



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y
NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Tesis para acceder al título de Doctor
en Ciencias Químicas

**CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MEDICAMENTOS NO
CONTAMINANTES PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
APÍCOLAS**

Lic. Tonello Natalia Verónica

DIRECTOR: Dr. Juan Miguel Marioli

CODIRECTOR: Dra. Fabiana D'Eramo

Río Cuarto, Marzo 2019

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Nombre y Apellido:..... Lugar de trabajo:.....

Firma: Aclaración:.....

Nombre y Apellido:..... Lugar de trabajo:.....

Firma:..... Aclaración:.....

Nombre y Apellido:..... Lugar de trabajo:.....

Firma:..... Aclaración:.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha:.....

Calificación:.....

A mi familia y a mi Argentina

AGRADECIMIENTOS

Si bien mi primer idea luego de recibirme de la carrera de grado, era retirarme del sistema académico y que de hecho lo intenté, por alguna razón la vida me condujo nuevamente a la vida universitaria con una beca doctoral, hecho que agradezco profundamente a Dios y al Universo ya que me pasaron cosas que jamás planeé y que me hicieron muy feliz en este camino.

Quiero agradecer a las personas que hicieron posible este camino, primero a Fabiana D'Eramo mi co-directora que me contacto para que pidiéramos la beca, a Juan Miguel Marioli, por ser mi director, y junto con Fabiana escribirme el plan de tesis.

A CONICET, por otorgarme la beca haciendo posible este camino, que además de permitirme seguir formándome, fue mi sustento económico por 5 años.

Quiero agradecer a Alberto Escarpa de la Universidad de Alcalá por abrirme las puertas de su universidad donde aprendí y me continué perfeccionando. A Agustín Gonzales, por ser mi mentor en esa estancia de 6 meses realizada en dicha universidad.

A Carina Caseros y Viviana Nicotra de la Universidad Nacional de Córdoba que me ayudaron a finalizar la tesis debido a su gran experiencia en el tema.

Y no puedo dejar de nombrar a mi familia y amigos por ser mi contención emocional siempre, en todo momento.

Gracias Mamá, Papá, Alina, Favio, a mis amigos: Belu, Sole, Nahir, Hugo, Flor, Lina, Caro.W, Mari, Vero, Mile, Lore.T, Airam y a todos mis compañeros del Gran Becario.

Gracias de corazón

RESUMEN

La actividad apícola es una economía regional que puede potenciar el desarrollo de zonas que han quedado postergadas por el avance de la actividad agropecuaria. Los beneficios para las zonas de producción son múltiples, destacándose la posibilidad de desarrollar una actividad económica que preserva ambientes y biodiversidad

Las abejas son las protagonistas de la cadena apícola, pero el hombre tiene también una activa participación ya que interviene ayudando a la abeja a concentrar la producción en colmenas que están protegidas con estructuras de madera, también le otorga adecuado alimento, las posiciona en un entorno favorable y asegura su genética y sanidad para hacer más eficiente la producción.

El principal desafío que enfrentan los apicultores es poder mantener el estado sanitario de las colmenas, sin que éstas se contaminen. Este sector se ve afectado por diferentes patologías entre las que se encuentran, principalmente, la Varroasis (ocasionada por un ácaro) y Loque Americana (una enfermedad bacteriana producida por un bacilo denominado *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*)). Para el control de las mismas los apicultores emplean productos químicos sintéticos, sin embargo, el uso irracional e indiscriminado de estos productos implica un riesgo elevado de contaminación para los productos de la colmena, que pueden derivar en daños a la salud humana y en problemas de comercialización. En la búsqueda de alternativas para poder controlar estas enfermedades a fin de minimizar las desventajas que implican el uso de medicamentos sintéticos, se han diseñado nuevos métodos de control para las enfermedades antes mencionadas mediante el uso de productos sanitarios y nutricionales más naturales y efectivos. En este sentido, el uso de aceites esenciales (AEs) y de extractos de vegetales (EVs) ha ganado popularidad e interés científico en estos últimos años. Desde el punto de vista científico, las investigaciones se desarrollan principalmente en la búsqueda de sustancias activas para el control de microorganismos patógenos, ya que muchos de ellos se han vuelto resistentes a los medicamentos. Así, se ha estudiado la actividad antimicrobiana de decocciones, de infusiones, de EVs y de AEs de diferentes especies vegetales que demostraron ser efectivas contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos.

ABSTRACT

The beekeeping activity is a regional economy that can promote the development of areas that have been postponed due to the advance of agricultural activity. The benefits for the zones of production are multiple, besides the creation of employment and the generation of income, the possibility of developing an economic activity that preserves environments and biodiversity stands out.

The bees are the protagonists of the apicultural chain, but the man also has an active participation since he intervenes helping the bee to concentrate the production in beehives that are protected with wooden structures, it also provides adequate food, positions them in a favourable environment and ensures their genetics and health to make production more efficient.

The main challenge that beekeepers face is to be able to maintain the sanitary status of hives, without contaminating them. This sector is affected by different pathologies among which are, the Varroasis (caused by a mite) and Loque Americana (a bacterial disease produced by a bacillus called *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*)). To control them, beekeepers use synthetic chemicals. However, the irrational and indiscriminate use of these products implies a high risk of contamination for the hive products, which can lead to damage to human health and health problems. commercialization.

In the search for alternatives to control these diseases in order to minimize the disadvantages involved in the use of synthetic medicines, new control methods have been designed for the aforementioned diseases through the use of more natural and effective health and nutritional products. The use of essential oils (EOs) and vegetable extracts (VEs) has gained popularity and scientific interest in recent years. The investigations are developed mainly in the search of active substances for the control of pathogenic microorganisms, since many of them have become resistant to the medicines. Thus, the antimicrobial activity of decoctions, infusions, VEs and EOs of different plant species that proved to be effective against Gram-positive, Gram-negative and fungal bacteria has been studied.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
INDICE DE TABLAS	XVII
GLOSARIO	XIX
OBJETIVOS	1
OBJETIVO GENERAL.....	1
OBJETIVOS ESPECIFICOS	1
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	3
1.1 APICULTURA EN LA ARGENTINA	3
1.2 SANIDAD APÍCOLA	8
1.3 PLANTAS MEDICINALES	14
1.3.1 PLANTA MEDICINAL <i>ACHYROCLINE SATUREIODES</i> (LAM.) DC.....	15
1.3.2 PLANTAS MEDICINALES PARA EL CONTROL DE VARROA.....	17
CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO Y METODOLOGÍA	21
2.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS HEXANICOS, PURIFICACION Y CARACTERIZACIÓN QUIMICA DE <i>ACHYROCLINE SATUREIODES</i> (MARCELA DE CAMPO).	21
2.1.1 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.....	21
2.1.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL (EV).....	21
2.1.3 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EHC DE “MARCELA DE CAMPO”	22
2.1.4 AISLAMIENTO DE COMPUESTOS QUÍMICOS DEL EHC	28
2.1.5 TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA LA IDENTIFICACIÓN QUÍMICA	32
2.1.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DEL EHC.	33
2.2 FUNDAMENTOS ELECTROQUIMICOS Y QUIMIOMÉTRICOS UTILIZADOS EN LA DETECCIÓN DE TIMOL, CARVACROL Y EUGENOL EN MIEL.....	36
2.2.1 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS	36
2.2.2 TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS	45
2.3 NANOPARTICULAS DE ORO (AUNPS) PARA LA DETECCION DE TIMOL Y CARVACROL EN ACEITES ESCENCIALES.	51
2.3.1 FORMACION DE AUNPS.....	51
2.3.2 REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA FORMACIÓN DE AUNPS	53
2.3.3 PROCEDIMIENTO UTILIZADO PARA LA FORMACIÓN DE AUNPS	54
2.3.4 INSTRUMENTAL	55

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.1 OBTENCION Y CARCATERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DEL EXTRATCO HEXANICO DE <i>ACHYROCLINE SATUREIOIDES</i>	57
3.1.1 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.....	57
3.1.2 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO HEXANICO COMPLETO (EHC).....	57
3.1.3 ESTUDIO FITOQUIMICO DEL EHC	57
3.1.4 CCD PARA EL ESTUDIO DE SOLVENTES ÓPTIMOS PARA LA SEPARACIÓN DE COMPUESTOS DEL EHC.	59
3.1.5 SEPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA FH POR CCF.....	60
3.1.6 PURIFICACIÓN DE LAS BANDAS OBTENIDAS POR CCF.....	63
3.1.7 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS DEL EH DE “MARCELA DE CAMPO”	66
3.1.8 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS PUROS DE LOS EHC DE <i>ACHYROCLINE SATUREIOIDES</i>	79
3.2 ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE TIMOL, CARVACROL Y EUGENOL PARA SU DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA EN MIEL, UTILIZANDO COMO HERRAMIENTA COMPLEMENTARIA LA QUIMIOMETRÍA	82
3.2.1 ESTUDIO POR VOLTAMPEROMETRÍA CICLICA	83
3.2.2 VOLTAMPEROMETRÍA DE ONDA CUADRADA	91
3.2.3 QUIMIOMETRÍA.....	92
3.3 DETERMINACION COLORIMÉTRICA DE TIMOL Y CARVACROL EN ACEITES ESCENCIALES, LIBRE DE EXTRACCION, MEDIANTE LA FORMACIÓN DE NANOPARTICULAS DE ORO DEPENDIENTES DEL PH	102
3.3.1 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE TIMOL Y CARVACROL PARA FORMAR NANOPARTICULAS DE ORO.	103
3.3.2 DETERMINACIÓN TOTAL Y CUANTIFICACIÓN DIFERENCIAL DE TI Y CA EN ACEITES ESENCIALES.....	107
CAPÍTULO 4: CONCLUSIÓN	111
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución De Las Colmenas En Argentina	3
Figura 2: Abeja <i>Apis Mellifera</i>	5
Figura 3: Larvas Infeccionadas Luego De Ser Operculadas	11
Figura 4: Ácaro ectoparásito <i>Varroa destructor</i>	12
Figura 5: Abejas adultas y larvas infectadas con el ácaro.....	12
Figura 6: <i>Achyrocline Satureioides</i> – “Marcela De Campo”	16
Figura 7: Cafeína	23
Figura 8: Estructuras de la flavanonas (R=H) y flavanones (R=OH), las cuales poseen el núcleo de la benzopirona	26
Figura 9: Reacción De La Leucoanticianidina Con Ácido Clorhídrico.....	26
Figura 10: Estructura Lawsona.....	27
Figura 11: Ácido Gálico	28
Figura 12: Armado de la columna de cromatografía Flash (CCF).....	30
Figura 13: A) Señal de potencial de excitación utilizada en voltamperometría cíclica. B) Voltamperograma cíclico típico de un proceso redox reversible.....	38
Figura 14: Voltamperogramas cíclicos para procesos redox. A) irreversibles y B) cuasi-reversibles.	40
Figura 15: Programa De Saltos De Potencial Aplicado Al Electrodo De Trabajo En Un Experimento De VOC. ΔE_{oc} : Amplitud De La Onda Cuadrada, ΔE_e : Salto De Escalera,	42
Figura 16: Voltamperograma de onda cuadrada para una transferencia electrónica reversible con corrientes adimensionales directas I_d , inversa I_i y neta I_n normalizadas.....	43
Figura 17: Elementos básicos de una neurona artificial	47
Figura 18: Estabilización de las AuNPs por el citrato de sodio a través de fuerzas electrostáticas. el citrato que se encuentre en exceso después de la reacción, se adsorbe en la superficie de la nanopartícula, manteniendo la dispersión debido a las fuerzas de repulsión entre sí y a las de atracción hacia el ión Na^+	52
Figura 19: esquema de los posibles mecanismos de reacción que puede seguir la formación de nanopartículas de oro por reducción con citrato de sodio, de acuerdo al pH.....	53
Figura 20: Reacción De Cianidina (a) Y Reaccion De Leucoanticianidina (b).....	58
Figura 21: Reacción De Precipitación Para El Reconocimiento De Taninos	59

Figura 22: Reacción De Bomtrager-Krauss	59
Figura 23: Bandas Observadas En CCD De EHC	60
Figura 24: Columna cromatográfica.....	61
Figura 25: Perfil de las bandas obtenidas por CCF del EHC con sus respectivos Rf.	62
Figura 26: Cromatografía preparativa para las fracciones 1 y 5.....	64
Figura 27: Cromatografía centrífuga radial.....	65
Figura 28: CCF para 100 mg de extracto.....	66
Figura 29: espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) de la Fracción 1	67
Figura 30: Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3) de la Fracción 1.	67
Figura 31: Compuesto 1.....	70
Figura 32: Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) Fracción 5	70
Figura 33: Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3) Fracción 5	71
Figura 34: Gnafaliina(Compuesto 2).....	72
Figura 35: Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) del compuesto 3.....	73
Figura 36: Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3) del compuesto 3.....	73
Figura 37: Compuesto 3.....	76
Figura 38: Espectro de ^1H -RMN (CD_3OD) del compuesto 4.....	76
Figura 39: Espectro de ^{13}C -RMN (Metanol) del compuesto 4.	77
Figura 40: Compuesto 4.....	79
Figura 41: CIM de los compuestos a) 1 y b) 2	80
Figura 42: CBM de los compuestos a) 1 y b) 2	80
Figura 43: CIM de los compuestos a) 3 y b) 4	81
Figura 44: CBM de los compuestos a) 3 y b) 4	81
Figura 45: Estructura química de TI, CA y EU	83
Figura 46: Voltamperogramas cíclicos a una concentración de 1×10^{-4} M, velocidad 50 mVs^{-1} , $\text{pH}=10$ y Temperatura de 20°C para a) EU b) CA y c) TI.....	84
Figura 47: Mecanismo de electrooxidación del fenol	85

Figura 48: Grafica de la relación de la E_p e I_p con el pH respectivamente	87
Figura 49: Gráficos de I_p vs $v^{1/2}$ para TI, CA y EU a tres concentraciones diferentes $0,5 \times 10^{-4}$ M, 1×10^{-4} M Y 2×10^{-4} M.	88
Figura 50: Grafica de Ψ vs $v^{1/2}$ de TI, CA y EU para diferentes concentraciones: $0,5 \times 10^{-4}$ M, 1×10^{-4} M y 2×10^{-4} M.	89
Figura 51: grafica de $\ln(I_p)$ vs $\ln(C)$ para EU, CA y TI. Velocidad de barrido $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Las concentraciones se variaron desde 8×10^{-7} M a 2×10^{-4} M.	90
Figura 52: Grafica de VC para EU, CA y TI, concentración 1×10^{-4} M, pH=10 y $v = 0,1 \text{ vs}^{-1}$	91
Figura 53: Voltaperogramas de onda cuadrada para TI, CA y EU en solución reguladora de pH= 10. Concentración de los analitos $3,66 \times 10^{-5}$ M.	91
Figura 54: Grafica de los diecisiete voltamperogramas de OC del modelo de calibración con la correspondiente corrección por líneas de base.	94
Figura 55: Grafica de los diecisiete voltamperogramas de OC del modelo de calibración con la correspondiente corrección alineación.	95
Figura 56: Voltamperogramas de OC del conjunto de validación. línea de base corregida y datos alineados.	95
Figura 57: Región elíptica de confianza del conjunto de validación por PLS-1, para 1) EU, 2) TI y 3) CA, respectivamente, (▼) es el punto ideal.	97
Figura 58: Región elíptica de confianza del conjunto de calibración por RNA, para 1) EU, 2) TI y 3) CA, respectivamente, (▼) es el punto ideal.	98
Figura 59: Región elíptica de confianza del conjunto de validación por RNA, para 1) EU, 2) TI y 3) CAR, respectivamente, (▼) es el punto ideal.	99
Figura 60: Voltamperogramas de las soluciones descritas en la Tabla 23 luego de corregir la línea de base de cada una. C1: 1, C2:2, C3: 3, C4: 4, C5:5	101
Figura 61: Espectro de absorbancia $0,25 \text{ mM}$ a) CA y a) TI. línea negra: solución a pH=8; línea roja solución a pH=9; línea azul solución a pH=10; línea verde solución a pH=11; línea rosa solución a pH= 12.	103
Figura 62: Banda de absorción característica de AuNPs a 500 nm sólo para CA, cambio de color en la solución coloidal de CA y caracterización por TEM: CA (c);TI (d) y blanco (e) (pH=9, $0,25 \text{ mm}$).....	104
Figura 63: Banda de absorción característica de AuNPs a 500 nm para TI y CA, cambio de color en la solución coloidal de ambos analitos y caracterización por TEM: CA (c); TI (d) y blanco (e) (pH=12, $0,1 \text{ mm}$)	105
Figura 64: Voltagramas cíclicos de TI y CA a) pH=9, b) pH= 12. Velocidad de barrido: 50 mV/s	106
Figura 65: Curvas de calibración a pH=9 y 12. Las medidas de absorbancia fueron medidas a 550 nm	107

