. La glicosilación de la quercetina reduce su capacidad antioxidante. El grupo 3-OH unido al doble enlace 2,3 y adyacente al grupo 4-carbonilo del anillo C es requerido para la máxima actividad (Rice-Evans y col. 1996). Por otra parte, la unión del azúcar puede dificultar el acceso de la molécula atrapadora de radicales libres al centro radicalario del DPPH (Yokozawa y col. 1998). Además, la unión del azúcar a los grupos OH vecinos evita la formación, durante la oxidación, de una estructura o-quinónica estabilizada por conjugación polar (Helmja y col., 2008). Con respecto a los glicósidos, la capacidad antioxidante decrecería en el orden hiperósido>quercitrina>isoquercitrina (Yokozawa y col. 1998).

La presencia de ácido gálico unido a la molécula del glicósido representa un incremento en la capacidad antioxidante respecto a su contraparte. Estudios previos han demostrado que el radical galilo, formado durante la reacción con DPPH, es una especie altamente reactiva que puede participar en una variedad de reacciones para generar dímeros a través de uniones C-C y C-O, determinando así la finalización de la reacción en cadena radicalaria (Yokozawa y col. 1998). Comparaciones entre glicósidos de quercetina y sus contrapartes no galoiladas demuestran que la presencia de ácido gálico en la molécula, incrementa el potencial antioxidante (Okamura y col. 1993).

A fin de poner a punto la metodología, se ensayaron dos condiciones. Se trabajó con la fracción acetato de etilo de las hojas obtenida por extracciones sucesivas con metanol y metanol-agua en distintas proporciones, de las muestras provenientes de San Juan. Por un lado, se trabajó con una concentración fija de DPPH (0,5 mM) y variable de extracto (1,0 mg/ml a 10,0 mg/ml) y por otro, en una concentración fija de extracto (10,0 mg/ml) y variable de DPPH (0,1 mM – 10 mM). Una vez hecho esto y para realizar los estudios comparativos entre las distintas muestras, se trabajó con dos concentraciones de DPPH (0,5 mM y 2,5 mM) y una concentración fija de 10 mg/ml para las fracciones acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan y 20 mg/ml para los extractos metanólicos de las muestras procedentes de Catamarca y la muestra comercial de San Juan.

Entre las fracciones acetato de etilo de las muestras provenientes de San Juan, obtenidas mediante extracciones con distintas proporciones de metanol-agua, se observó un comportamiento similar para los glicósidos de quercetina (entre 73,8 % no oxidado para la fracción “MeOH 100 %-AE” de hoja y 83,7 % no oxidado para la fracción “MeOH 80 %-AE de hoja frente a una concentración de 0,5 mM de DPPH. A su vez, frente a 2,5 mM de DPPH se observó un valor mínimo de 35,6 % no oxidado para la fracción “MeOH 80 %-AE y un máximo de 47,8 % no oxidado para otro compuesto de la misma fracción). Los glicósidos de quercetina exhibieron un porcentaje de no oxidación semejante y menor al de los galoil glicósidos, lo cual es consistente con lo explicado respecto al incremento en la capacidad antioxidante por la presencia de ácido gálico en la molécula (frente a 0,5 mM DPPH los valores oscilaron entre 50,5 % no oxidado para la fracción “MeOH 100 %-AE” y 59,8 % no oxidado para la fracción “MeOH combinado-AE” de tallo. Para 2,5 mM DPPH el rango comprendió 17,3 % no oxidado para la fracción “MeOH combinado-AE” y 28,4 % no oxidado para la fracción tallo

“MeOH combinado-AE”). Para la catequina se observa un porcentaje de no oxidación ligeramente mayor a los glicósidos (entre 80,8 % de no oxidación para la fracción “MeOH combinado-AE” de hoja y 86,5 % no oxidado para la fracción “MeOH 50 %-AE”).

En cuanto a las muestras de Catamarca, previo al agregado de DPPH, se observó una menor concentración de compuestos respecto a las fracciones acetato de etilo, lo cual es consistente con los valores obtenidos para el contenido de polifenoles. Debe tenerse en cuenta que la partición con acetato de etilo resulta en un enriquecimiento de los compuestos de interés. Esto es especialmente notorio en el caso de los ejemplares que crecen sobre “retama” ya que los compuestos presentes en la muestra registraron los valores más bajos del grupo al ser tratados con 0,5 mM de DPPH (42,9 % no oxidado para los glicósidos de quercetina y 10,3 % no oxidado para los galoil glicósidos de quercetina) y fueron indetectables luego de ser tratados con 2,5 mM de DPPH. Si bien el perfil de flavonoides es preliminarmente semejante a la fracción acetato de etilo de las muestras de San Juan, se observó una mayor variabilidad en los resultados. Debe tenerse en cuenta que las muestras de Catamarca se desarrollaron sobre distintos hospedantes, lo cual otorgó una fuente adicional de variabilidad. La muestra comercial de San Juan registró valores similares a los extractos metanólicos de las muestras procedentes de Catamarca (al ser tratados con 0,5 mM DPPH, entre 62,5 % no oxidado y 81,5 % no oxidado para glicósidos de quercetina y entre 53,5 y 59,7 % no oxidado para los galoil glicósidos de quercetina. En el caso de 2,5 mM DPPH, entre 38,2 % no oxidado y 43,2 % no oxidado para los glicósidos de quercetina y entre 15,0 y 21,2 % no oxidado para los galoil glicósidos de quercetina). Como en el caso de las muestras de San Juan, los galoil glicósidos de quercetina registraron % de no oxidación menores al de sus contrapartes glicosiladas.

El método propuesto es en consecuencia, adecuado para el monitoreo de la capacidad antioxidante individual.

4.6.4. Ensayos *ex vivo*

Se trabajó con la fracción acetato de etilo de hoja, obtenida a partir de sucesivas extracciones con metanol y distintas proporciones de metanol-agua, de la muestra proveniente de San Juan.

4.6.4.1. Homogeneizados de tejido

Se realizan dos ensayos para estudiar la capacidad antioxidante de la fracción acetato de etilo (EAF) como inhibidor de la peroxidación lipídica: a) Niveles de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) inducidos por ter-butil-hidroperóxido en homogeneizados de hígado de rata y b) QL (quimioluminiscencia) emitida debido a la auto-oxidación de homogeneizados de cerebro de rata. El ensayo de TBARS es una medida indirecta del daño oxidativo a los lípidos y puede ser empleado para determinar el grado de peroxidación lipídica que sufre un tejido. La QL debida a la auto-oxidación es un indicador útil de la extensión de los procesos de peroxidación lipídica.