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación De los Plaguicidas.....	7
Tabla 2: Actividad antibiótica de la planta marcela de campo.....	17
Tabla 3 Resultados del análisis fitoquímico preliminar de la fracción hexánica.....	58
Tabla 4 Resultados de los ΔR_f	60
Tabla 5: Rendimientos de cada mezcla obtenida.....	62
Tabla 6: Técnicas cromatograficas para cada mezcla de bandas obtenidas por CCF del extracto total.....	63
Tabla 7: Datos de RMN ($CDCl_3$) Fracción 1.....	68
Tabla 8: Datos de RMN ($CDCl_3$) Fracción 5.....	71
Tabla 9: Datos de RMN ($CDCl_3$) del compuesto 3.....	74
Tabla 10: Datos de RMN del compuesto 4.....	78
Tabla 11: CIM YCBM.....	82
Tabla 12: Optimización de los parámetros para VOC.....	92
Tabla 13: Conjunto de calibración de mezclas ternarias.....	92
Tabla 14: Conjunto de calibración de mezclas binarias.....	93
Tabla 15: Conjunto de calibración de moléculas individuales.....	93
Tabla 16: Conjunto De Validación.....	94
Tabla 17: Resultados Para El Conjunto De Validación.....	96
Tabla 18: Parámetros optimizados.....	97
Tabla 19: Errores estimados.....	98
Tabla 20.....	98
Tabla 21: Errores Estimados.....	99
Tabla 22: Límites de detección y cuantificación.....	99
Tabla 23: Evaluación de efecto matriz. mezclas ternarias.....	100

Tabla 24: Resultados obtenidos en la determinación de EU, TI y CA en muestra de miel diluídas al 15% en solución reguladora de fosfato a pH=10.....	101
Tabla 25: Errores Obtenidos	102
Tabla 26: cuantificación diferencial de TI y CA en AE de Tomillo y Orégano	108
Tabla 27: Desviación Estándar Y Estándar Porcentual-	109

GLOSARIO

- (¹³CRMN) Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
- (¹HRMN) Resonancia Magnética Nuclear de protón
- (AE) Aceite Esencial
- (AuNPs) Nanopartículas De Oro
- (CA) Carvacrol
- (CBM) Concentración Bactericida Mínima
- (CCD) Cromatografía De Capa Delgada
- (CCF) Cromatografía De Columna Flash
- (CCR) Cromatografía Centrífuga Radial
- (CDCl₃) Cloroformo Deuterado
- (CIM) Concentración Inhibitoria Mínima
- (CV) Carbón Vítreo
- (DO) Densidad Óptica
- (EA) Extracto Acuoso
- (EHC) Extracto Hexánico Completo
- (EHA) Extracto Hidroalcoholico
- (EQE) Mecanismo Electroquímico Químico Electroquímico
- (EU) Eugenol
- (EV) Extracto Vegetal
- (FAO) Organización para la Agricultura y la Alimentación de la Naciones Unidas
- (FIA) Análisis Por Inyección De Flujo
- (HPLC) Cromatografía De Líquidos De Alta Eficiencia
- (INDEC) Instituto Nacional De Estadística Y Censo
- (INTA) Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria
- (LA) Loque Americana
- (OC) Onda Cuadrada
- (OMS) La Organización Mundial de la Salud

(PLS-1) Método de cuadrados mínimos parciales
(REP%) Errores Relativos Porcentuales
(RMSE) Error Cuadrático Medio
(RNA) Redes neuronales artificiales
(SDC) Síndrome De Despoblamiento De Colmena
(SPR) Resonancia De Plasmón Superficial
(TEM) Microscopio Electrónico De Transmisión
(TI) Timol
(TMS) Tetrametilsilano
(UV-VISIBLE) Espectrometría Ultravioleta Visible
(VC) Voltamperometría Cíclica
(VOC) Voltamperometría De Onda Cuadrada

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Incrementar el conocimiento básico sobre nuevos medicamentos no contaminantes con potencial actividad antimicrobiana, provenientes de aceites esenciales o extractos de vegetales, para emplearlos en colmenas de abejas como estrategia para minimizar el procesamiento de la miel.

El avance en este proyecto permitirá realizar una contribución en el campo del desarrollo de nuevos compuestos con potencial actividad antimicrobiana, específicamente, en lo que a caracterización y desarrollo de metodologías analíticas de éstos se refiere.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar químicamente los compuestos activos contra *Paenibacillus larvae* presentes en extractos obtenidos de *Achyrocline satureioides* (Marcela del campo).
- Desarrollar metodologías analíticas para cuantificar compuestos naturales activos contra *Varroa jacobsoni* en miel.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 APICULTURA EN LA ARGENTINA

La actividad apícola es una economía regional que puede potenciar el desarrollo de zonas que han quedado postergadas por el avance de la actividad agropecuaria. Los beneficios para las zonas de producción son múltiples, además de la creación de empleo y la generación de ingresos, se destaca la posibilidad de desarrollar una actividad económica que preserva ambientes y biodiversidad. Los principales productores de miel del mundo son China, Turquía, Ucrania, Estados Unidos y Argentina. China lidera la exportación y Argentina lo secunda¹.

En la Argentina, actualmente, unos 25.000 productores apícolas trabajan con alrededor de tres millones de colmenas, siendo el país que contiene la mayor cantidad de ellas del Hemisferio Sur. Las colmenas se ubican principalmente en las provincias que conforman la región de la Pampa Húmeda. Casi el 50% del total de colmenas están en la provincia de Buenos Aires, otro 35% se reparte entre las provincias de Córdoba, Santa Fe, La Pampa y Entre Ríos, y el 15% restante se distribuye en el resto del territorio nacional (Figura 1). Con excepción de Tierra del Fuego, todas las provincias argentinas explotan colmenas comercialmente².

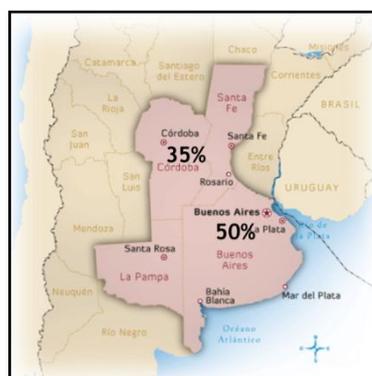


Figura 1: Distribución De Las Colmenas En Argentina

Además, la cadena apícola sostiene económicamente a casi 100 mil familias, entre productores y otros actores vinculados a la comercialización de estos productos e insumos, y representa una de las principales actividades para la agricultura familiar y las economías regionales.

Durante el 2013, los principales compradores de miel de ala Argentina fueron Estados Unidos, con 43.331 toneladas (67%); Alemania, con 5.509 toneladas (8,5%); Japón, con 3.493 toneladas (5,4%); Arabia Saudita, con 2.164 toneladas (3,7%); Canadá, con 2.058 toneladas (3,2%); Italia, con 1.366 toneladas (2,12%); e Indonesia, con 1.139 toneladas (1,7%).

La provincia de Córdoba es la tercera provincia productora de miel del país, y según el INDEC (Instituto Nacional de Estadística y Censo), Córdoba exportó unas 5.500 toneladas de miel en 2015 y según estadísticas de la Agencia Pro-Córdoba, las exportaciones de miel representaron el 0,25% de las exportaciones provinciales (33° lugar del ranking) y el 1,23% de las exportaciones de la industria alimenticia².

La producción de miel de esta provincia ha ido cambiando a partir del avance de la agricultura y los cambios en la ganadería. Tiempo atrás la actividad se concentraba en el sur y sureste de la provincia en la zona ganadera donde la productividad por colmena era muy buena respecto a la que podía lograrse en la región norte. Con el transcurso de los años la actividad se fue moviendo hacia el noroeste de Córdoba, a la región fitogeográfica chaqueña, que por la biodiversidad del monte nativo es zona ideal para que las abejas encuentren alimento y puedan producir miel². La actividad encontró un ambiente propicio para su desarrollo en estos ecosistemas. Según un informe del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) en su artículo “Apicultura en el noroeste de Córdoba³, la mayoría de los apiarios que se ubican en esta región se encuentran en una superficie de 2,3 millones de hectáreas. Los riesgos más comunes en la zona, son las altas temperaturas, que pueden derretir la cera, los vientos, que pueden disminuir las floraciones de algunas especies como la del algarrobo, y las lluvias en las cuencas que han sido desmontadas².

La región chaqueña tiene gran potencialidad para la apicultura en la medida que se cumpla con la protección de bosques que define la legislación (nacional y provincial) para las zonas “rojas”, territorios que deben preservarse y donde se exige conservación estricta de la flora autóctona.

En cuanto al tipo de abeja que produce la miel en Argentina, este trabajo es llevado a cabo por la abeja *Apis mellifera*, que es conocida como la abeja doméstica y es una especie de himenóptero apócrito de la familia Apidae y género *Apis*, se encuentra originalmente en zonas tropicales de Europa (Zona Mediterránea) y África, de la que se extendió al resto del mundo (Asia y América) (Figura 2)^{4,5}.



Figura 2: Abeja *Apis mellifera*

En una colonia de abejas *Apis mellifera* se pueden encontrar la abeja reina, los zánganos y las obreras, cada una de ellas con una labor determinada:

La reina: Su principal tarea es la de poner huevos y son las obreras las encargadas de alimentarla. Ellas alimentan esta larva con jalea real, lo que hace que sea fértil y se diferencie de las obreras normales. Sólo subsiste una reina por cada colmena. Días después de su nacimiento, la reina sale al exterior para ser fecundada por los zánganos para que nazcan nuevas obreras, tareas exclusiva de la reina en una colmena. La vida de una reina puede ser de hasta 5 años, aunque normalmente se sustituyen de forma natural a los dos o tres años.

Los zánganos: nacen de huevos de la reina sin fecundar, y sus funciones, aparte de fecundar a la reina son bastante discutidas, pero se piensa que ayudan a mantener el calor en la colmena, y también repartirían el néctar.

Las obreras: son las verdaderas trabajadoras de la colmena; desde que nace una obrera, pasa por distintas tareas dentro de la colmena: hacer cera, limpiar, alimentar, guardianas, y por último pecorear. Las cereras hacen y retocan las celdillas; las alimentadoras dan de comer a las larvas y a la reina, las limpiadoras libran de restos la colmena; las guardianas son las encargadas de la protección, y las pecoreadoras son las que salen a recoger néctar y polen de las flores, y agua. Una obrera puede volar a unos 3 km de distancia, aunque normalmente no se alejan más de 1 km en busca de flores. Cuando una abeja encuentra un buen lugar para pecorear, vuelve a la colmena y mediante una danza avisa a las demás de la posición y distancia que se encuentra⁵.

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) cumplen un rol importante como polinizadores de diversos cultivos y contribuyen con los ecosistemas, por lo que su disminución amenaza a la polinización tanto de plantas silvestres como cultivadas, poniendo en peligro la

biodiversidad, el alimento y la producción agrícola⁶. El Síndrome de despoblamiento de colmenas (SDC) es un fenómeno que afecta a las poblaciones de abejas y que se caracteriza por la pérdida masiva de sus colonias, en especial durante la temporada invernal⁶. Varios factores podrían estar relacionados al SDC. Inicialmente, algunas hipótesis sugirieron que los pesticidas, el ácaro *Varroa*.,spp (ver más adelante), virus y bacterias eran los posibles causantes de la muerte de las colonias⁷. Otras, integran a la problemática factores como el clima desfavorable y la consiguiente falta de alimento disponible, prácticas de trashumancia a gran escala, o predisposición genética^{8,9}. Posteriormente, otras hipótesis propusieron que el SDC sería producto de una combinación de factores, tales como la interacción entre patógenos, determinadas condiciones climáticas desfavorables, disminución de la flora apícola o incluso factores asociados al propio manejo^{9,10,11}. Finalmente, algunos autores señalan que las extensas pérdidas de colonias no son inusuales y han ocurrido repetidamente a lo largo de muchos siglos y lugares^{10,12}. En la provincia de Buenos Aires, año 2017, se registró un posible caso de SDC en el que 170 colmenas pertenecientes al partido de General Alvear, nucleadas en 3 colmenares, habían sufrido la pérdida masiva de sus abejas, por lo que se realizó una investigación para averiguar las posibles causas de dicho episodio, a partir del estudio de presencia de patógenos en esas colmenas. En este estudio¹³, no se pudo concluir que el despoblamiento era causado por afecciones patógenas y agroquímicos utilizados en cultivos cercanos a las colmenas, pese a que algunos trabajos respaldan esas hipótesis^{14,15,7}.

Como se expresó, unos de los posibles factores del SDC, son los plaguicidas, los cuales son definidos por la FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación de la Naciones Unidas) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), como cualquier sustancia o mezcla de ellas utilizada para prevenir o controlar cualquier especie de planta o animal indeseable, incluyendo las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores de crecimiento de las plantas, o como defoliantes o desecantes, durante la producción, almacenaje, transporte, comercialización o procesado de los alimentos para el hombre o los animales¹⁶. En la Tabla 1 se puede observar la clasificación de los plaguicidas según el tipo de organismo que se desee controlar, según su grupo funcional y según su toxicidad y persistencia en el ambiente.