Los resultados obtenidos sugieren que la EAF no solo mostró una significativa capacidad antioxidante *in vitro* sino que también puede ser usada eficientemente como un antioxidante que actúa como inhibidor de la cadena de peroxidación lipídica.

4.6.4.2. Inhibición de daño al ADN inducido por H₂O₂

El ensayo del cometa es utilizado para evaluar la capacidad de la fracción EAF de inhibir el daño al ADN. Se emplea H₂O₂ como inductor del daño oxidativo al ADN. Cuando éste fue incubado con las células, se produjo un aumento en la longitud del cometa, el cual disminuyó cuando se realizó el tratamiento previo con EAF.

Los resultados indican que la EAF de *L. cuneifolia* puede ser un efectivo antioxidante para prevenir el daño oxidativo al ADN.

4.6.5. Inhibición de la QL *in vivo* en piel

Las especies reactivas del oxígeno y el estrés oxidativo causados por UVA han sido reconocidos como participantes en estas condiciones patológicas en la piel (Sander y col., 2004). Incrementos en la QL *in vivo* reflejan un incremento de la concentración intracelular en estado estacionario de especies excitadas del oxígeno y la ocurrencia del estrés oxidativo (Boveris y col., 1980).

L. cuneifolia no sólo es eficiente en condiciones *in vivo* y *ex vivo*, sino que también pudo aliviar el estrés oxidativo *in vivo* producido por la exposición a UVA.

Tomados en conjunto, estos datos indican que las fracciones enriquecidas de *L. cuneifolia* muestran una significativa actividad antioxidante actuando como un átomo de hidrógeno o como un dador de electrones en sistemas *in vitro*. La EAF también ha probado ser eficiente como antioxidante en los procesos de peroxidación lipídica,

mediante la ruptura de la cadena; en la inhibición del daño al ADN inducido por H₂O₂ y como un oxidante *in vivo*. Las propiedades antioxidantes pueden ser uno de los mecanismos por los cuales estas fracciones enriquecidas poseen efectos benéficos en medicina tradicional.

5. CONCLUSIONES

Ligaria cuneifolia, al igual que otras especies de la familia Loranthaceae, es rica en flavonoides, especialmente flavonoles que podrían ser determinantes de su actividad farmacológica. Posee, además, una amplia distribución geográfica y crece sobre distintos hospedantes, por lo cual un efectivo control de calidad se hace indispensable.

Se desarrolló un método por electroforesis capilar que permitió establecer marcas de reconocimiento específico o *fingerprints* para la estandarización de los extractos. Esta metodología fue comparada con otras técnicas cromatográficas. La electroforesis capilar demostró ser una alternativa atractiva por su alta eficiencia de separación, costo reducido por su bajo consumo de solvente, lo cual la hace ecológicamente amigable, además, por la mínima cantidad de muestra requerida y los tiempos de análisis reducidos. Por todo lo expuesto, la electroforesis capilar puede ser utilizada eficientemente para el control de calidad de los extractos de *Ligaria cuneifolia*.

Los flavonoides presentes en los extractos pudieron ser identificados por medio de técnicas cromatográficas y espectroscópicas (RMN y masa). Se determinó la presencia de quercetina-3-O- β -D-xilósido, quercetina-3-O- β -D-glucósido, quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosido, quercetina-3-O- α -L-arabinofuranósido, quercetina-3-O- α -L-ramnósido y catequina. Estos coinciden con hallazgos previos (Wagner, 1993; Vattuone y col., 2014).

Por otro lado, se determinó por primera vez en esta especie la presencia de quercetina-3-O- α -L-(2''galoil)-ramnósido, quercetina-3-O- α -L-(3''galoil)-ramnósido, quercetina-3-O- α -L-(2''galoil)-arabinopiranosido y quercetina-3-O- α -D-(2''galoil)-arabinofuranósido.

Además, se demostró asimismo la capacidad antioxidante de los extractos mediante métodos espectroscópicos, autografía por TLC y ensayos *ex vivo* e *in vivo*. El método de electroforesis capilar desarrollado para el análisis de los extractos fue aplicado

exitosamente para el monitoreo del comportamiento antioxidante individual de los compuestos presentes en *L. cuneifolia*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbiatti D. (1946). "Las Lorantáceas Argentinas". *Rev. Mus. La Plata* (N. S.), *Sec. Bot.* 7: 1-110.
- Alam M, Bristi N, Rafiquzzaman M. (2013). "Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity". *Saudi Pharmaceutical Journal* 21: 143–152.
- Al-Sayed E, Singab A, Ayoub N, Martiskainen O, Sinkkonen J, Pihlaja K. (2012) "HPLC–PDA–ESI–MS/MS profiling and chemopreventive potential of *Eucalyptus gomphocephala* DC" *Food Chemistry* 133: 1017–1024.
- Altria K, Simpson C. (1987). "High Voltage CZE: operating parameter effect upon electroendosmotic flow mobilities". *Chromatographia* 24(1): 527-532.
- Angiosperm Phylogeny Website - Missouri Botanical Garden [en línea]
< <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> > [consulta: 11/3/2014]
- Atamna I, Metral C, Muschik G, Isaaq J. (1990a). "The effect of electric field strength, buffer type and concentration on separation parameters in capillary zone electrophoresis: II. The role of the buffers' cation" *Journal of Liquid Chromatography*, 13(13): 2517-2527.
- Atamna I, Metral C., Muschik G., Isaaq H. (1990b). "Factors that influence mobility, resolution, and selectivity in CZE: III. The role of the buffer's anion" *Journal of Liquid Chromatography* 3(16): 3201-3210.
- Barlow B. (1964). "Classification of the *Loranthaceae* and *Viscaceae*". *Proc. Linn. Soc. N. S. W.* 89, Part 2: 268-272
- Barlow B. (1987). "Mistletoes". *Journal of the Institute of Biology* 34(5): 261-269
- Barlow B, Hawsksworth F, Kuijt J, Polhill R, Wiens D. (1989). "Genera of Mistletoes". *The Golden Bough* 11: 1-4.
- Becker H. (1986). "Botany of European Mistletoe (*V. album* L.)". *Oncology* 43(1): 2-7.