Tabla 1: Clasificación De los Plaguicidas

Tipo de organismos que se desean controlar	Grupo químico del principio activo	Persistencia en el medio ambiente	Toxicidad aguda
Acaricida	Organoclorados	Persistentes	Muy tóxicos
Funguicida	Organofosforados	Poco persistente	Moderadamente tóxicos
Herbicida	Carbamatos	No persistentes	Poco tóxicos
Insecticida	Triazinas		Moderadamente tóxicos
	Derivados del Acido Fenoxiacéticos		tóxicos
	Antibióticos		

Dentro de estos grupos de plaguicidas, los acaricidas son utilizados por los apicultores para eliminar, controlar o prevenir la presencia o acción de los ácaros. El ácaro varroa es el principal causante de enfermedades en las abejas obreras (ver sección 1.2) por lo tanto, los acaricidas destinados al control de esta enfermedad son la fuente más importante de contaminación de los productos de la colmena. Los acaricidas se dividen en dos grandes grupos: en el primer grupo están los sintéticos, que si bien son eficientes contra este parásito, persisten en ceras por un largo tiempo, se acumula en ella y terminan convirtiéndose en una potencial fuente de contaminación, estos compuestos son sustancias lipofílicas¹⁷. En el segundo grupo encontramos los acaricidas orgánicos, que a su vez se divide en acaricidas lipofílicos, volátiles como por ejemplo, el timol y en ácidos orgánicos solubles en agua, como el ácido oxálico.

Entonces, independientemente de la causa que esté produciendo el SDC, la oferta de miel a nivel mundial, esté disminuyendo debido a este síndrome. Asimismo, con el avance del monocultivo, son cada vez más las zonas en las que ya no hay suficiente disponibilidad de néctar y pólenes de alto valor biológico para una completa nutrición. Este hecho requiere profundizar el estudio sobre el estatus proteico de las abejas para poder evaluar diferentes fuentes proteicas que complementen la alimentación natural en este nuevo entorno ambiental. Sin embargo, más allá del escenario mundial, existe un campo de acción a nivel local que puede encontrar paliativos a esa disminución de la oferta, aún dentro del actual paradigma agrícola de nuestro país. Es decir, la intensificación de la

actividad agrícola explica una parte de la caída en los rendimientos apícolas. La política científica tecnológica debe concentrarse y actuar principalmente sobre la parte restante, que no es explicada por la siembra de principalmente soja. Complementariamente, desde el ámbito regulatorio deben tomarse las medidas necesarias para aplacar o eliminar las externalidades negativas del manejo agrícola sobre la apicultura¹⁸.

1.2 SANIDAD APÍCOLA

La sanidad de las colmenas es un punto crucial en la búsqueda de una mayor productividad de la actividad apícola. Para preservar la salud de las abejas se debe disminuir el riesgo de ingreso y propagación de agentes patógenos en el apiario y fortalecer las defensas de las colonias. Para ello es necesario un manejo sanitario integral, cuyos pilares son la nutrición adecuada, las medidas de higiene-profilaxis y las inspecciones periódicas de las colmenas.

Respecto del primer punto, para que las abejas obtengan la nutrición adecuada, es importante instalar el apiario en una zona rural con abundancia y variedad de flora de importancia apícola, sin riesgo de contaminación ambiental, para que la colonia pueda obtener alimento natural para su propia subsistencia. Además se debe asegurar el acceso a una fuente de agua potable, ya sea de cursos naturales o por medio de bebederos, por ejemplo en épocas de temperaturas altas, la colonia debe contar al menos con 1 litro de agua diario por colmena, para su subsistencia.

Es necesario verificar que las colmenas dispongan de cantidades adecuadas de alimentos naturales (miel y polen) en cada una de las etapas del ciclo anual de la colonia, en algunos casos, puede suministrarse alimentación artificial, la cual debería suspenderse 15 días antes del inicio de la floración, a efectos de evitar residuos en la miel.

Para el crecimiento y mantenimiento de la colonia se debe prestar atención a la cantidad y variedad de pólenes presentes en los panales del nido de cría, si hay deficiencias, en cuanto a cantidad/calidad de estas reservas, es importante suministrar suplementos proteicos para complementar la nutrición y preservar la salud de la colonia¹⁹.

En cuanto a las medidas de higiene-profilaxis es importante que los apiarios se instalen al menos a 2 km de distancia de apiarios ajenos, basurales, industrias, cría intensiva de aves y cerdos, y que estén en las áreas elevadas del terreno para evitar encharcamiento, además es importante proteger las colmenas de los fuertes vientos, altas temperaturas, etc con arboledas. También, para cumplir con estas medidas, el acceso al apiario debe estar garantizado para poder realizar los trabajos básicos en el mismo (como por ejemplo

tratamientos terapéuticos), independientemente de las condiciones climáticas que sucedan y que puedan ocasionar anegamientos.

La implementación de las medidas descriptas garantiza que las colmenas estén en óptimo estado fisiológico para mitigar los efectos negativos que causan las enfermedades y, a la vez, responder rápida y favorablemente a los tratamientos terapéuticos que se realicen, ya que este sector se ve afectado por enfermedades como la Loque Americana, Varroasis, y Nosemosis, las cuales requieren de fuertes investigaciones y difusión de los tratamientos de control²⁰. A continuación se describirán estas tres enfermedades del síndrome de Despoblamiento de las abejas y de la pérdida masiva de las colonias La Nosemosis

La nosemosis es una enfermedad producida por *Nosema* spp. (parásito microsporidio unicelular) que afecta el aparato digestivo de las abejas, considerada por muchos una de las causas del síndrome de despoblamiento de las abejas y de la pérdida masiva de las colonias

Las esporas de *Nosema* existen en pequeña cantidad, en muchas colmenas normales, y esperan a una debilidad extrema de la colmena para desarrollarse.

Cuando las endosporas son ingeridas por una abeja sana pasan al intestino grueso donde los jugos digestivos van atacando su envoltura. Al final de este paso, en la parte terminal del intestino grueso, el proceso de digestión rompe la corteza de la spora y libera al microorganismo que estaba dentro, enquistado, que se fija sobre el tejido interno del intestino y se reproduce formando más esporas, a base de alimentarse de este tejido, al que va destruyendo^{21,22}.

Por efecto de esta acción la abeja pierde tejido interno del intestino, que es donde se hace la digestión, pierde vigor y capacidad de vuelo permaneciendo en grupos en los alrededores de la piquera, con el abdomen hinchado por la acumulación de residuos cuya eliminación se hace cada vez más difícil. Finalmente la abeja muere. Esta enfermedad se manifiesta, por lo general, a finales del invierno o a principios de la primavera y sus síntomas son relativamente inespecíficos. Esto hace que sea fácil de confundir con otras enfermedades de la abeja y que pueda pasar desapercibida en toda su dimensión; además hay momentos en que la dinámica de la colmena puede enmascarar la presencia del microsporidio²².

Esta enfermedad sólo se previene, no tiene tratamiento, ya que una vez que la colmena está infectada la única solución es la quema de la misma y el recambio de material. *Nosema* puede vivir hasta 5 años esperando el momento de reinfectar a otra colonia,

además se transmite por deriva, pillaje, trofalaxis y/o alimentación, por lo que es de fácil propagación.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, otra enfermedad que enfrenta el sector apícola, es la Loque Americana (LA), ésta es una enfermedad de origen bacteriano que afecta a las larvas de las abejas melíferas y el agente causal es *Paenibacillus larvae*, un bacilo Gram positivo, formador de endosporas^{23,24}. Las larvas de obreras, reinas y zánganos se infecta al ingerir alimento contaminado con esporas²⁵, por lo que la susceptibilidad a la enfermedad podría estar relacionada con el tipo de alimentación, ya que las larvas de reinas, alimentadas con muy poca cantidad de polen, son las más susceptibles, mientras que las larvas de zánganos, alimentadas principalmente con polen, son las más resistentes²⁴.

Las larvas menores a 24 h son susceptibles a la infección mientras que las larvas con más horas de desarrollo se vuelven resistentes^{26,27}, luego, las abejas adultas no desarrollan la enfermedad, pero las endosporas sobreviven en el tracto digestivo favoreciendo su diseminación y pueden permanecer viables por períodos prolongados, llegando a reportarse una supervivencia de hasta 35 años^{28,29}. Las larvas infectadas mueren luego de ser operculadas y se degradan, formando una masa gomosa, viscosa y amarronada, que luego se deshidrata dando lugar a una escama que queda adherida al fondo de la celda^{30,31} (Figura 3). Se estima que cada larva muerta pueden contener hasta unos 2500 millones de esporas.

La LA está mundialmente distribuida. Durante décadas, esta enfermedad causó pérdidas millonarias en la industria apícola, lo que motivó numerosos estudios y medidas restrictivas en el comercio de miel y material vivo con el fin de controlarla. En Argentina fue detectada por primera vez en 1989 en la Provincia de Buenos Aires y posteriormente se detectó en todos los centros de producción apícola de nuestro país³².



Figura 3: Larvas Infectadas Luego De Ser Operculadas

Generalmente, para prevenir la LA se utilizan tratamientos quimioterápico mediante el empleo de medicamentos de usos veterinarios, específicamente antibióticos como la oxitetraciclina y la tilosina, sin embargo, su uso incorrecto puede dejar residuos en la miel y producir la aparición de cepas resistentes de *P. larvae*²⁹. En países como Estados Unidos y Japón, rige la “tolerancia cero” para estos residuos y en la Unión Europea no hay límites máximos fijados en miel, ya que su uso está prohibido en apicultura. Sin embargo, en otros países como Cuba, Chile o Argentina este límite está establecido en 0,1 mg/kg de miel³³. La presencia de estos residuos de antibióticos en productos alimenticios, en general, representa un peligro potencial para los consumidores relacionado con la aparición de reacciones alérgicas (hipersensibilidad), desarrollo de resistencia bacteriana y modificaciones en la microbiota intestinal. Además, los antibióticos no son efectivos contra las endosporas infecciosas, por lo tanto, solo suprimen los síntomas clínicos y enmascaran la enfermedad sin curar la LA³⁴.

En algunos países como Uruguay, la pauta recomendada de manejo sanitario se basó en el reconocimiento temprano de los síntomas de la enfermedad, en la eliminación de las colmenas afectadas por vía del fuego con enterramiento de las cenizas y el aislamiento de las colmena del apiario que no presentan síntomas²⁵ ya que el uso de antibióticos sintéticos fue prohibido por el riesgo de facilitar la generación de cepas resistentes de la bacteria, así como la posible contaminación de los productos finales (miel y propóleos). Como alternativa se promovió el uso de jarabes con extracto alcohólico de propóleos, mediante alimentador o mediante asperjado sobre la cámara de cría, como forma natural de disminuir el número de endosporas de *P. larvae*.

Con respecto a la Varroasis, ésta es una enfermedad que proviene de Asia y que en los ‘80 llegó a Europa y se diseminó por todo el mundo, en Argentina se detectó por primera vez en el año 1976, en la provincia de Formosa.

Varroasis es causada por el ácaro ectoparásito *Varroa destructor* (Figura 4) el cual succiona la hemolinfa de las abejas y de sus crías, provocando la pérdida de colmenas y afectando la producción de miel. Las abejas adultas infectadas (Figura 5) tienen una menor longevidad, disminuyen su capacidad de aprendizaje y presentan dificultad para retornar a la colmena³⁵. Este ácaro no solo ocasiona daños físicos en las abejas sino que también cataliza el desarrollo de otras infecciones en la colonia. La consecuencia final es la muerte de la colonia. Si las colmenas no se tratan correctamente son destruidas por el ataque de este parásito y de hecho miles de ellas han sido exterminadas en numerosos países^{36,23}.



Figura 4: Ácaro ectoparásito *Varroa destructor*



Figura 5: Abejas adultas y larvas infectadas con el ácaro

Las hembras adultas de *V. destructor* tienen una fase forética sobre el cuerpo de las obreras y zánganos que se producen dentro de la celdilla de cría de las mismas. La hembra es fácilmente visible, como una diminuta chincheta de color castaño (1-2 mm), mientras que el macho es mucho menor (menos de 1 mm) piriforme y de color amarillo claro²³. La varroa puede llegar a tener hasta tres ciclos de reproducción. Su ciclo comienza cuando una varroa hembra fecundada penetra en una larva de 5 o 6 días (preferiblemente de zángano). A las 60 horas de la operculación de la celdilla, la varroa pondrá un huevo de macho, y luego, cada 30 horas, un nuevo huevo, ya siempre de hembras. Cuando el primer huevo de varroa completa su desarrollo sale una larva de varroa, que alimentándose de la abeja en desarrollo, dará lugar a una varroa adulta. El macho completa su ciclo en 6,5 días, mientras que las hembras lo hacen en 6 días. La *Varroa* hembra vive en las abejas adultas cuando no se está reproduciendo, mientras que los ácaros de sexo masculino no pueden vivir fuera de la celdilla de cría de las abejas obreras. Por tanto, la fecundación de la varroa macho a las hembras que van madurando se hace en el interior de la celdilla operculada²³. Como se puede observar, la reproducción del parásito es sumamente rápida y por lo tanto es muy contagiosa, por lo que controlar esta enfermedad es de vital importancia para el sector apícola.

En los últimos años, el control estuvo centrado en el uso de acaricidas sintéticos, en particular, acaricidas organosintéticos (amitraz, cumafós, fluvalinato, entre otros) que se han utilizado ampliamente por su eficacia y facilidad de aplicación. Estos productos químicos, utilizados en forma indiscriminada, provocan que un producto natural e inocuo, como la miel se convierta en un riesgo para la salud humana. Por lo tanto, quizás en un principio no se adviertan las consecuencias del incorrecto uso de sustancias químicas, pero a mediano plazo pueden ocasionar lo siguiente^{18,37}:

- resistencia a los principios activos utilizados,
- ineficacia de los productos que se utilizan,
- presencia de residuos en los productos apícolas,
- reducción en el precio del producto,
- prohibición en el ingreso de miel a países importadores,
- disminución en el rendimiento de las colmenas,
- pérdida completa de las colmenas,
- incremento de la difusión y de los niveles de ocurrencia de las enfermedades apícolas,

- y mayor dificultad en el control de las enfermedades con el paso del tiempo.

A pesar del trabajo en genética que se ha realizado en nuestro país, y los avances concretos en el tratamiento de algunas de estas enfermedades, no se ha conseguido evitar la tendencia decreciente en la producción del complejo apícola nacional. Esta situación indica la necesidad de priorizar líneas de investigación que consigan explicar esta tendencia de la producción, con el fin de focalizar esfuerzos en acciones correctivas pertinentes.

Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias de control de estas enfermedades es considerada una actividad prioritaria en el sector apícola. En este sentido, el uso de diferentes extractos de vegetales (EV) y de aceites esenciales (AE) provenientes de plantas medicinales ha ganado popularidad e interés científico en estos últimos años ³⁸ ya que son particularmente interesantes debido a su seguridad, a que incrementan la vida útil de los alimentos, no dañan a los consumidores y tienen un alto potencial por sus múltiples usos³⁹.

El estudio en esta tesis está focalizado en tratamientos alternativos para la Loque Americana y la detección de residuos que generan los tratamientos alternativos que se utilizan contra la Varroasis.

1.3 PLANTAS MEDICINALES

Las plantas medicinales se definen como “vegetales que tiene, en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o preventivos o que son precursores de hemisíntesis quimiofarmacéutica”. Producen “principios activos”, los cuales son sustancias que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo que se aplica⁴⁰. Estas plantas se utilizan comúnmente en forma de infusión, extracto o como fuente de aceite esencial, las cuales están compuestas por mezclas complejas de un gran número de constituyentes. Estudiar las plantas medicinales consiste en conocer su actividad y además, en purificar sus constituyentes para así determinar las sustancias que poseen una actividad específica y comprender su acción⁴¹. Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos entre los que se encuentran fenoles, flavonas, aceites esenciales y compuestos relacionados, lo que las hace fuente natural importante de sustancias que poseen propiedades biológicas. Los aceites esenciales (AE) y extractos de plantas han sido ampliamente usados para una variedad de propósitos durante varios años y recientemente se ha generado un interés generalizado como una fuente de antimicrobianos natural alternativa. El interés científico está focalizado en los AE y extractos de plantas debido a sus múltiples usos, está comprobado que

incrementan la vida útil de los alimentos, son seguros y son aceptados por los consumidores⁴².

Entre los compuestos que sintetizan la mayoría de las plantas, que poseen actividad biológica y que han sido ampliamente estudiados, están los AE constituidos principalmente por una mezcla compleja de compuestos orgánicos⁴³. Otras sustancias sintetizadas por plantas medicinales, con actividad biológica relevante y de manera comparable a los AE, son los compuestos fenólicos de los cuales los más simples consisten en un anillo fenólico sustituido y los flavonoides. En la actualidad, se conoce que los metabolitos secundarios de naturaleza flavonoide poseen actividad antifúngica, antiviral y antimicrobiana, aislándose muchos grupos, identificando sus estructuras y demostrando, para ciertos casos, que existe sinergia entre los flavonoides activos presentes en una planta, así como entre éstos y los quimioterápicos existentes^{44,45}.

Es por ello que las investigaciones se desarrollan principalmente en la búsqueda de estas sustancias activas para el control de microorganismos patógenos, ya que muchos se han vuelto resistentes a los medicamentos tradicionales. Así, se ha estudiado la actividad antimicrobiana de las decocciones, infusiones, de EV y de AE de diferentes especies vegetales que demostraron ser efectivas contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos^{46,47}.

En el grupo de investigación se han llevado a cabo estudios con EV y AE de *Achyrocline satureioides*, comprobando que contienen principios activos con actividad antimicrobiana⁴⁸.

1.3.1 PLANTA MEDICINAL ACHYROCLINE SATUREIOIDES (LAM.) DC

Achyrocline satureioides (Lam.) DC, popularmente conocida como “Marcela de Campo”, es un arbusto perteneciente a la familia de las asteráceas, originario de América y distribuido por Europa y África. Existen más de 40 especies de *Achyrocline spp.*, muchas de las cuales son de América tropical y subtropical (25 fueron descritas en Brasil) y muy pocas de África tropical y Madagascar. Es originaria del sureste de Sudamérica y crece en suelos arenosos y pedregosos, en terrenos montañosos o planos. Es común en Brasil (a partir de Minas Gerais hasta Rio Grande do Sul), Uruguay, norte y centro de Argentina⁴⁹. En Argentina, se encuentra principalmente en áreas húmedas y suelos arenosos; crece en las sierras de Córdoba, San Luis y en Buenos Aires (Tandil y en las dunas de las costas de la provincia de Buenos Aires).

A. satureioides (Lam.) DC, es un subfrutice perenne que alcanza por lo general un poco más de medio metro de alto; de flores amarillo rojizas, de alrededor de 2 cm de diámetro, floreciendo en pequeños racimos. En el hemisferio sur suele hacerlo en primavera y verano, fructificando a fines del verano y durante el otoño. (Figura 6)



Figura 6: *Achyrocline Satureioides* – “Marcela De Campo”

La “Marcela de Campo” tiene un uso tradicional de varios años existiendo información etnobotánica sobre sus aplicaciones medicinales en prácticamente todos los países en los cuales crece. Como planta medicinal ha sido estudiada por sus propiedades digestivas, sedativas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antidiabéticas y antiasmáticas^{49,50}. También se la menciona como estimulante, emenagoga, antipirética y antihelmíntica al ser usada como tónico⁵¹. Hay informes de su utilización para el tratamiento de enfermedades, intestinales, cólicos, diarrea e irregularidades menstruales⁵². En Venezuela la planta se utiliza en infusiones antidiabéticas, para regular la presión sanguínea, la artritis y como agente antipirético, mientras que en Bolivia se utiliza como agente antipirético y sudorífico además de expectorante e inclusive en niños para aliviar la tos. En Colombia se ha utilizado para el tratamiento de tumores⁵³.

Los AE de la “Marcela de Campo” se obtienen por hidrodestilación, mientras que sus extractos por medio de fermentaciones, decocciones, maceraciones e infusiones. Un método bastante difundido es la realización de una maceración hidroalcohólica de la planta y sucesivas extracciones líquido – líquido con solventes de polaridad creciente para obtener sus respectivas fracciones⁴⁹.

Se han llevado a cabo numerosas investigaciones científicas utilizando modelos *in vitro* y modelos de animales *in vivo* de esta especie en las dos últimas décadas, las cuales dieron como resultado un amplio espectro de propiedades farmacológicas y terapéuticas, como: actividad hematoprotectora, asociada a sus propiedades antioxidantes y captadora de

radicales libres, actividad antihiper glucémica, antiinflamatoria e inmunomoduladora. Existen datos de actividad insecticida, tripanocida, antiherpética y frente a VIH, actividad citotóxica frente a células de carcinoma hepático humano, así como actividad antibacteriana frente a especies Gram positivo y negativo⁵⁴. En la Tabla 2 se resumen algunas de las actividades antibióticas que se han descubierto que posee esta planta, Marcela de Campo.

Tabla 2: Actividad antibiótica de la planta marcela de campo

ACTIVIDAD	EXTRACTO	OBSERVACIÓN
Larvicida	Extractos etanólicos de partes aéreas	<i>In vivo</i>
Antiparasítica	Acuoso	<i>In vivo</i>
Moluscicida	Etanólico	<i>In vivo</i>
Insecticida y tripanocida	Extracto hexánico y etanólico de flores y hojas	<i>In vivo</i>
Antimicrobiana	Decocción	<i>In vitro</i>
Antimicrobiana	Extracto alcohólico y aceites esenciales	<i>In vitro</i>
Antimicrobiana	Extracto acuoso	<i>In vitro</i>
Antiviral	Extracto Alcohólico	<i>In vitro</i>

Se han llevado a cabo estudios del extracto hidro-alcohólico de la “Marcela de Campo”, empleando solventes de polaridad variable y más livianos que el agua, y se demostró que el extracto hexánico (EH) era el que presentaba mayor actividad antibacteriana contras cepas del *P.larvae*, seguido del extracto bencénico (EB). Los extractos obtenidos con éter etílico y acetato de etilo fueron los que menor actividad antibacteriana manifestaron^{48,55}.

Por lo tanto, uno de los principales objetivos de este trabajo de tesis es avanzar en la purificación e identificación química de los compuestos presentes en los extractos hexánicos, dado que es la fracción que presentó mayor actividad antimicrobiana.

1.3.2 PLANTAS MEDICINALES PARA EL CONTROL DE VARROA

Como se mencionó anteriormente, el uso de diferentes EV y de AE es el foco de investigación para tratamientos alternativo de diversas enfermedades⁵⁶. Varios autores han demostrado que los aceites esenciales están constituidos principalmente por compuestos

terpénicos y fenólicos, siendo estos últimos los responsables de las propiedades antimicrobianas por su capacidad de afectar la permeabilidad de la membrana bacteriana, la cual restringe la difusión de los compuestos hidrofóbicos a través de su cobertura lipopolisacárida.

Para el tratamiento de la Varroa, se han llevado a cabo investigaciones basadas en el uso de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas, tales como, lavanda, eucalipto, orégano, menta, entre otros, los que han demostrado una interesante eficacia acaricida⁵⁷, según lo señalado por *Flores et al.*⁵⁸, uno de los objetivos de probar distintas plantas medicinales, es aumentar el abanico de posibilidades que hoy existe y evitar la aparición de resistencias, tal como ha comentado en secciones anteriores, con los acaricidas sintéticos o como eventualmente podría suceder con productos naturales .

Estos aceites presentan como compuestos principales, timol, eugenol y carvacrol, y ofrecen una atractiva alternativa a los químicos de origen sintético ya que son productos que no presentan riesgos a la salud^{59,60,61}. *Amrine et al.*⁶² señala que los aceites esenciales tienen dos modos de acción sobre el ácaro varroa, toxicidad por contacto directo y por reproducción deteriorada, vía alimentación de los jarabes que contienen los aceites esenciales, por parte de las abejas. Los aromas de los aceites esenciales pueden alterar la orientación del olfato de varroa y su principal desventaja es que existe una pequeña diferencia entre la dosis letal para el ácaro y para la abeja⁶³

Sin embargo, si no se utilizan debidamente, pueden encontrarse niveles altos de estos residuos (>0,8 mg/Kg) lo que puede producir cambios en las características organolépticas de la miel. Por ejemplo, la presencia de algunos compuestos volátiles puede ser percibida por el ser humano cuando su concentración supera los 1,6 mg/kg^{64,65}. Por lo tanto, es importante evaluar el contenido de estos compuestos en miel, aunque no representen un problema para la salud, dado que la legislación alimentaria internacional prohíbe el agregado de aditivos a la miel, más aún si se adultera su sabor, por lo que los residuos de estas sustancias deben permanecer por debajo de su umbral de sabor.

Por lo tanto, otro de los objetivos principales de este trabajo de tesis fue desarrollar métodos rápidos cuali-cuantitativos para determinar estos compuestos tanto en miel (posibles residuos), como en plantas aromáticas (para medir su potencial antimicrobiano).

Tradicionalmente para detectar estos analitos se utilizan los métodos cromatográficos que son los más adecuados para el análisis de residuos¹⁰, en particular cromatografía líquida. Para detectar residuos en miel el más desarrollado es la cromatografía líquida de alta

eficacia (HPLC) con detección de fluorescencia o UV-visible con arreglos de diodos^{66,67}. La detección por HPLC/UV-visible es poco sensible para concentraciones bajas y, si bien la detección por fluorescencia es más sensible, generalmente requiere de una etapa previa de derivatización. Estas técnicas, requieren de equipamientos costosos y, en la mayoría de los casos, de una etapa previa de purificación y preconcentración de los analitos.

Entre las técnicas analíticas, los métodos electroquímicos de análisis resultan particularmente atractivos, principalmente porque son altamente sensibles y requieren bajo costo para su fabricación, son dispositivos sencillos y de rápida respuesta⁶⁸. Además, estas técnicas electroquímicas pueden combinarse con sistemas de flujo continuo, como FIA ó HPLC, lo que permite alcanzar límites de detección más bajos si se los compara con los obtenidos con detectores UV-visible, que se utilizan con mayor frecuencia⁶⁹ para este tipo de compuestos. El costo de estos dispositivos, aún acoplados a técnicas separativas, sigue siendo bajo (comparado con los cromatógrafos con detectores convencionales) dado que se pueden diseñar y construir en el propio laboratorio^{70,71}

Para detectar estos analitos en AE de plantas aromáticas y poder medir su potencial antimicrobiano, si bien tradicionalmente se utilizan las técnicas antes mencionadas por su sensibilidad característica, no serían necesarias ya que ellos se presentan en cantidades concentradas, y por su elevado costo se prefieren métodos simples y de bajo costo.

Otra alternativa sería el uso de métodos espectrofotométricos para la determinación del contenido fenólico total, como el método de Folin-Ciocalteu, que es el más utilizado en alimentos y muestras agrícolas porque es simple y reproducible⁷², pero este método sobreestima el contenido fenólico en gran medida⁷³. Hay varios ejemplos sobre cómo se mide el contenido fenólico total en aceite esencial de tomillo^{74,75} y orégano⁷⁶ por el método de Folin-Ciocalteu.

Sin embargo, la cuantificación individual de los fenoles TI y CA no es posible porque sus respuestas electroquímicas se superponen (ver más adelante), por eso en esta tesis se propone una técnica con nanopartículas de oro para determinar fenoles en AE.

CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO Y METODOLOGÍA

2.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS HEXANICOS, PURIFICACION Y CARACTERIZACIÓN QUIMICA DE *ACHYROCLINE SATUREIOIDES* (MARCELA DE CAMPO).

2.1.1 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Se recolectó la “Marcela de Campo”, en la zona serrana de Santa Mónica, Provincia de Córdoba (32° 5' 28,21" S y 64° 36' 31,66" O), en la estación del año, verano. Una muestra del material vegetal fue identificada y comparada con muestras del herbario de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (Número de voucher: RIOC 4865). En el laboratorio se dejaron secar las plantas sobre papel grafito varios días, las cuales fueron removidas periódicamente para favorecer el aireamiento. Una vez secas, se trituraron flores y tallos para luego proceder a la obtención de los extractos.

2.1.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL (EV).

Existen diferentes técnicas para la extracción de productos naturales, como los AE y EV, a partir de plantas medicinales. Las más utilizadas son:

AE: destilación por arrastre con vapor y prensado.

EV: fluido supercrítico; extracción solido-liquido; extracción liquido-líquido y extracción en fase sólida.

Cuando la concentración de AE en la planta es baja o directamente la planta no posee dichos compuestos, pero sí están presentes compuestos activos, es conveniente la obtención de EV. Estos extractos constituyen la fracción no volátil de los principios activos de una planta es decir, son los compuestos no volátiles que, a diferencia de los AE que contienen la fracción volátil, no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante diversas técnicas de extracción⁷⁷.

La extracción se considera como una transferencia de materia basada en la disolución de uno o varios de los compuestos de una mezcla (liquida o que forma parte de un sólido) en un disolvente selectivo. La diferencia entre extracción sólido-líquido y extracción líquido-líquido radica en, si el material a extraer se encuentra en fase sólida o líquida, en ambos casos el disolvente debe ser inmisible en la fase que contiene el extracto. En general, se denomina extracción sólido-líquido cuando se pone en contacto, un sólido triturado (material vegetal) con un líquido (disolvente de extracción) en el que son

solubles algunas de las sustancias de las que se compone el sólido. Del proceso se obtiene un sólido agotado y una disolución o extracto formado por el disolvente y las sustancias disueltas en él^{78,79}.

Uno de los disolventes más utilizados en estos procesos de extracción es el alcohol. La tintura alcohólica, tintura madre, tintura o simplemente Extracto Hidro-Alcoholico (EHA), se obtiene de la maceración de la planta, generalmente seca y con un tamaño de partícula no muy pequeño, con una disolución de alcohol:agua del 25 al 50%. El macerado o mezcla hidro-alcohólica se conserva en un recipiente hermético en un lugar fresco y oscuro, agitando periódicamente el recipiente para homogenizar la mezcla. Dependiendo de la planta y otros factores, se cambia la mezcla alcohol-agua y luego de un tiempo de maceración o extracción conveniente se cuele la mezcla, se filtra el extracto, se envasa y se almacena en forma adecuada⁷⁸.

Luego de la obtención del EHA, se realiza una extracción liquido-liquido. Este tipo de extracción puede realizarse cuando el EHA posee uno o más constituyentes que sean solubles en solventes orgánicos e inmiscibles en agua.

El procedimiento utilizado en el presente trabajo se describe a continuación:

a) Se pesan 200 g de material vegetal seco y picado, y se lo coloca en un erlenmeyer con una proporción de etanol-agua (1:1) (Etanol-H₂O). Se renovó el extractante hasta agotar el material. Este macerado se filtró con papel Whatman N°2 obteniéndose así el extracto EHA.

b) Luego, el EHA se concentró a presión reducida para permitir la evaporación del alcohol y se obtuvo el Extracto Acuoso (EA).

c) El EA se somete a una extracción liquido-liquido con Hexano durante 5 días. Luego, se evapora el solvente primero a presión reducida y luego con gas N₂ obteniéndose finalmente el Extracto Hexanico Completo (EHC).