- Bendazzoli C, Mileo E, Lucarini M, Olmo S, Cavrini V, Gotti R. (2010). "Capillary electrophoretic study on the interaction between sodium dodecyl sulfate and neutral cyclodextrins" *Microchimica Acta* 171: 23–31.
- Benigni R, Capra C, Cattorini P. (1964). *Piante Medicinali, Chimica, Farmacologia e Terapia*. Vol II, Inverni Della Beffa, Milán: 1760-1782.
- Benzie I; Strain J. (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay". *Analytical Biochemistry*, 239: 70–76.
- Bertotto J. (1949). *Flora Medicinal (de todas las regiones del mundo)*. Larbold. 205-208.
- Blanc T. (1997). "Capillary electrophoresis". *Analytical instrumentation handbook* 25: 1351.
- Borneo R, León A, Aguirre A, Ribotta P, Cantero J. (2009). "Antioxidant Capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system" *Food Chemistry*, 112 (3): 664-670.
- Borneo R, Aguirre A. (2013). "Antioxidant capacity of medicinal plants" en Watson & Preedy (Ed) *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease*. Cap 34. Academic Press San Diego (1ª edición): 527-535.
- Botana A, Aguilar J, Nilsson M, Morris G. (2011). "J-modulation effects in DOSY experiments and their suppression: The Oneshot45 experiment" *Journal of Magnetic Resonance* 208: 270–278.
- Boveris A, Cadenas E, Chance B. (1980). "Ultraweak chemiluminescence: A sensitive assay for oxidative radical reactions". *Federation Proceedings* 40: 195-198.
- Bravo L. (1998). "Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance" *Nutrition Reviews* 56(11): 317-333.
- Burgstaller J. (1984). "700 hierbas medicinales". Editorial Lancelot. Buenos Aires
- Bruin G, Chang J, Kuhlman R, Zegers, K, Kraak, J, Poppe H. (1989). "Capillary zone electrophoretic separations of proteins in polyethylene glycol-modified capillaries". *Journal of Chromatography A* 471: 429-436.

- Campos A, Lissi E. (1997). "Kinetics of the reaction between 2,2'azinobis (3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived Radical Cations and Phenols". *International Journal of Chemical Kinetics* 29(3):219-224.
- Carey M, Small D. (1972). "Micelle formation by bile salts. Physicochemical and thermodynamic considerations" *Archives of Internal Medicine* 130: 506-527.
- Caridi D, Trenerry C, Rochfort S, Duong S, Laughler D, Jones R. (2007). "Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography". *Food Chemistry* 105: 691–699.
- Castellón A. (1998). "*Loranthaceae*" en Flora del Valle de Lerma. *Aportes Botánicos de Salta, Serie Flora* 5 (2): 1-15.
- Castro M, Tellería M. (1995). "Análisis palinológico de las *Loranthaceae* (s.s.) argentinas". *Darwiniana* 33 (1-4): 301-307
- Catálogo de Plantas Vasculares – [en línea] Instituto de Botánica Darwinion
<<http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm>>[Consulta: 15/5/2015]
- Cerdá Zolezzi P, Fernández T, Aulicino P, Cavaliere V, Greczanik S, Caldas Lopes, Wagner M, Ricco R, Gurni A, Hajos S, Álvarez E. (2005). "*Ligaria cuneifolia* flavonoid fractions modulate cell growth of normal lymphocytes and tumor cells as well as multidrug resistant cells". *Immunobiology* 209: 737–749.
- Coleman R, Rahman K. (1987). "Taurodehydrocholate increases delivery of biliary lipids" *Biochemical Society Transactions* 15(5): 849
- Cui S, Reichner J, Matero R, Albina J. (1994). "Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or independent mechanism". *Cancer research* 54: 2462- 2467.
- Cuyckens F, Claeys M. (2002). "Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides". *Rapid communications in mass spectrometry* 16: 2341 – 2348.

- Cuyckens F, Claeys M. (2004). "Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids". *Journal of Mass Spectrometry* 39: 1-15.
- Chen J, Li S, Li P, Song Y, Chai X, Ma D. (2005). "Qualitative and quantitative analysis of active flavonoids in *Flos Lonicerae* by capillary zone electrophoresis coupled with solid-phase extraction" *Journal of Separation Science* 28: 365–372.
- Cheung H, Zhang Q. (2008). "Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers" *Journal of Chromatography A* 1213(2): 231-238.
- Dadáková E, Prochazkova E, Krizek M. (2001). "Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials" *Electrophoresis* 22: 1573-1578.
- Dadáková E, Kalinová J. (2010). "Determination of quercetin glucosides and free quercetin in buckwheat by micellar electrokinetic capillary chromatography". *Journal of Separation Science* 33(11):1633-1638.
- Dao L, Friedman M. (1992). "Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2152-2150.
- Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. (2004). "Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay". *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 48–54.
- De Lucca D, Zalles J. (1992). *Flora Medicinal Boliviana*. Los Amigos del Libro, La paz, Cochabamba. 306-307
- Deng Y, Snyder J. (2002) "Preparation of a 24-Nor-1,4-Dien-3-One Triterpene Derivative from Betulin: A New Route to 24-Nortriterpene". *Journal of Organic Chemistry* 67: 2864-2873.
- Do T, Nguyen T, Tran H, Stuppner H, Ganzera M. (2012) "Quantitative Determination of Phenolic Compounds in Lotus (*Nelumbo nucifera*) Leaves by Capillary Zone Electrophoresis". *Planta Medica*, 78(16): 1796–1799.