2.1.3 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EHC DE “MARCELA DE CAMPO”.

Para la identificación química de los metabolitos presentes en “Marcela de Campo”, al EHC se le realizaron estos estudios, los cuales dan información acerca de la familia a la que pertenecen los compuestos químicos que están en el material vegetal. Dentro de estos constituyentes químicos, los que con mayor frecuencia se ha comprobado que están relacionados con las actividades biológicas, son: *alcaloides, flavonoides, naftoquinonas y/o antraquinonas, taninos, esteroides y/o triterpenoide*⁸⁰.

-Análisis preliminar de alcaloides:

Los alcaloides son aquellos metabolitos secundarios de las plantas sintetizados, generalmente, a partir de aminoácidos que tienen en común su hidrosolubilidad a pH ácido y su solubilidad en solventes orgánicos. Los alcaloides verdaderos derivan de un aminoácido y por lo tanto contienen nitrógeno. Todos los que presentan el grupo funcional amina o imina son básicos. Sus actividades biológicas son importantes por su mimetismo hormonal y su intervención en las reacciones principales del metabolismo celular. A pesar de ser sustancias poco similares entre ellas desde el punto de vista estructural, poseen propiedades fisiológicas análogas. La mayoría de los alcaloides poseen acción fisiológica intensa en los animales incluso a bajas dosis con efectos psicoactivos, por lo que son muy usados en medicina para tratar problemas de la mente y calmar el dolor. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, cafeína, la estricnina y la nicotina. Sus estructuras químicas son variadas ⁸¹, por ejemplo en la Figura 7 se muestra la estructura de la cafeína.

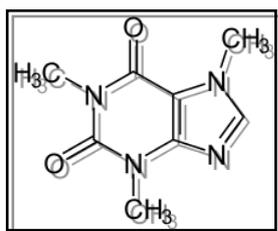


Figura 7: Cafeína

En los exámenes fitoquímicos preliminares, fundamentalmente, se emplean reactivos de precipitación y reactivos para el revelado de cromatogramas. Los reactivos de precipitación que se utilizan son los de Dragendorff, Valser, Mayer y de Reineckato de amonio. La utilización de los reactivos de pulverización (Dragendorff modificado, Munier y Macheboeuf) implica el empleo de métodos de separación cromatográfica en capa delgada, pero no se utilizaron en este trabajo ya que presentan las desventajas de no ser específicos cuando se emplean en la detección de alcaloides en capa delgada y además muchos otros compuestos como los constituyentes de aceites esenciales, triterpenoides y esteroides, son revelados con el reactivo de Dragendorff de manera similar a los alcaloides ⁸².

Procedimiento: Se pesaron 0,094 g de EHC, se le agregó 15 ml de HCl 5% y se calentó a 60 °C. Una vez frío se filtró, y se colocó en 4 tubos de ensayo 0,5 ml de este filtrado. A un tubo se le agregó 2 gotas de reactivo Dragendorff, a otro tubo se le colocó 2 gotas de

reactivo de Mayer, al tercero 2 gotas de Valser y al cuarto 2 gotas de Reineckato de amonio

-Análisis preliminar de esteroides y/o triterpenoides:

El triterpeno más sencillo y el precursor de todos los esteroides y triterpenoides es el escualeno, el cual en su fórmula molecular lineal posee $C_{30}H_{50}$. Por ciclamiento enzimático del escualeno se pueden formar, en principio, compuestos tetracíclicos y pentacíclicos. Entre los compuestos tetracíclicos el más conocido es el lanosterol, presentes en muchos tejidos animales. Por pérdida de dos metilos sobre el carbono 14, el lanosterol da lugar al núcleo fundamental de los esteroides, por ejemplo el colesterol (27 carbonos).

El análisis preliminar de esteroides y triterpenoides libres en plantas no ha sido una práctica común; sin embargo, se encuentran en bibliografía trabajos como el de *Wall y col*⁸³ y el de *Medina*⁸⁴ en los que efectúan la reacción de Liebermann-Burchard a un extracto clorofórmico de la planta, con el fin de determinar la presencia de esteroides insaturados. La reacción de Liebermann-Burchard es la prueba más utilizada para el análisis cualitativo y cuantitativo de esteroides y aunque se viene empleando desde hace más de 60 años, no se conoce bien el mecanismo ni los requerimientos estructurales exactos para que una sustancia de positiva a la prueba. Por ejemplo, *Dominguez*⁸⁵ en su tesis-artículo afirma que "la reacción es positiva para esteroides que contienen 2 dobles enlaces conjugados, que los pueden formar por una o dos deshidrataciones con isomerización o por isomerización solamente", sin embargo, la experiencia ha demostrado que en general cualquier esteroide o triterpenoide que posea por lo menos un doble enlace (y en algunos casos aun siendo saturado), puede dar positiva la reacción de Liebermann—Burchard. Como lo describió *Wall y col*⁸³, otras sustancias como los carotenos y las xantofilas también reaccionan positivamente, y debido a que estas sustancias casi siempre están presentes en las plantas, con el fin de practicar la prueba sin lugar a errores, se debe someter el extracto vegetal a una separación cromatográfica preliminar o a una saponificación, y además se deben separar los carotenos y xantofilas por métodos cromatográficos o por precipitación con yodo, con el propósito de ejecutar la realización sobre una muestra con el mínimo de interferencias.

Un procedimiento que tenga en cuenta los aspectos discutidos anteriormente implica un análisis muy complejo que insume mucho tiempo, hecho que está en desacuerdo con la metodología sencilla que debe tener un análisis fitoquímico preliminar. Por esta razón, en el presente trabajo se optó por someter al EHC a una extracción con éter de petróleo y

luego realizar una cromatografía bidimensional en capa delgada utilizando como adsorbente sílica gel y como revelador el reactivo de Lieberman-Burchard. Con esta metodología se pueden observar tanto las manchas correspondientes a los carotenos, las xantofilas y a otros compuestos coloreados, como las producidas por los esteroides y/o triterpenoides.

Procedimiento: Se pesó 0,087 g del extracto, se extrajo con 2 porciones de 15 ml de éter de petróleo, se filtró y se lavó este papel con el mismo solvente obteniéndose así el filtrado 1. Este filtrado se concentró a 5 ml en baño maría y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de metanol-agua (90:10), se agitó y se dejó reposar hasta que se obtuvieron dos capas. La fase etérea se separó por CCD bidimensional sobre sílica gel G eluyendo primero con ciclohexano-acetato de etilo (95:5) y luego con éter de petróleo-éter etílico-ácido acético (80:20: 1) y se reveló con el reactivo de Liebermann-Burchard. Luego se calentó a 105 °C por 10-15 minutos

El residuo de la extracción con éter de petróleo se extrajo con 20 y 10 ml de etanol-agua (1:7) a 60°C, se filtró y se obtuvo la Solución 1. Esta solución se utilizó para la determinación de flavonoides, naftoquinonas y/o antraquinonas y taninos.

-Análisis preliminar de flavonoides:

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en los vegetales, responsables de la coloración de las plantas y con actividad biológica muy importante. Desde el punto de vista químico derivan de la estructura fundamental C₆-C₃-C₆, un ejemplo es la Figura 8, es decir dos anillos de benceno unidos por una cadena de tres átomos de carbono⁸⁰. Para identificarlos se realizan las reacciones de la cianidina y la prueba para leucoantocianidinas por calentamiento con un ácido mineral diluido.

* **Reacción de la Cianidina:** consiste en agregar al flavonoide disuelto en metanol, etanol o una mezcla hidro-alcoholica, magnesio en limaduras o en polvo y luego, lentamente, ácido clorhídrico concentrado. En estas condiciones, cuando están presentes sustancias que poseen el núcleo de la benzopirona, se desarrollan coloraciones que van del anaranjado al violeta. Por tanto, esta prueba será positiva para flavonas, flavanoles, flavanonas, flovonoles e isoflavonas y también para compuestos como las xantonas que sin ser flavonoides tiene el núcleo de la benzopirona, (Figura 8).

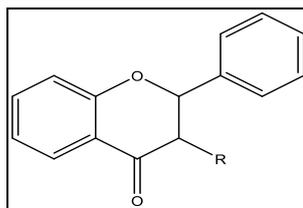


Figura 8: Estructuras de la flavanonas (R=H) y flavanoles (R=OH), las cuales poseen el núcleo de la benzopirona

Hasta el momento no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual ocurre, aunque se han publicado trabajos sobre las condiciones óptimas para que se lleve a cabo la reacción⁸⁶, algunos ensayos hacen pensar que no es una simple reducción porque cuando se sustituye el Magnesio por el Zinc las coloraciones que se obtienen son diferentes. Otro aspecto de la reacción de la cianidina es el descrito por Bryant⁸⁷ quien en 1950 encontró que después de ejecutada la prueba, si la solución coloreada es diluida con agua y agitada con alcohol octílico, cuando la coloración pasa al n-octanol, se trata del aglicon de un flavonoide y en caso contrario se debe a un glicósido.

* **Reconocimiento de leucoantocianidina:** cuando a temperatura ambiente, entre 10 °C-20 °C, se mezcla una leucoantocianidina con un ácido mineral al 5-10%, se obtiene una coloración roja intensa debida a la formación de la respectiva antocianidina, según la siguiente reacción (Figura 9).

La reacción es oxidativa e involucra la pérdida de un átomo de hidrogeno sobre el carbono 2.

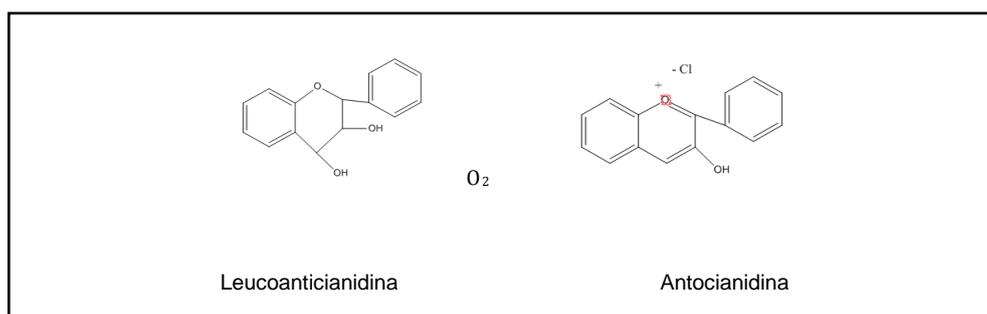


Figura 9: Reacción De La Leucoantocianidina Con Ácido Clorhídrico

Procedimiento:

Reacción de la Cianidina: Con 1 ml de la **Solución 1** se realizó la reacción de la Cianidina (coloración roja con Mg en polvo + HCl) la cual será positiva para γ -benzopironas.

* **Reconocimiento de leucoantocianidina:** Las leucoantocianidinas se reconocen porque producen coloraciones rojas al calentar en baño maría por 15 minutos 1 ml de la **Solución 1** y 0,5 ml de HCl 10%.

- Análisis preliminar de naftoquinonas y/o antraquinonas:

Las naftoquinonas y las antraquinonas son un grupo de compuestos presentes con mayor frecuencia en las plantas superiores. Las quinonas naturales químicamente son para-quinonas u orto-quinonas sintetizados en las plantas por la ruta biosintética del acetato. En la Figura 10 se puede ver la estructura de la naftoquinona Lawsona.

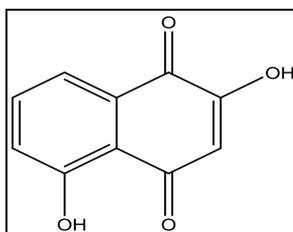


Figura 10: Estructura Lawsona

El estudio de estas sustancias tienen gran interés en la actualidad porque algunos investigadores han demostrado que poseen actividad antimicrobiana y antitumoral significativa^{88,89}. Para identificarlas se realiza la reacción de Borntrager-Krauss, donde las naftoquinonas y las antraquinonas se ponen de manifiesto al desarrollarse una coloración rojiza en dicha reacción⁸⁰.

Procedimiento: se realizó la reacción de Bomtrager-Krauss: se calentó a baño maría 5 ml de la **Solución 1**, 1 ml de agua oxigenada de 20 volúmenes y 1 ml de H₂SO₄ al 50 %, durante 15 minutos, se enfrió y se extrajo con 3 ml de benceno en una ampolla de decantación, se agitó con 1 ml de NaOH al 5 % que contiene 2% de NH₄OH.

-Análisis preliminar de taninos:

Los taninos son polifenoles de origen natural capaces de formar uniones estables con las proteínas y otros polímeros como la celulosa y la pectina. Debido a la facilidad con que los taninos se unen a las proteínas, se usan industrialmente para curtir cueros y pueden inhibir algunas enzimas, interfiriendo con procesos metabólicos^{90,91}. Los taninos producen marcada astringencia que es la sensación de sequedad en la boca producida probablemente

por reducción de la acción lubricante de las glicoproteínas de la saliva. Debido a su toxicidad, se piensa que los taninos juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de las plantas. Un ejemplo de estos compuestos, es el ácido gálico, el cual se muestra en la

Figura 11.

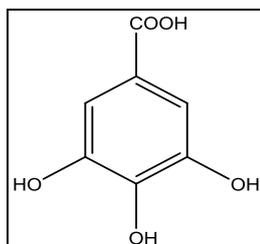


Figura 11: Ácido Gálico

La detección de taninos en análisis fitoquímicos preliminares se basa en la propiedad de estos compuestos para producir precipitados con sales de plomo y de hierro, con algunos alcaloides como la cinconina y la cafeína y especialmente con las proteínas⁹¹.

La prueba más conocida y universalmente utilizada para el reconocimiento de taninos, se basa en la precipitación de una solución de gelatina-sal por los taninos, este precipitado es soluble en urea 10 M, y con el agregado de cloruro férrico se produce una coloración o precipitado verde, azul o negro.

Procedimiento: a 1 ml de la **Solución 1** se le agregó 1 ml de reactivo de gelatina-sal (preparación: hidratar 1 g de gelatina en 100 ml de una solución de ClNa al 10%, calentar a baño maría si es necesario), se centrifugó a 2.000 r.p.m. y el residuo se disolvió en 1-2 ml de solución 10 M de úrea y se adicionó 2-3 gotas de FeCl₃ al 5%.

2.1.4 AISLAMIENTO DE COMPUESTOS QUÍMICOS DEL EHC

Una vez identificadas las familias de compuestos químicos presentes en el EHC, se continuó con la purificación del mismo para aislar y caracterizar químicamente estos compuestos, empleando técnicas de separación cromatográficas.

Métodos de separación cromatográficos

Los métodos cromatográficos son por excelencia utilizados en el aislamiento de mezclas complejas como los EV. La cromatografía puede ser definida como cualquier método de separación que depende de una absorción continua, partición o proceso de intercambio

iónico. Agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar compuestos estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios^{92,93}.

Una característica que todas ellas tienen en común es su dependencia de la distribución de solutos entre dos fases, una de las cuales se encuentra en movimiento, por lo que se le conoce como fase móvil, y que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico), cuya función es arrastrar a la muestra a través de una fase fija, conocida como fase estacionaria, constituida por un sólido o un líquido fijado en un sólido y que es inmisible con la fase móvil⁹⁴.

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse de acuerdo a la disposición de la fase estacionaria como sigue:

-Cromatografía Plana: La fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas son: Cromatografía en papel y Cromatografía en capa fina o delgada (CCD).

- Cromatografía en Columna: La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna. Según el tipo de fluido empleado como fase móvil se distinguen: Cromatografía de líquidos (LC), Cromatografía de Gases (GC) y Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC).

También, las técnicas cromatográficas se clasifican de acuerdo a la naturaleza de fase móvil y fase estacionaria. Esto es:

-Cromatografía de Adsorción: la fase estacionaria es sólida: cuando la fase móvil es líquida, ésta se nombra Cromatografía líquido-sólido. Y cuando la fase móvil es gaseosa ésta se nombra Cromatografía gas-sólido.

-Cromatografía de Partición: la fase estacionaria es líquida: cuando la fase móvil es líquida, se denomina Cromatografía líquido-líquido y cuando la fase móvil es gaseosa, se denomina Cromatografía gas-líquido.

La cromatografía en capa delgada (CCD) y la cromatografía en columna flash (CCF) son métodos simples y eficientes que sirven para identificar y cuantificar metabolitos secundarios tanto de sustancias vegetales como de extractos naturales, tinturas e incluso formulaciones farmacéuticas. Estas técnicas se utilizan para identificar y determinar la pureza de los compuestos y como técnica de separación a pequeñas escalas. La CCD también se utiliza como etapa previa a la identificación de metabolitos secundarios de interés farmacológico o principios activos.

A partir de 1906 se comienza a utilizar la cromatografía en columna Flash para separar EV coloreados, proceso por el cual se le asigna este nombre. Para trabajar con esta técnica, primero se debe realizar un estudio del comportamiento cromatográfico en CCD de la mezcla que se desea separar. Este comportamiento se estudia con diferentes mezclas de solventes, donde el resultado adecuado para la separación es aquel donde el compuesto de mayor movilidad no supere un R_f (factor de retención)=0,6⁹⁵.

En el laboratorio, se cortaron cromatofolios de silica gel 60 F264 (marca Merck) de 3 cm de ancho por 10 cm de alto, a los cuales se les marcó con lápiz la línea de siembra a 0,70 cm de la base. Con un capilar se realizó la siembra del extracto a ensayar. La siembra se realizó en banda. Los cromatofolios se desarrollaron en una cámara previamente saturada con los vapores de la fase móvil. Se estudiaron diversas fases móviles y la utilizada fue solución de Hexano:Acetona en proporción 8:2.

Luego de correr con la fase móvil los cromatofolios, se dejaron secar y se observaron bajo luz ultravioleta (UV) a 254 nm. Las cromatografías donde se visualizaban bandas definidas y separadas, fueron seleccionadas y luego se midieron los R_f de cada banda

Posterior a la selección de la mezcla de solventes de diferentes polaridades para la separación de bandas, se prosiguió con la CCF. Esta se realizó empleando el método de *Still y col.*⁹⁶, relleno una columna tal como se muestra en la Figura 12.

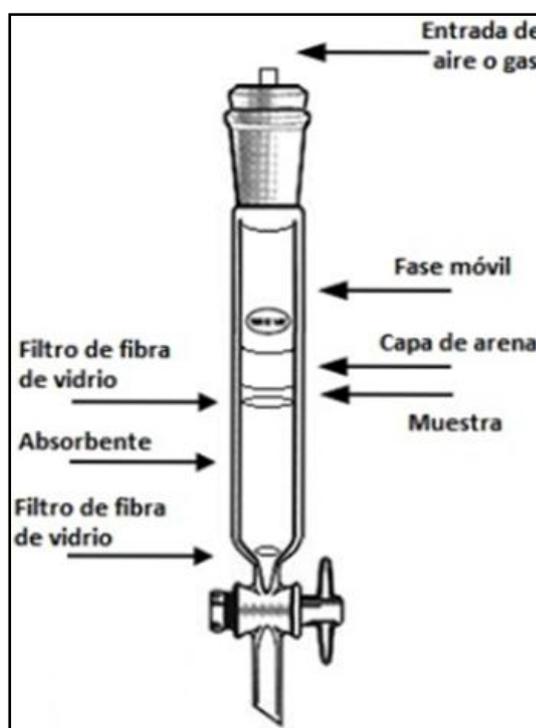


Figura 12: Armado de la columna de cromatografía Flash (CCF)

En primer lugar, se colocó un filtro de fibra de vidrio en la parte inferior de la columna con la llave de salida cerrada. A continuación se agregan 30 g de gel de sílice (absorbente) de un tamaño de poro de 60 Å y tamaño de partícula 35 a 75 µm. La sílice fue embebida en la fase móvil. Luego, se colocó una capa de arena fina lavada, la muestra mezclada con una pequeña proporción de gel de sílice y finalmente, otra capa de arena fina lavada. Se procedió con la elución de los compuestos con la fase móvil. Para ello, se cerró la columna y se ejerció presión positiva abriendo la llave del cilindro que contenía el gas nitrógeno sobre la parte superior de la columna; se controló el flujo de salida. Se recolectaron 100 alícuotas de 2 mL cada una, que iban eluyendo por la parte inferior de la columna. Estas alícuotas se sembraron en puntos en un cromatofolio para identificar los Rf de las mismas y determinar a qué bandas pertenecían las diferentes alícuotas recolectadas. Una vez identificadas las alícuotas con el mismo Rf, se mezclaron y evaporó el solvente.

Las bandas se purificaron empleando métodos cromatográficos, tales como, CCF, cromatografía preparativa y centrífuga radial.

Cromatografía (CCD) en fase normal

Se utilizaron con fines analíticos y con fines preparativos. En todos los casos se utilizaron cromatofolios con base de aluminio (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo G, SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel) de 0,25 mm de espesor. Para la elución de cada muestra se utilizó la mezcla de disolventes que dio mejor resolución de cada compuesto. Después de la elución, las placas analíticas se revelaron con luz ultravioleta de 365 nm y 254 nm de longitud de onda y/o pulverización con revelador químico anisaldehído, calentando posteriormente las placas a 120 °C.

Para desarrollar la cromatografía preparativa, en cada placa se sembró una cantidad máxima de 20 mg de muestra y la detección de los productos se hizo solamente por revelado con luz ultravioleta.

-Cromatografía Centrífuga Radial (CCR)

Para el desarrollo de este tipo de cromatografía se utilizó un Cromatotrón modelo 7924T de Harrison Research. En esta técnica la fase móvil es obligada a eluir con una aceleración dada por la fuerza centrífuga aplicada (800 r.p.m), alcanzando un flujo de 1-10 ml/min .La muestra se aplica en el centro del disco o plato circular que posee la fase estacionaria sorbida en forma de capa fina. La elución se realiza mediante el solvente que se aplica en el centro, definiendo bandas circulares correspondientes a los compuestos que

se van separando a medida que el sistema gira mediante el rotor inclinado⁹⁷. En el capítulo de Resultados y Discusión, se muestra una imagen de este aparato.

Las placas fueron de 2 mm de espesor y se prepararon siguiendo el manual de instrucciones proporcionado, utilizando una mezcla de gel de sílice 60 F₂₅₆ con sulfato de calcio hemihidratado Merck. La elección del sistema de disolventes se correspondió con las características de la muestra a eluir.

2.1.5 TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA LA IDENTIFICACIÓN QUÍMICA

-Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), es una de las herramientas más poderosa para la determinación de una estructura orgánica. Al igual que en la espectroscopía IR, en la RMN se puede utilizar una pequeña cantidad de muestra y, además, la misma no es destruída. El espectro de RMN proporciona una gran cantidad de información sobre la estructura del compuesto. Algunas estructuras se pueden determinar y otras necesitan de la ayuda de otras técnicas y análisis químico⁹⁸. La RMN se utiliza para estudiar una amplia variedad de núcleos como ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F y ³¹P. Para los químicos orgánicos la RMN más útil es la de protón (¹H) y la de carbono 13 (¹³C), ya que el carbono y el hidrogeno son los componentes mayoritarios de las moléculas orgánicas⁹⁸.

Un espectro monodimensional ¹H, nos otorga información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro (desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo, y por tanto proporciona información de los grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. La forma de la señal da información de los protones cercanos acoplados escalarmente.

Por otro lado, en un espectro monodimensional de ¹³C, el desplazamiento químico (al igual que el de protón) da información de los grupos funcionales. Dependiendo del tipo de experimento realizado se puede obtener información del número de hidrógenos unidos a cada carbono⁹⁸.

Para la identificación química de los compuestos aislados del EHC, los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN se registraron en un equipo Bruker Avance 400 (400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C) con programas suministrados por la casa Bruker. Los espectros se realizaron en disolución de cloroformo deuterado (CDCl₃), utilizando como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Los valores de los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) en relación a la señal del TMS y las constantes de acoplamiento (J) en los espectros de protón se expresan en hertzios (Hz).

2.1.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DEL EHC.

Para medir la actividad antimicrobiana de las bandas purificadas obtenidas a partir del EHC de *Achyrocline satureioides* contra *P. larvae*, se midió la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) que es la mínima concentración que inhibe el extracto a la bacteria en cuestión, y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) que es la concentración mínima de extracto que mata a la bacteria, siguiendo el protocolo que se describe a continuación, desarrollado por el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias. Exactas Físico-Química y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

1-Materiales

Agua destilada estéril, frascos con tapa estériles, placa de 96 pozos, tubos de ensayos, Tubos Eppendorf, cajas de Petri, micropipetas, ansa en rulo, espátula de Drigalsky, alcohol, agar MYPGP, caldo BHI, puntas de micropipetas amarillo, azul, agua peptonada, mechero Bunsen, vortex, extracto de la planta plantas “Marcela de Campo”.

2. Metodología

Microorganismos

Se utilizó la cepa 9 de *Paenibacillus larvae*, aisladas y proporcionadas por el Departamento de Microbiología e Inmunología de la UNRC a partir de una muestra de cuadros de colmenas de la zona sur del Departamento Río Cuarto, ya que esta cepa es la que mejor crece y se desarrolla.

Preparación de las placas de Petri con medio MYPGP

El Medio MYPGP (Muller Hinton, extracto de levadura, piruvato de sodio y fosfato de potasio) se preparó en frascos de tapa a rosca con 300 ml cada uno, para luego ser esterilizado en autoclave (121°C, 1 atm, 15 min). Este preparado se fraccionó en placas de Petri de 90 mm de diámetro hasta un nivel de 4 mm de alto, lo que equivale aproximadamente a 25 ml de agar. A continuación se describe las cantidades de cada componente que se utilizaron para preparar este medio.

Extracto de levadura.....15 g
Medio Muller Hinton.....10 g

Glucosa.....	2 g
K ₂ HPO ₄	3 g
Piruvato de sodio.....	2 g
Agar.....	20 g
Agua destilada.....	1000 ml
pH.....	7

Preparación de tubos con medio BHI (Bain Heart Infusión)

Este medio se prepara en frascos de tapa a rosca con 100 ml cada uno y luego se fracciona en tubos de ensayo con 10 ml del caldo y esterilizar en autoclave (121°C, 1 atm, 15 min).

Fórmula (en gramos por litro)

Infusión cerebro de ternera.....	200
Infusión corazón vacuno.....	250
Peptona.....	10
Cloruro de sodio.....	5
Glucosa.....	2
Fosfato disódico.....	2,5
pH.....	7,4

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por técnica de microplaca

Para determinar la CIM primero se deben preparar el inóculo y el extracto que se describe a continuación:

-Preparación Inóculo: A partir de una placa MYPGP, con 48 h de incubación a 37 C en atmósfera de microaerofilia, se seleccionan 4 ó 5 colonias bien aisladas de igual morfología y se prepara una suspensión bacterianas en 9 ml de agua peptonada, luego se debe ajustar el inóculo a una DO de 0,1 equivalente a la escala de Mc Farland, esta DO se mide a 600 nm.

El control es agua peptonada estéril sin inocular.

-Preparación del Extracto: Se pesan cada una de las fracciones obtenidas por CCF.y se diluyen en 1 ml de DMSO. A partir de la suspensión se lleva a una concentración al 10 % de DMSO.

-Concentración Inhibitoria mínima (CIM): para medir la CIM se colocan 100 µl del medio BHI en una microplaca de 96 pocillos, luego se agregan 100 µl de la fracción al 10% en el pocillo 1, posteriormente se realizan diluciones seriadas hasta el pocillo 11 tomando 100 µl del primer pocillo y adicionándolo al siguiente. Se le Añade a cada pocillo 50 µl del inculo previamente preparado.

La micoplaca se incuba en microaerofilia a 37 °C durante 48 h y luego se adicionan 10 µl de rezarsurina al 0,01% en cada pocillo. La placa se incuba nuevamente durante 1 h/1:30 h en las mismas condiciones y se determina la CIM visualmente por cambio de color de azul (oxidado) a rosa (reducido por metabolismo microbiano). Para los controles se destina la última fila.

Control Positivo; se utiliza para medir viabilidad de la cepa. Se adicionan 100 µl del medio BHI más 50 µl del inculo bacteriano.

Control Negativo del DMSO 100%; se realiza para asegurarnos de que no exista cambio de color de la rezarsurina por acción del DMSO. Se adicionanan 100 µl de DMSO al 100% y 50 µl de rezarsurina.

Control Negativo del extracto al 15%; se realiza para controlar que la reducción de la rezarsurina no se deba al compuesto. Se adicionara a los 100 µl del DMSO 15%, 50 µl de rezarsurina.

Control Negativo del medio (BHI); se realiza para controlar que ningun componente del medio pueda estar reduciendo a la rezarsurina. Se adicionara a los 100 µl del medio BHI, 50 µl de rezarsurina .

La CIM se determinó como la última dilución donde no se reduce la rezasurina (es decir que permanezca de color azul). El color rosa (reducido) indica crecimiento del microorganismo.

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM): se inocula a partir de la microplaca, por triplicado, 20 µl de las concentraciones anteriores a la CIM, en placas conteniendo agar MYPGP incubándolas en las mismas condiciones anteriores. Se realiza el recuento en aquellas placas donde se visualicen entre 3 y 30 colonias por gota. Luego se determinar las UFC/ml utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \text{Promedio de colonias} \times \text{factor de volumen}$$

$$R_{to} = X \text{ de colonias} \times 50 \times \text{factor de dilución}$$

2.2 FUNDAMENTOS ELECTROQUÍMICOS Y QUIMIOMÉTRICOS UTILIZADOS EN LA DETECCIÓN DE TIMOL, CARVACROL Y EUGENOL EN MIEL

2.2.1 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

La electroquímica es una rama de la química que estudia la transformación entre la energía eléctrica y la energía química⁹⁹. Es decir, las reacciones químicas que se producen en la interfaz de un conductor eléctrico (llamado electrodo, que puede ser un metal o un semiconductor) y un conductor iónico (el electrolito) pudiendo ser una disolución y en algunos casos especiales, un sólido¹⁰⁰. Estas reacciones químicas en las que se produce una transferencia de electrones entre moléculas, se conocen como reacciones redox, y su importancia en la electroquímica es vital, puesto que mediante este tipo de reacciones se llevan a cabo los procesos que generan electricidad o, en caso contrario, son producidos como consecuencia de ella.