- Dobrecky C, Moreno E, Garcés M, Lucangioli S, Ricco R, Evelson P, Wagner M. (2014). “Contenido de polifenoles en *Ligaria cuneifolia* y su relación con la capacidad antioxidante” *Dominguezia* 30(2): 35-39.
- Domínguez J. (1928). “Loranthaceae” en Contribuciones a la Materia Médica Argentina. *Trabajos del Instituto de Botánica y Farmacología* 44: 260-264.
- Dominighini A, Ferrero M, Mengarelli G, Ronco M, de Luján Álvarez M, Wagner M, Gurni A, Carnovale C, Luquita A. (2004). “Hemorheologic changes induced by aqueous extract of *Ligaria cuneifolia*: treatment by two different administration routes”. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 31(2):113-21.
- Dominighini A, Ferrero M, Crosetti D, Ronco MT, González J, Urli L, Wagner M, Gurni A, Carnovale CE, Luquita A. (2015). “Effects of proanthocyanidin enriched extract from *Ligaria cuneifolia* on plasma cholesterol and hemorheological parameters. In vivo and In vitro studies”. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 60(3): 317-25.
- Domon B, Costello C. (1988). “A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates”. *Glycoconjugate Journal* 5: 397–409.
- El-Aneed A , Cohen A, Banoub J. (2009). “Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers”. *Applied Spectroscopy Reviews* 44 (3): 210-230.
- Engler A, Krause K. (1935). Loranthaceae. En A. Engler y K. Prantl, (eds), *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, 2ª edición, W. Engelmann, Leipzig, 16B, 98-203.
- Engler A. (1964). *Syllabus der Pflanzenfamilien*. Gebrüdes Borntraeger, Berlin: 69-71.
- Evelson P, Ordoñez C, Llesuy S, Boveris A. (1997). “Oxidative stress and *in vivo* chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation”. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 38: 215-219.
- Ernster L. (1986). “Oxygen as an environmental poison” *Chemica Scripta* 26(4): 525–534.
- Escuder-Gilabert L, Martín-Biosca Y, Medina-Hernández M, Sagrado S. (2014). “Cyclodextrins in capillary electrophoresis: Recent developments and new trends”. *Journal of Chromatography A* 1357: 2–23

- Estrada O, Hasegawa M, Gonzalez-Mujica F, Motta N, Perdomo E, Solorzano A, Méndez J, Méndez B, Zea E. (2005). "Evaluation of Flavonoids from *Bauhinia megalandra* Leaves as Inhibitors of Glucose-6-Phosphatase System" *Phytotherapy Research* 19: 859–863
- Fan X, Cheng Y, Ye Z, Lin R, Qian Z. (2006). "Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines". *Analytica Chimica Acta* 555: 217–224.
- Fan D, Wang H, Zhi D, Shen Y. (2010). "CE Analysis of Endogenous Flavonoid Gallate Esters from *Nepenthes gracilis* (Nepenthaceae)" *Chromatographia* 72 (9/10): 1013-1016.
- Fernández T.; Wagner M, y col. (1998). "Study of an Argentine Mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae)". *Journal of Ethnopharmacology* 62: 25-34.
- Fernández T, Varela B. y col. (2000). "Mistletoes from Argentina. *Ligaria cuneifolia* var. *cuneifolia* as a substitute for the European Mistletoe (*Viscum album* L.)" en *Mistletoe. The genus Viscum* 16: 61-74.
- Fernández T, Cerdá Zolezzi P, Aulicino P, Caldas Lopes E, Wagner M, Ricco R, Hajos S, Gurni A, Álvarez E. (2003). "Immunobiological features of the galactoside lectin L-Lc isolated from the Argentine mistletoe *Ligaria cuneifolia*". *Journal of Ethnopharmacology* 85(1): 81-92.
- Ferrero M, Crosetti D, Dominighini A, de Luján Alvarez M, Ronco MT, Wagner ML, Gurni A, Carnovale C, Luquita A. (2007). "Effect of the vehicle polyvinylpyrrolidone and the Methanolic Fraction of *Ligaria cuneifolia* (Argentine Mistletoe) extract on hemorheological properties and biliary secretion in rats" 36(2): 95-104.
- Feuer S, Kuijt J. (1978). "Fine structure of mistletoe pollen. *Eremolepidaceae*, *Lepidoceras* and *Tupeia*". *Can. J. Bot.* 56: 2853-2864
- Font Quer P. (1992). *Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado*. Labor, 13ª Edición, Barcelona. 136-139.
- Fossen T, Andersen Ø. (2006) "Spectroscopic Techniques Applied to Flavonoids" en Andersen Ø, Markham K, *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Cap 2. Taylor and Francis Group. EE.UU. 37-142.

- Fusco M, Petenatti E, Inostroza N, San-Martín A, Rivera P. (2004) “Principios activos de la *Ligaria cuneifolia*. Una planta Medicinal”. *Ciencia y Trabajo* 6(12): 79-82.
- Fraga C, Leibovitz B, Tappel A. (1998). “Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes”. *Free Radical Biology & Medicine*, 4, 155-161.
- Gaultier R, Chevallier J. (1907). “Action physiologique du Gui (*Viscum album*)” *Acad. Des Sci. Comp. Rend [Paris]* 145: 941 – 942.
- González Torres DM. (1992). *Catálogo de Plantas medicinales (y alimenticias útiles) usadas en Paraguay*. Asunción, Paraguay. 299.
- Gotti R. (2011). “Capillary electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55: 775–801.
- Guo M, Song F, Liu Z, Liu S. (2004). “Characterization of non-covalent complexes of rutin with cyclodextrins by electrospray ionization tandem mass spectrometry” *Journal of Mass Spectrometry* 39: 594–599.
- Grieve M. “Mistletoe” [en línea] [Consulta: 28/06/2015]
<<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/m/mistle40.html>>
- Haas K, Bauer M, Wollenweber E. (2003). “Cuticular waxes and flavonol aglycones of mistletoes”. *Zeitschrift für Naturforschung* 58c: 464-470.
- Halliwell B. (1990). “How to characterise a biological antioxidant”. *Free Radical Research Community* 9: 1-32.
- Halliwell B, Gutteridge J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. USA
- Harborne J. (1994). *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman and Hall/CRC. EE.UU.
- Hartwell J. (1982). *Plants used against cancer. A survey*. Quarterman Publications, Massachusetts