Las diferentes técnicas electroquímicas se clasifican en “estacionarias” o “no-estacionarias” según cómo dependa del tiempo (t) el potencial (E) y la corriente (i).

Técnicas Estacionarias: son aquellas cuyas variables i y E no son funciones de t.

Técnicas no Estacionarias: son aquellas donde la i y el E varían con el tiempo en forma periódica o no.

Además en un sistema electroquímico no se puede imponer de manera simultánea el valor de la corriente y del potencial, por lo que sólo se puede controlar una de ellas y la otra variable queda como grado de libertad, entonces dependiendo del tipo de control eléctrico que se ejerza sobre el sistema se puede clasificar a la técnicas electroquímicas en⁹⁹:

-Potenciostáticas: se controla el potencial manteniéndose constante, mientras que la corriente es una variable independiente, $i=f(t)$.

-Potenciodinámicas: en este caso se controla el potencial pero no es constante sino que es una función en el tiempo perfectamente conocido.

-Galvanostática: se controla la corriente, y el potencial es la variable independiente, $E=f(t)$.

En este estudio se emplearon dos técnicas potenciodinámicas: la voltamperometría de barrido cíclico de potencial (VC) y la voltamperometría de onda cuadrada (VOC).

- **a) Voltamperometría cíclica (VC):**

La VC es la técnica que más se utiliza para la adquisición de información cualitativa acerca de las reacciones electroquímicas, ya que provee rápidamente información sobre la termodinámica de los procesos redox, la cinética de las reacciones de transferencia electrónica heterogénea y sobre reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción. La VC es generalmente el primer experimento llevado a cabo en un estudio electroquímico, que permite una rápida localización de los potenciales redox de las especies electroactivas y una conveniente evaluación de los efectos del medio sobre los procesos redox.

En VC, la región del potencial de trabajo varía desde un valor inicial (E_i) hasta un valor final (E_f), pasando por un potencial donde se invierte el sentido del barrido del mismo, denominado potencial de corte (E_c) (Figura 13). El potencial aplicado al electrodo varía linealmente con el tiempo (Figura 13a). En este tipo de perturbación, la pendiente de la variación de potencial con el tiempo se conoce como “velocidad de barrido de potencial”, v . Cuando el barrido se aplica tanto en el sentido directo como en el inverso, es decir, realizando lo que se denomina un barrido triangular de potencial, la técnica se denomina voltamperometría cíclica y el gráfico de corriente-potencial resultante es conocido como voltamperograma cíclico. La Figura 13b y la ecuación 1 (Ec 1) muestra un voltamperograma típico que se obtiene para un proceso electroquímico simple, donde el sustrato (O) se reduce reversiblemente, bajo condiciones de difusión lineal semi-infinita y sólo O está presente al comienzo de la experiencia, $n^\circ e^-$ es el número de electrones, y R es el sustrato reducido.



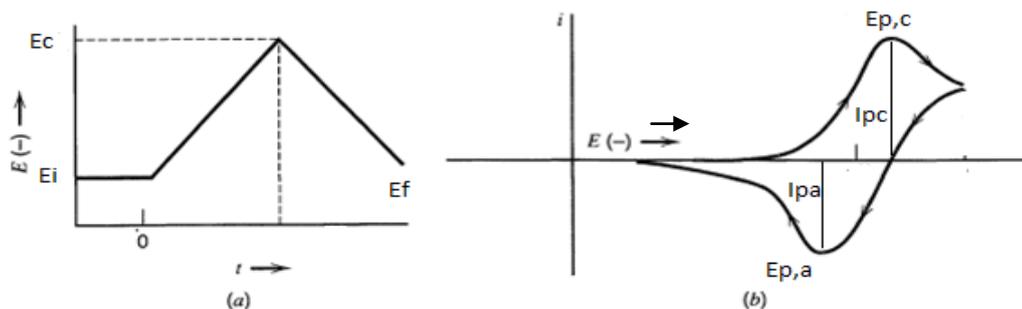


Figura 13: A) Señal de potencial de excitación utilizada en voltamperometría cíclica. B) Voltamperograma cíclico típico de un proceso redox reversible.

Cuando los procesos son reversibles, los voltamperogramas muestran cuatro parámetros importantes: la corriente de pico anódico (I_{pa}), el potencial de pico anódico (E_{pa}), que es el potencial al cual la corriente alcanza el máximo valor, y los correspondiente valores de corriente de pico catódica (I_{pc}) y potencial de pico catódico (E_{pc}), los cuales proveen las bases para el análisis de las respuestas voltamperométricas.

- 1) Procesos reversibles

Para un proceso redox como el descrito por la ecuación (Ec. 1), la corriente faradaica que se observa depende del flujo de las especies O y R. Así, la corriente está determinada por el flujo de O hacia la superficie del electrodo y, cuando la velocidad de transferencia electrónica heterogénea es alta, se cumple la ecuación de Nernst sobre la superficie del electrodo ($x = 0$). Luego, la corriente de pico (a 25°C) es descrita por la ecuación de Randles- Sevcik¹⁰⁰:

$$I_{pc} = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A Co^* D_o^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Ec } 2)$$

donde n es el número de electrones intercambiados por molécula, A es el área del electrodo en cm^2 , Co^* es la concentración de O en el seno de la solución en mol cm^{-3} , D_o es el coeficiente de difusión de O en $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y v es la velocidad de barrido de potencial en V s^{-1} . De acuerdo con esta ecuación, la corriente de pico es directamente proporcional a Co^* y a $v^{1/2}$.

Por otra parte, *Nicholson*¹⁰⁰ estableció una relación entre las corrientes de pico anódica (I_{pa}) y la de pico catódica (I_{pc}) a través de la siguiente ecuación (Ec 3):

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = \frac{(I_{pa})_o}{I_{pc}} + \frac{0,485(I_{sp})_o}{I_{pc}} + 0,086 \quad (\text{Ec } 3)$$

donde $(I_{pa})_0$ es la corriente de pico anódica medida con respecto al cero de corriente, $(I_{sp})_0$ es la corriente al potencial E_c medida también respecto del cero de corriente e I_{pc} es la corriente del pico catódico, medida también respecto del cero de corriente. La relación I_{pa}/I_{pc} es igual a 1 para una cupla redox simple como la representada en la (Ec.1). Cuando el valor de esta relación de corrientes se desvía de la unidad, indica que existen complicaciones cinéticas u otro tipo de complicaciones en el proceso de electrodo.

Por su parte, la posición del pico sobre el eje de potencial está relacionado con el potencial formal del proceso redox, E°_f . Para una cupla reversible está centrado entre E_{pc} y E_{pa} .

$$E^{\circ}_f \cong \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2} \quad (\text{Ec. 4})$$

y la diferencia entre los potenciales de pico anódicos y catódicos (ΔE_p) puede expresarse como:

$$\Delta E_p \cong E_{pc} - E_{pa} = \frac{0,059}{n} \quad a \ 25^{\circ}\text{C} \quad (\text{Ec 5})$$

De este modo, la diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico se puede utilizar para determinar el número de electrones transferidos en la reacción de electrodo. Un proceso de transferencia monoelectrónica rápida exhibe un ΔE_p de alrededor de 59 mV a 25 °C. Ambos potenciales de pico son independientes de la velocidad de barrido de potencial. Es posible relacionar el valor de potencial de pico (al cual la corriente es la mitad de la corriente de pico) ($E_{p/2}$), con el potencial de media onda del sistema, $E_{1/2}$.

$$E_{p/2} = E_{1/2} + \frac{0,028}{n} V \quad a \ 25^{\circ}\text{C} \quad (\text{Ec 6})$$

- II) Procesos irreversibles y cuasi-reversibles

En los casos en los que la transferencia electrónica es lenta (comparada con la velocidad de barrido de potencial), los procesos son llamados cuasi-reversibles o irreversibles. En estos procesos los picos individuales son de menor intensidad y la separación de los potenciales de pico es mayor respecto de los procesos reversibles (Figura 14 A yB)¹⁰⁰.

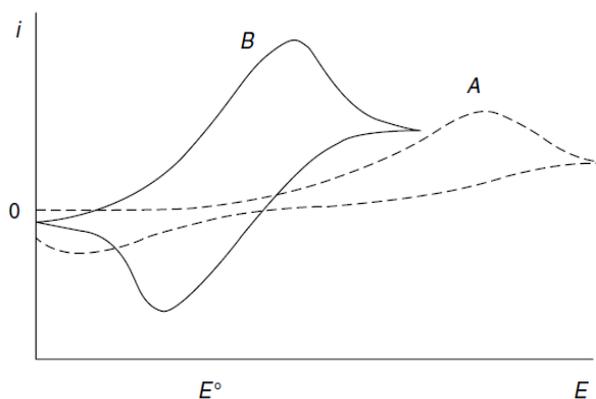


Figura 14: Voltamperogramas cíclicos para procesos redox. A) irreversibles y B) cuasi-reversibles.

En esta situación el potencial aplicado no resulta en la generación de las concentraciones predichas por la ecuación de Nernst. Esto ocurre porque la cinética de reacción es “lenta” y el equilibrio no se alcanza rápidamente (en comparación a la velocidad de barrido). Como consecuencia, el potencial de pico se desplaza, dependiendo de la velocidad de barrido, ya que la corriente requiere un tiempo mayor para responder al potencial aplicado que en el caso de procesos reversibles.

En los sistemas irreversibles, la relación entre el E_p y la v está dada por la siguiente ecuación:

$$E_p = E^\circ - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0,78 - \ln \left(\frac{k^\circ}{\sqrt{D}} \right) + \ln \sqrt{\left(\frac{\alpha n_a F v}{RT} \right)} \right] \quad (\text{Ec 7})$$

donde k° es la constante de velocidad estándar, α es el coeficiente de transferencia catódico, n_a es el número de electrones aparente involucrados en la etapa determinante de la velocidad del proceso global, R la constante molar de los gases, F la constante de Faraday y T la temperatura.

La corriente de pico catódica se expresa como:

$$I_{pc} = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad \text{a } 25^\circ\text{C} \quad (\text{Ec 8})$$

Por lo tanto para un proceso totalmente irreversible, la I_p sigue siendo proporcional a C_0 y $v^{1/2}$, pero E_p es una función de v desplazándose a valores más negativos a medida que v aumenta.

Para los sistemas cuasi-reversibles (con $10^{-1} > k^0 > 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$) la corriente es controlada tanto por la transferencia de carga como por el transporte de masa. La forma de los voltamperogramas cíclicos es una función de $k^0 / (\pi aD)^{1/2}$ (donde $a = nFv / RT$). A medida que $k^0 / (\pi aD)^{1/2}$ se incrementa, el proceso se aproxima al caso reversible. Para valores pequeños de $k^0 / (\pi aD)^{1/2}$, el sistema exhibe un comportamiento irreversible.

En sistemas más complejos, por ejemplo, con reacciones químicas homogéneas acopladas al proceso de transferencia de carga, la respuesta electroquímica difiere con respecto a la de un sistema simple. Los criterios de diagnóstico utilizados para su caracterización se basan, por lo general, en las variaciones de E_p y la I_p con respecto a la concentración en el seno de la solución y la velocidad de barrido de potencial, la relación I_{pa} / I_{pc} , etc., que adoptan características propias según el mecanismo particular de que se trate.

IIa) Mecanismo Electroquímico-Químico-Electroquímico (EQE): entre los sistemas complejos tenemos los mecanismos EQE, estos mecanismos son los más importantes en electroquímica orgánica. Para una reacción química acoplada, irreversible y de primer orden, puede representarse por:



las etapas electroquímicas están caracterizadas por los potenciales estándares E°_1 y E°_2 , respectivamente y P es un producto estable. En estos casos los perfiles i-E no dependen sólo de la relación entre k y la v de barrido de potencial, sino también de la separación de los potenciales estándar.

En los voltamperogramas se observarán dos picos en los barridos catódicos, correspondientes a las cuplas O/R₁ y P/R₂, y en los barridos anódico se observarán los picos correspondiente a la oxidación de R₂ a P, pero sólo se observará una pequeña onda para la oxidación de R₁ a O. Claramente, para esta reacción, la constante de velocidad química es “rápida” en comparación con la velocidad de barrido de potencial, por lo que todo el R₁ reacciona rápidamente para generar el producto P.

- **b) Voltamperometría de onda cuadrada (VOC)**

Las técnicas de pulsos de potencial, entre las cuales se encuentran las voltamperometrías de pulso normal, pulso diferencial y la de Osteryoung o

voltamperometría de onda cuadrada (VOC)¹⁰¹, se utilizan para obtener bajos límites de detección al aumentar la relación de la corriente faradaica (I_f) respecto de la corriente capacitiva (I_c). La diferencia entre las distintas técnicas de pulso es la forma en que se modifica el potencial en el tiempo (onda de excitación) y el tiempo en que se realiza el muestreo de corriente¹⁰⁰.

La onda de excitación que se aplica en VOC se muestra en la Figura 15. La forma de la onda consiste en una onda cuadrada simétrica, de amplitud ΔE_{oc} , superpuesta sobre un barrido de escalera, ΔE_e , donde un periodo completo de la onda cuadrada ocurre para cada periodo, τ , del barrido de escalera. Así, el ancho de pulso o tiempo de pulso, igual a $\tau/2$ se designa como t_p y la frecuencia, igual a $1/\tau$, como f . La corriente se muestrea dos veces durante cada ciclo de la onda cuadrada: durante la última porción de cada hemiciclo, esto es, una vez al final del pulso directo y una vez al final del pulso inverso, de manera tal que las corrientes capacitivas decaigan a un valor prácticamente despreciable. Si m es el número de hemiciclos aplicados, la corriente de los hemiciclos directos, con $m=1,3,5\dots$, se denomina corriente directa (I_d) y a la de los hemiciclos inversos, con $m=2,4,6\dots$ corriente inversa (I_i). La corriente diferencial o neta (I_n) para cada ciclo se define como $I_n = I_d - I_i$, con lo que se obtiene una corriente libre de I_c .

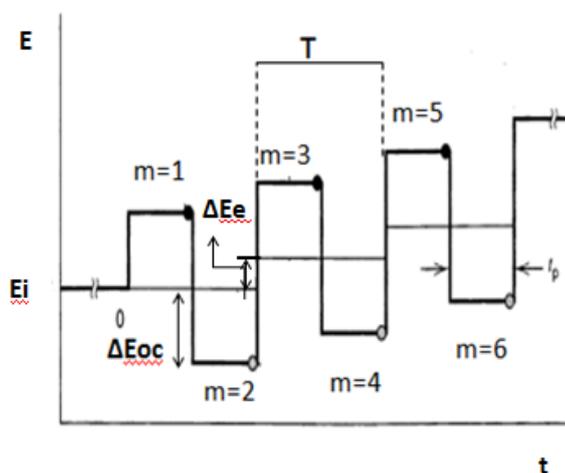


Figura 15: Programa De Saltos De Potencial Aplicado Al Electrodo De Trabajo En Un Experimento De VOC. ΔE_{oc} : Amplitud De La Onda Cuadrada, ΔE_e : Salto De Escalera, T: Periodo De La Onda Cuadrada, t_p : Tiempo De Pulso.

El resultado de VOC son tres voltamperogramas que muestran las corrientes directas, inversas y netas en función del potencial de barrido de escalera.