- Hawksworth F, Scharpf R. (1984). "Spread of European Mistletoe (*V. album* L.) in California" . *The Golden Bough* 4: 2.
- Helmja K, Vaher M, Gorbatšova J, Kaljurand M. (2007). "Characterization of bioactive compounds contained in vegetables of the Solanaceae family by capillary electrophoresis". *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry* 56 (4): 172–186.
- Helmja K, Vaher M, Püsa T, Raudsepp P, Kaljurand M. (2008). "Evaluation of antioxidative capability of the tomato (*Solanumlycopersicum*) skin constituents by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography". *Electrophoresis* 29: 3980–3988.
- Helmja K, Vaher M, Püsa T, Kaljurand M. (2009). "Analysis of the stable free radical scavenging capability of artificial polyphenol mixtures and plant extracts by capillary electrophoresis and liquid chromatography–diode array detection–tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1216: 2417–2423.
- Hieronymus J. (1882). *Plantae diaphoricae florum Argentinae*. Atlántida, Bs. As: 259-262.
- Ho Y, Yu H, Su N. (2012) "Re-examination of chromogenic quantitative assays for determining flavonoid content" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 2674 - 2681.
- Ichihashi M, Ueda M, Budiyanoto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T. (2003). "UV-induced skin damage". *Toxicology*, 189, 21-39.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Guía de Calidad: Q2 (R1). <<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>> [Consulta en línea: 15/5/2014].
- Ikan R. (1991). *Natural products: A laboratory guide*. Academic Press, EE.UU.
- Isaaq H, Atamna I, Muschik G, Janini, J. (1991). "The effect of electric field strength, buffer type and concentration on separation parameters en capillary zone electrophoresis" *Chromatographia* 32(3): 155-161.

- Ishihama Y, Oda Y, Asakawa N. (1994). "Microscale determination of dissociation constants of multivalent pharmaceutical by CE" *Journal of Pharmaceutical Science* 83: 1500-1507.
- Isobe T, Kanazawa K, Fujimura M, Noda Y. (1981). "Flavonoids of *Polygonum sieboldi* and *P. filiforme*". *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 54: 3239.
- Iwagawa T, Kawasaki J, Hase T, Sako S, Ōkubo T, Ishida M, Kim M. "An acylated flavonol glycoside from *Lasiobema japonica*". (1990). *Phytochemistry* 29(3): 1013-1014.
- Jáč P, Polášek M, Pospíšilová M. (2006). "Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40: 805–814.
- Janini G, Issaq J. (1993). "The buffer in Capillary electrophoresis" en Guzman N. (ed) *Capillary Electrophoresis Technology*. Cap 4. Marcel Dekker NY. 119-161.
- Johansen D. (1940). *Plant microtechnique*. Mc Graw -Hill, N.Y. 15-94/182-203.
- Jorgenson J, Luckacs K. (1981). "Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries" *Analytical Chemistry*, 56: 111-113.
- Jullian C, Miranda S, Zapata-Torres G, Mendizábal F, Olea-Azar C. (2007). "Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+) catechin by NMR and molecular modeling" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15: 3217-3224.
- Karger B, Foret F. (1993). "Capillary electrophoresis: Introduction and Assessment". en Guzman N. (ed) *Capillary Electrophoresis Technology*. Cap 1. Marcel Dekker NY. 3-64.
- Katsuta S, Saitoh K. (1997). "Control of separation selectivity in micellar electrokinetic chromatography by modification of the micellar phase with solubilized organic compounds". *Journal of Chromatography A* 780: 323-329.
- Kim Y, Jang D, Park S, Yun J, Min B, Min K, Lee H. (2000). "Flavonol glycoside gallates and ferulate esters from *Persicaria lapathifolia* as inhibitors of superoxide production in human monocytes stimulated by unopsonized zymosan". *Planta Medica* 66: 72-74.

- Kim Y, Jung E, Seo S, Park K, Lee M, Lee C. (2013). "Quercetin-3-O-(2''-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside prevents TRAIL-induced apoptosis in human keratinocytes by suppressing the caspase-8- and Bid-pathways and the mitochondrial pathway". *Chemico-Biological Interactions* 204: 144–152.
- Kočevar N, Glavač I, Injac R, Kreft S. (2008). "Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *Achillea millefolium*" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 46: 609-614.
- Kraak J, Busch J, Poppe H. (1992). "Study of protein-drug binding using CE". *Journal of Chromatography A* 608, 257-26.
- Kremer B. (1978). "Improved method for the thin-layer chromatographic identification of alditols" *Journal Chromatography* 166(1): 355-357.
- Kuijt J. (1988). "Monograph of the Eremolepidaceae". *Syst. Bot. Monograph.*, Amer. Soc. Plant Tax. 18: 1-60.
- Lee I, Boyce M, Breadmore M. (2012). "Extraction and on-line concentration of flavonoids in *Brassica oleracea* by capillary electrophoresis using large volume sample stacking". *Food Chemistry* 133(1): 205–211.
- Lee C, Jeong E, Kim Y, Lee M, Seo S, Park K, Lee M. (2013). "Quercetin-3-O-(2''-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside inhibits TNF- α -activated NF- κ B-induced inflammatory mediator production by suppressing ERK activation". *International Immunopharmacology* 16: 481–487.
- Liao S, Zhang L, Wang Z, Sun F, Li Y, Wang A, Huang Y, Lan, Y, Wang Y. (2012). "Electrospray ionization and collision-induced dissociation tandem mass spectrometric discrimination of polyphenolic glycosides: exact acylation site determination of the O-acylated monosaccharide residues". *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26, 2483–2492.
- Liao S, Zhang L, Sun F, Wang Z, He X, Wang A, Li Y, Huang Y, Lan Y, Zhang B, Wang Y. (2013). "Identification and Characterisation of Phenolics in *Polygonum capitatum* by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry" *Phytochemical Analysis* 24(6): 565-568.

- Liao S, Zhang L, Sun F, Wang Z, He X, Wang A, Li Y, Huang Y, Lan Y, Zhang B, Wang Y. (2014). "Differentiation of Isomeric Polyphenolic Glycosides that possess regioisomeric acylated monosaccharide residues by Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry" *Spectroscopy Letters* 47: 19-23.
- Lin W, Deng Z, Lei H, Fu H, Li J. (2002). "Polyphenolic compounds from the leaves of *Koelreuteria paniculata* Laxm". *Journal of Asian Natural Product Research* 4: 287–295.
- Lissi E, Cáceres T, Videla L. (1986). "Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation" *Free Radical Biology & Medicine* 2: 63-69.
- Liu Y, Li W, Ling X, Lai X, Li Y, Zhang Q, Zhao Y. (2008). "Simultaneous Determination of the Active Ingredients in *Abelmoschus manihot* (L.) Medicus by CZE" *Chromatographia* 67(9), 819–823.
- Llesuy S, Evelson P, González-Flecha B, Peralta J, Carreras M, Poderoso J, Boveris A. (1994). "Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome" *Free Radical Biology & Medicine* 16: 445-451.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. (1951) "Protein measurement with Folin phenol reagent" *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lu R, Hu F, Xiao T. (2010). "Activity-Guided Isolation and Identification of Radical Scavenging Components in Gao-Cha Tea" *Journal of Food Science* 75(8): 239-243.
- Lucangioli S, Carducci C., Scioscia S, Carlucci A, Bregni C, Kenndler E. (2003). "Comparison of the retention characteristics of different pseudostationary phases for microemulsion and micellar electrokinetic chromatography of betamethasone and derivatives". *Electrophoresis* 24 (6): 984-991
- Luczkiewicz M, Cisowski W, Kaiser P, Ochocka R, Piotrowski A. (2001). "Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts". *Acta Poloniae Pharmaceutica* 58: 373-379.
- Luo M, Lu H, Ma H, Zhao L, Liu X, Jiang S. (2007). "Separation and determination of flavonoids in *Lamiophlomis rotata* by capillary electrophoresis using borate as

electrolyte” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44(4): 881–886.

Ma Y, Van den Heuvel H, Claeys M. (1999). “Characterization of 3-methoxyflavones using fast-atom bombardment and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry” *Rapid communications in mass spectrometry* 13(19): 1932-1942.

Mabry T, Markham K, Thomas M. (1970). *The systematic identification of the flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin and New York, New York, USA.

Makkar H. (1993). “Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61: 161 – 165.

Maldacker J. (2006). “Preclinical investigations with mistletoe (*Viscum album* L.) extract Iscador”. *Arzneimittel forschung* 56(6A): 497-507.

Marchart E, Kopp B. (2003a). “Capillary electrophoretic separation and quantification of flavone-O- and C-glycosides in *Achillea setacea* W. et K” *Journal of Chromatography B* 792: 363-368.

Marchart E, Krenn L, Kopp B. (2003b). “Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis” *Planta Medica* 69: 452-456.

Markale J. (1989). *Druidas. Tradiciones y dioses de los celtas*. Taurus Humanidades. Madrid. 148-158.

Markham K. (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London, UK.

Marsh A, Clark B, Broderick M, Power J y col. (2004). “Recent advances in microemulsion electrokinetic chromatography”. *Electrophoresis*, 25: 3970-3980.

Marzocca A. (1997). *Vademécum de malezas medicinales de la Argentina, indígenas y exóticas*. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, pp. 165-166

Masselter S, Zemann A. (1995). “Influence of organic solvents in coelectroosmotic capillary electrophoresis of phenols.” *Analytical Chemistry* 67(6): 1047-1053.

- Matthijs N, Van Hemelrycka S, Maftouhb M, Sandy Mohamed, Massarta D, Heydena Y. (2004). "Electrophoretic separation strategy for chiral pharmaceuticals using highly-sulfated and neutral cyclodextrins based dual selector systems" *Analytica Chimica Acta* 525: 247–263.
- McGhie, T. (1993). "Analysis of sugarcane flavonoids by capillary zone electrophoresis (CZE)" *Journal of Chromatography* 634: 701-772.
- McGhie T, Markham K. (1994) "Separation of flavonols by capillary electrophoresis: the effect of structure on electrophoretic mobility" *Phytochemical Analysis* 5(3): 121-126.
- Moharram F, Marzouk M, Ibrahim M, Mabry T. (2006). "Antioxidant galloylated flavonol glycosides from *Calliandra haematocephala*" *Natural Product Research* 20(10): 927-934.
- Morin Ph, Villard F, Dreux M. (1993a). "I. Separation of flavonoid-7-O-glycosides differing in their flavonoid aglycone" *Journal of Chromatography* 628: 153-160.
- Morin Ph, Villard F, Dreux M. (1993b). "II. Separation of flavonoid-3-O-glycosides differing in the sugar moiety" *Journal of Chromatography* 628: 161-169.
- Morin Ph, Archambault J, André P, Dreux M, Gaydouc E. (1997). "Separation of hydroxylated and methoxylated flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. Determination of analyte partition coefficients between aqueous and sodium dodecyl sulfate micellar phases" *Journal of Chromatography A*, 791: 289–297.
- Mrestani Y, Neubert A, Munk M, Wiese J. (1998). "Determination of dissociation constants of cephalosporins by CE" *Journal Chromatography A* 803: 257-264.
- Mrestani Y, Neubert R. (2001). "Characterization of micellar solubilization of antibiotics using MEKC" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26 (5-6): 885-891.
- Mrestani Y, Claussen S, Neubert R. (2002). "Determination of CMV of sodium glucorticoides hemisuccinates by CE" *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 30: 869-873.

- Nájera M. (1983). “La Herboristería en la República Argentina”. *Acta Farm. Bonaerense* 2(1): 55-59.
- Nakagawa T. (1981). “A suggestion to those who are interested in solubilization phenomena” *Chemical Society Japan* 6(3).1
- Okamura H, Mimura A, Niwano M, Takahara Y, Yasuda H, Yoshida H. (1993). “Two acylated flavonol glycosides from *Eucalyptus rostrata*”. *Phytochemistry* 33(2): 512-514.
- ÖnayUçar E, Karagöz A, Arda N. (2006). “Antioxidant activity of *Viscum album ssp. album*. *Fitoterapia* 77 (2006) 556–560.
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer E. (2002). “Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (11): 3122–3128.
- Pahlow M. (1985). *El gran libro de las Plantas Medicinales*. Everest, 6ª Ed., León, 265-266.
- Parasitic plants [en línea] [Consulta: 16/04/2015] <http://www.botgard.ucla.edu/>
- Paris R, Moysse H. (1981). *Précis de Matière Medicale II*, 12ª Ed., Masson, Paris. 108-110.
- Peng Z, Strack D, Baumert A, Subramaniama R, Goh N, Chia T, Tan S, Chi L. (2003). “Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L”. *Phytochemistry* 62: 219–228
- Pietta P, Mauri P, Rava A, Sabbatini G. (1991). “Application of micellar electrokinetic chromatography to the determination of flavonoid drugs”. *Journal of Chromatography* 549: 367-373.
- Pietta P, Bruno A. (1992). “Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography”. *Journal of Chromatography* 539: 165-170.

- Pietta P, Mauri P, Bruno A, Gordana C. (1994). "Influence of structure on the behaviour of flavonoids in capillary electrophoresis". *Electrophoresis* 15: 1326-1331.
- Pöll E de. (1984). "Contribución al estudio de las Loranthaceae de Guatemala". *Rev. Científica, Fac. Cs. Qcas. y Farmacia, Univ. de S. Carlos de Guatemala* 2 (1): 22-32.
- Porter L, Hrstich L, Chan B. (1986). "The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin" *Phytochemistry* 25: 223-230.
- Poša M, Kevrešan S, Mikov M, Cirin-Novta V, Sârbu C, Kuhajda K. (2007). "Determination of critical micellar concentrations of cholic acid and its keto derivatives" *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 59: 179-183.
- Price KR, Rhodes MJ. (1997). "Analysis of major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis" *Journal of Science Food and Agriculture* 74: 331-339.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. (2003). "Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3273-3279.
- Prior S. (1939). *Mistletoe and Holly. Botany Leaflet 24*. Field Mus. Nat. History, Chicago, 1-30.
- Pryor W, Stanley J, Blair E. (1976). "Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides" *Lipids* 11, 370 - 379.
- Ragonese A, Milano V. (1984) "Vegetales y sustancias tóxicas de la flora Argentina". Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. 2ª Ed. ACME, Bs. As, II Fasc. 8-2. 89-92.
- Ratera E, Ratera M. (1980). *Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular*. Hemisferio Sur, Bs. As. 82-84.

- Reis S, Moutinho C, Matos C, de Castro B, Gameiro P, Lima J. (2004). "Noninvasive methods to determine the critical micelle concentration of some bile acid salts". *Analytical Biochemistry* 334: 117-126.
- Ren Z, Zhang Y, Shi Y. (2009). "Simultaneous determination of nine flavonoids in *Anaphalis margaritacea* by capillary zone electrophoresis" *Talanta* 78(3): 959-963.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids". *Free Radical Biology & Medicine* 20(7): 933-956.
- Ricco R, Agudelo I, Garcés M, Evelson P, Wagner M, Gurni A. (2011) "Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae)". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10 (4): 325-332.
- Rodrigues E, Brentan da Silva D, Rodrigues de Oliveira D, da Silva G. (2009). "DOSY NMR applied to analysis of flavonoid glycosides from *Bidens sulphurea*". *Magnetic resonance in chemistry* 47: 1095–1100.
- Roques J. (1837). *Nouveau Traité des Plantes usuelles* II, Librairie de P. Dufaurt, Paris: 262-264.
- Rudaz S, Calleri E, Geiser L, Cherkaoui S, Prat J, Veuthey J. (2003). "Infinite enantiomeric resolution of basic compounds using highly sulfated cyclodextrin as chiral selector in capillary electrophoresis" *Electrophoresis* 24(15): 2633-41.
- Rufer C, Kulling K. (2006). "Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2926-2931.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri J, Saura-Calixto F. (1998). "A procedure to measure antiradical efficiency of polyphenols" *Journal of Science Food and Agriculture*. 76: 270 – 276.
- Sander C, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele J. (2004). "Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis". *International Journal of Dermatology*, 43, 326-335.

- Sannomiya M, Montoro P, Piacente S, Pizza C, Brito A, Wagner V. (2005). "Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu". *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19: 2244–2250.
- Sannomiya M, Cardoso C, Figueiredo M, Rodrigues C, dos Santos L, dos Santos F, Serpeloni J, Cólus I, Vilegas W, Varanda E. (2007). "Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia*". *Journal of Ethnopharmacology* 112 319–326.
- Sanzin R. (1918). "Sobre el *Loranthus cuneifolius*". *Rev. Chilena de Historia Natural*, 22: 126-129.
- Sawant L, Pandita N, Prabhakar B. (2010). "Determination of gallic acid in *Phyllanthus emblica* Linn. dried fruit powder by HPTLC" *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 2(12): 105 – 108.
- Scarpa G, Montani M. (2011). "Etnobotánica médica de las "ligas" (Loranthaceae *sensu lato*) entre indígenas y criollos de Argentina". *Dominguezia* 27(2): 5-19.
- Schmitt-Kopplin Ph, Hertkorn N, Garrison A, Freitag D, Kettrup A. (1998). "Influence of "Borate Buffers on the Electrophoretic Behavior of Humic Substances in Capillary Zone Electrophoresis" *Analytical Chemistry* 70: 3798-3808.
- Schurig V, Wistuba, D. (1999). "Recent innovations in enantiomer separation by electrochromatography utilizing modified cyclodextrins as stationary phases". *Electrophoresis* 20(12): 2313-2328.
- Seitz U, Oefner P, Nathakarnkitkool S, Bonn G. (1992). "Capillary electrophoretic analysis of flavonoids" *Electrophoresis* 13: 35-38.
- Sepaniak M, Swaile D, Powell A, Cole R. (1992). "Fundamentals of micellar electrokinetic capillary chromatography" en Grossman, P., Colburn J. *Capillary electrophoresis: Theory and practice*. Cap 6. Academic Press. UK: 159-191
- Shahidi F, Wanasundara P. (1992). "Phenolic antioxidants". *Critical Reviews on Food Science Nutrition* 32: 67-103.

- Shaw R, Elliot W, Barisas B. (1991). "Estimation of critical micelle concentrations of bile acids by reversed phase high performance liquid chromatography". *Microchimica Acta* 3: 137-145.
- Siddiqui S, Hafeez F, Begun S, Siddiqui B. (1988). "Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander*" *Journal of Natural Products* 51: 229-233.
- Sies H, Cadenas E. (1985). "Oxidative stress: damage to intact cells and organs". *Philosophical transactions of the Royal Society* B311 617 – 631.
- Soberón J, Sgariglia M, Dip Maderuelo M, Andina M, Sampietro D, Vattuone M. (2014) "Antibacterial activities of *Ligaria cuneifolia* and *Jodina rhombifolia* leaf extracts against phytopathogenic and clinical bacteria". *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118(5): 599-605.
- Subils R. (1984). "Loranthaceae". *Bol. Soc. Arg. Bot.* 23 (176): 121, 264.
- Su-Hsiang F, Ming-Hua Y, Hwei-Mei W, Jiing-Chuan C. (2005) "Analysis of flavonoids in Propolis by Capillary Electrophoresis" *Journal of Food and Drug Analysis* 13 (1): 43-50.
- Taira C, Wagner M y col. (1994). "Estudio farmacológico de un agente vasoactivo presente en *Ligaria cuneifolia* var. *cuneifolia*". *Acta Farm. Bonaerense* 13 (2): 91-95.
- Taira C, Wagner M, Gurni A. (2004). "Pharmacological and Cardiovascular Aspects of *Ligaria cuneifolia* Infusions" *Pharmaceutical Biology* 42(3): 234-239.
- Takhtajan A. (1997). *Diversity and classification of flowering plants*. Columbia University Press, N.Y. 11-19/353-359.
- Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, Tsuuchiya A, Ando T. (1984). "Electrokinetic separations with micellar solutions and open tubular capillaries" *Analytical Chemistry* 56: 111-113.
- Terabe S. (1989). "Electrokinetic Chromatography: and interface between electrophoresis and chromatography". *Trends in Analytical Chemistry*, 81: 129-134.

- The British Pharmaceutical Codex. (1934). The Pharmaceutical Press, 23 Bloomsbury Square, London: p. 1114.
- Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki Y. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing" *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206-221.
- Toursarkissian M. (1980). *Plantas medicinales de la Argentina*. Hemisferio Sur, Bs. As. 79.
- Ulibarri E. (1987). "Loranthaceae" en *Flora ilustrada de entre Ríos (Argentina)*. *Col. Cient. I.N.T.A.*, Buenos Aires, 6(III): 106-121.
- Urbonavičiūtė A, Jakštas V, Kornýšova O, Janulis V, Maruška A. (2006). "Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq) etanolic extracts". *Journal of Chromatography A* 1112: 339-344.
- U.S. Pharmacopeial convention (USP) 37 (2014) Capítulo <621> Chromatography.
- Varela B, Fernández T y col. (2001). "El muérdago criollo, *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. –Loranthaceae-. Desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos". *Dominguezia* 17 (1): 31-50.
- Varela B. (2003). "Anatomía foliar y caulinar comparativa de los muérdagos argentinos. Importancia farmacobotánica. Relación con el muérdago europeo" Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
- Vázquez y Novo S.P, Wagner M. y col. (1989). "Importancia Toxicológica de la presencia de sustancias aminadas en ejemplares de *L. cuneifolia* var. *cuneifolia* colectados en distintas áreas de la República Argentina". *Acta Farm. Bonaerense* 8 (1): 23-29.
- Vicaș S, Prokișch J, Rugină D, Socaciu C. (2009). "Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Activities of Mistletoe (*Viscum album*) as Determined by FRAP Method". *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 37 (2):112-116.
- Vicaș S, Rugină D, Leopold L, Pinteá A, Socaciu C. (2011). "HPLC Fingerprint of Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of *Viscum album* from

Different Host Trees” *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39(1):48-57.

Wagner H, Feil B, Seligmann O, Petricic J, Kavogjera Z. (1986). “Phenylpropanes and lignans of *Viscum album* L. Cardioactive drugs V”. *Planta Medica* 2: 77-162.

Wagner H, Blandt S. (1996). *Plant Drug Analysis*. Springer Verlag, Berlin, 2nd Ed.

Wagner ML. (1993). *Estudios fitoquímicos comparativos de los flavonoides de Loranthaceae de la flora argentina. Relación con el muérdago europeo*. Tesis Doctoral. Fac. Farmacia y Bioquímica, Univ. de Bs. As. 1-255.

Wagner M, Fernández T y col. (1998). “Anatomical, phytochemical and immunochemical studies on *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae)”. *Pharm. Biology* 36 (2): 131-139.

Wallingford R, Ewing A. (1988) “Retention of ionic and non-ionic catechols in capillary zone electrophoresis with micellar solutions” *Journal of Chromatography A* 441(2): 299-309.

Wallinford R, Ewing A. (1989) “Capillary electrophoresis”. *Advances in Chromatography* 29: 1-76.

Wettstein R. (1944). *Tratado de Botánica Sistemática*. Labor, Barcelona. 601-605.

Williams C. (2006). “Flavone and flavonol O-glycosides” en Andersen, Ø., Markham, K., *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Cap 13. Taylor and Francis Group. EE.UU. 749-856.

Wolfender J, Waridel P, Ndjoko K, Hobby KR, Major HJ, Hostettmann K. (2000). “Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSⁿ for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts”. *Analisis* 28(10): 895-906.

Wu X, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior R. (2004). “Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4026-4037.

- Yagi K. (1976). "A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma" *Biochemical Medicine* 15: 212-216.
- Yashima T, Tsuchiya A, Morita O, Terabe S. (1992). "Separation of closely related large peptides by MEKC with inorganic modifiers" *Analytical Chemistry* 64: 2981-2984.
- Yasui H, Hakozaki T, Date A, Yoshii T, Sakurai, H. (2006). "Real-time chemiluminescent imaging and detection of reactive oxygen species generated in the UVB-exposed human skin equivalent model". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347: 83-88.
- Yokozawa T, Chen C, Dong E, Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I. (1998). "Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical". *Biochemical Pharmacology* 56: 213-222.
- Youngken H. (1951). *Tratado de Farmacognosia*. Atlante, México. 365-367.
- Yu Z, Cui M, Yan C, Song F, Liu Z, Liu S. (2007). "Investigation of heptakis (2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin inclusion complexes with flavonoid glycosides by electrospray ionization mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21: 683-690.
- Yue M, Jiang T, Shi Y. (2004). "Fast determination of flavonoids in *Hippophae rhamnoides* and its medicinal preparation by capillary zone electrophoresis using dimethyl- β -cyclodextrin as modifier". *Talanta* 62 (4): 695-699.
- Zampini I, Ordoñez R, Isla M. (2010). "Autographic Assay for the Rapid Detection of Antioxidant Capacity of Liquid and Semi-solid Pharmaceutical Formulations Using ABTS^{•+} Immobilized by Gel Entrapment". *AAPS PharmSciTech* 11(3): 1159-1163.
- Zhang Y, Zhao L, Shi Y. (2007). "Separation and determination of flavonoids in *Ixeridium gracile* by capillary electrophoresis" *Journal of chromatographic science* 45(9): 600-4.
- Zhang S, Dong S, Chi L, He P, Wang Q, Fang Y. (2008). "Simultaneous determination of flavonoids in chrysanthemum by capillary zone electrophoresis with running buffer modifiers". *Talanta* 76: 780-784.