Debido a que la corriente se muestrea en ambos pulsos, en el mismo experimento se obtienen los picos correspondientes a la oxidación y reducción de las especies electroactivas sobre la superficie del electrodo. Por ser de signos opuestos, la diferencia entre I_d y I_i resultan en una mayor I_n , lo que le confiere una sensibilidad mayor para sistemas reversibles o cuasi-reversibles. Esta ventaja de la VOC respecto de las otras técnicas de pulso se pierde cuando la reversibilidad del sistema disminuye¹⁰⁰.

En la Figura 16 se muestra la respuesta que se obtiene para un sistema redox reversible controlado por difusión.

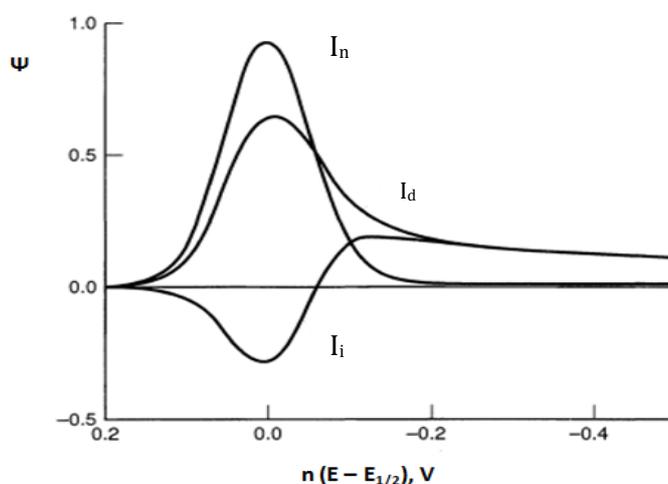


Figura 16: Voltamperograma de onda cuadrada para una transferencia electrónica reversible con corrientes adimensionales directas I_d , inversa I_i y neta I_n normalizadas.

Entre las ventajas que presenta la VOC es que la I_n no depende de la geometría del electrodo, ni de las complicaciones cinéticas homogéneas acopladas a la transferencia de carga, ni del transporte de material conectivo.

La teoría de VOC para distintos sistemas redox está descrita en el trabajo de *Osteryoung y col*¹⁰¹.

2.2.1.1 INSTRUMENTAL

Las mediciones electroquímicas se llevaron a cabo utilizando un potenciostato / galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30, acoplado a una PC que posee el software GPES, versión 4.9 (Eco Chemie, Utrech, Países Bajos).

2.2.1.2 CELDA ELECTROQUÍMICA

Se emplearon celdas electroquímicas convencionales de vidrio de tres electrodos con un volumen de 20ml. Las mismas constan de un cuerpo principal cilíndrico de vidrio Pyrex de fondo plano, que lleva inserto en su interior muy próximo a las paredes, un tubo burbujeador de vidrio para N₂. La tapa de teflón soporta, mediante orificios practicados verticalmente, los tres electrodos convencionales: electrodos de trabajo (ET), contraelectrodo (CE) y electrodo de referencia (ER). Como ET se utiliza un electrodo de Carbono Vítreo (CV) de 0,07 cm² de área (marca BAS). El ET fue sometido a un pretratamiento previo que consistió en un pulido mecánico a espejo sobre un paño húmedo conteniendo alúmina. Posteriormente, el ET se colocó en un recipiente con agua destilada y se sometió a un baño de ultrasonido por un minuto para eliminar los restos de alúmina. Como ER se utilizó un electrodo de Calomel saturado (ECS) y como CE una chapa de platino de 2 cm² de área.

2.2.1.3 REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Se utilizan los siguientes reactivos en la preparación de las soluciones de trabajo, los cuales no se someten a ningún proceso de purificación previo:

Carvacrol(CA), marca SIGMA; Timol (TI), marca SIGMA; Eugenol (EU), marca ALDRICH; Acetonitrilo (marca Fisher Scientific); NaH₂PO₄ (marca Merck); Na₂HPO₄ (marca Merck); NaOH (marca Merck); H₃PO₄ (marca Aldrich)

Las muestras de miel fueron provistas por el Sector Apícola de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

El preparado de soluciones se detalla a continuación:

- Se prepararon soluciones stock de TI, CA y EU de concentración 0,01 M. Las mismas se prepararon por pesada y se disolvieron en acetonitrilo. Las soluciones de trabajo de los compuestos puros y de las mezclas de los mismos se preparan por diluciones sucesivas de las soluciones stock en solución reguladora de fosfato de pH 10.
- Muestras de miel contaminadas: se prepararon a partir de 3,75 g de muestra a la cual se le adicionaron cantidades conocidas de cada uno de los compuestos en estudio; se mezclaron hasta homogeneizar y se diluyeron en solución reguladora de fosfato de pH 10, se filtró y enrasó a 25 ml.
- Las soluciones reguladoras de fosfato de pH 2, 5,8 y 13 se prepararon tomando diferentes volúmenes de una solución de H₃PO₄ 0,1M y de una solución de NaOH 0,5M hasta ajustar el pH.

Para la preparación de la solución reguladora de fosfato de pH 10 se procedió de la siguiente manera: se mezcló 10 mL de una solución 0,01 M de NaH_2PO_4 y 45 mL de una solución 0,4M de Na_2HPO_4 . Se ajustó a pH 10 mediante el agregado NaOH cuando fue necesario y se enrasó a 100 mL.

2.2.2 TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS

La quimiometría es una disciplina científica dirigida específicamente a aquellos procesos que transforman señales y datos analíticos complejos en información. Para ello utiliza métodos matemáticos, estadísticos y los de la lógica formal. Esta disciplina se divide en diferentes áreas que incluyen: el diseño experimental y optimización de los parámetros experimentales e instrumentales pertinentes, la preparación y transformación de datos para futuros tratamientos de datos, y la determinación de las concentraciones a través de la implementación de modelos de calibración multivariada^{102,103}.

*M. Esteban et al*¹⁰⁴ investigaron sobre la aplicación de los métodos quimiométricos en electroquímica como herramienta para resolver problemas electroanalíticos ya que estos autores sostienen que es muy difícil postular un modelo físico-químico teórico puramente electroquímico para resolver por ejemplo, dos señales superpuestas, debido a la complejidad del proceso de electrodo, los fenómenos de transporte y la perturbación provocada por la señal de excitación, entre otros. Entonces una alternativa puede ser utilizar la quimiometría ya que esta se basa en la extracción de resultados y / o la identificación de modelos de análisis numérico y estadístico de los datos, en lugar de ajustar los parámetros de un modelo teórico con los datos experimentales.

A continuación, se realiza una breve descripción de la aplicación de la quimiometría a datos electroquímicos. En particular, se hace referencia a las técnicas de análisis multivariado: el método de cuadrados mínimos (PLS-1), y el método no lineal, redes neuronales artificiales (RNA).

- **a)Método de cuadrados mínimos parciales (PLS-1)**

Estos métodos tienen ventajas intrínsecas cuando se los compara con métodos univariados. Todas las variables relevantes se incluyen en el modelo PLS. En el modelo PLS-1 se considera una variable dependiente, representada por el vector y . Cuando se consideran más de una variable dependiente, el modelo se denomina PLS-2, y las variables se representan por una matriz Y . La suposición básica de todos estos modelos es que el sistema o proceso estudiado depende de un número pequeño de variables latentes (VL).

Este concepto es similar al de componentes principales. Las variables latentes son estimadas como combinaciones lineales de las variables observadas.

En los modelos PLS, se establece una representación de la matriz X en término de estas VL:

$$X = TPT + E \quad (\text{Ec. 9})$$

donde T representa “scores” (resultados); y PT “loadings” (cargas).

La matriz X se descompone en un número de “variables latentes”, cada una caracterizada por un vector t y un vector pT. De esta forma, es posible representar una matriz X (dentro de un cierto error) por una matriz T con un número menor de columnas.

Si se incluyen todas las variables latentes, el error es cero ($E = 0$). El modelo PLS-1 se desarrolla de modo que las primeras variables latentes (t_1, t_2, \dots) son las más importantes para explicar el vector y en el conjunto de calibración. El número de variables latentes, necesarias para explicar la matriz X (dentro de un error máximo permitido), es una medida de la complejidad del modelo. Otros vectores calculados durante la etapa de calibración son wT (“pesos” en el espacio de X), y b (“sensibilidades”), la relación entre y y T es:

$$y = Tb + f \quad (\text{Ec. 10})$$

donde b se calcula de modo de minimizar f, el vector error en esta expresión.

Los vectores wT , pT, y b son necesarios para predecir la propiedad dependiente y para un nuevo conjunto de muestras. En ese caso, se determina experimentalmente X y se calcula (utilizando los vectores w y p) la matriz T. Por último se estima el vector y usando los coeficientes b previamente calculados durante la calibración:

$$y_{\text{pred}} = Tb \quad (\text{Ec. 11})$$

- **b) Redes neuronales artificiales (RNA)**

El modelo de redes neuronales es un conjunto de elementos simples conectados entre sí y entre los que se envía información a través de las conexiones. La importancia de estudiar su uso reside en dos aspectos relevantes: i) la RNA, al simular una red neuronal biológica, se considera una nueva arquitectura de computación y una nueva arquitectura de algoritmización relativas a la computación convencional; ii) permite, usando operaciones computacionales simples (adiciones, multiplicaciones y elementos lógicos fundamentales) resolver problemas complejos, no lineales, etc. Un algoritmo convencional utiliza un conjunto de ecuaciones complejo y se aplica sólo a un problema determinado, mientras

que, una RNA es computacional y algorítmicamente simple y tiene características de auto organización que permiten su aplicación a conjunto de problemas más amplio.

El desarrollo de las RNA tiene dos etapas: la fase de entrenamiento donde se usan los datos experimentales para hacer que la red se ajuste al fenómeno físico a imitar y, la fase de prueba donde se comparan valores críticos de la realidad con la aproximación de la red.

El entrenamiento es posible gracias a la capacidad de aprendizaje de las RNA. El aprendizaje de una red es un proceso por el cual los parámetros libres de una RNA se ajustan a través de un proceso continuo de estimulación por parte del entorno donde se sitúa el sistema. Para una misma topología de RNA se puede trabajar con diferentes formas de aprendizaje, esto permite aumentar el área de trabajo de las mismas¹⁰⁵.

A continuación se describen parte de los componentes de una neurona artificial (Figura 17).

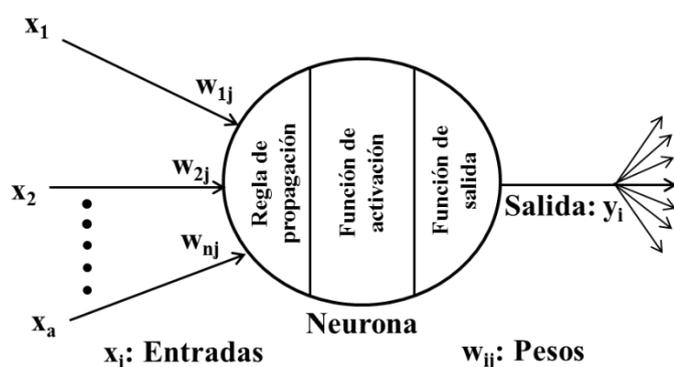


Figura 17: Elementos básicos de una neurona artificial

Entradas y pesos

Normalmente, una neurona recibe muchas y múltiples entradas (x_j) simultáneas. Cada entrada tiene su propio peso relativo, el cual proporciona la importancia de la entrada dentro de la función de agregación de la neurona. Estos pesos realizan la misma función que realizan las fuerzas sinápticas de las neuronas biológicas. En ambos casos, algunas entradas son más importantes que otras, de manera que tienen mayor efecto sobre el procesamiento de la neurona al combinarse para producir la respuesta neuronal.

Los pesos son coeficientes que pueden adaptarse dentro de la red y determinan la intensidad de la señal de entrada registrada por la neurona artificial. Ellos son la medida de la fuerza de una conexión de entrada. Estas fuerzas pueden ser modificadas en respuesta de

los ejemplos de entrenamiento, de acuerdo a la topología específica o debido a las reglas de entrenamiento.

Función de propagación

Esta regla permite obtener, a partir de las entradas y los pesos, el valor del potencial pos sináptico h_i de la neurona:

$$h_i(t) = \sigma_i(w_{ij}, x_j) \quad (\text{Ec. 12})$$

La función de propagación puede ser compleja. Las entradas y los pesos se pueden combinar de diferentes maneras antes de pasarse el valor a la función de activación. Por ejemplo, podemos usar como función de propagación el mínimo, máximo, o diversos algoritmos de normalización. El algoritmo específico para la propagación de las entradas neuronales está determinado por la elección de la arquitectura.

La función de propagación que se utiliza habitualmente es la suma ponderada de todas las entradas. Las entradas y pesos se pueden agrupar en dos vectores (x_1, x_2, \dots, x_n) y $(w_{1j}, w_{2j}, \dots, w_{nj})$ y calcular la suma realizando el producto escalar sobre estos dos vectores.

$$h_i(t) = \sum_j w_{ij} x_j \quad (\text{Ec. 13})$$

FUNCIÓN DE ACTIVACIÓN O TRANSFERENCIA

El resultado de la función de propagación que, en la mayoría de los casos es una suma ponderada, se transforma en la salida real de la neurona mediante un proceso algorítmico conocido como función de activación:

$$a_i(t) = f_i(t-1, h_i(t)) \quad (\text{Ec. 14})$$

En este caso la función de activación depende del potencial pos sináptico, $h_i(t)$, y del propio estado de activación anterior. Sin embargo, en muchos modelos de RNA se considera que el estado actual de la neurona no depende de su estado anterior $a_i(t-1)$, sino únicamente del actual.

$$a_i(t) = f_i(h_i(t)) \quad (\text{Ec. 15})$$

En la función de activación el valor de la salida de combinación se puede comparar con algún valor umbral para determinar la salida de la neurona. Sólo, si la suma es mayor que el valor umbral, la neurona generará una señal.

Escalamiento y limitación

El valor de salida de la función de activación se puede procesar de manera adicional mediante un escalamiento y un mecanismo de limitación. El escalamiento simplemente

multiplica el valor de la función de transferencia por un factor de escala y después se le suma un desplazamiento. El mecanismo de limitación es el que asegura que el resultado del escalamiento no exceda una cota superior o inferior. Esta limitación se realiza de manera adicional a los límites que puede imponer la función de transferencia original.

Función de salida (competitividad)

Cada elemento de procesamiento tiene permitido una única salida, $y(t)$, que puede estar asociada con un número elevado de otras neuronas. Normalmente, la salida es equivalente al valor resultante de la función de activación.

$$y_i(t) = F_i(a_i(t)) = a_i(t) \quad (\text{Ec. 16})$$

Función de error y el valor propagado hacia atrás

En la mayoría de los algoritmos de entrenamiento de redes neuronales se necesita calcular la diferencia entre la salida actual y la esperada. Esta diferencia se transforma, por la función de error correspondiente, a la arquitectura particular.

Tasa de aprendizaje

La tasa de aprendizaje de la RNA depende de distintos factores controlables que hay que tener en cuenta. Un valor bajo equivale a que se necesite gastar mucho tiempo para llevar a cabo el entrenamiento para producir una RNA bien entrenada. Por el contrario, con valores de entrenamiento mayores la red puede no ser capaz de discriminar de manera tan adecuada, como un sistema que aprende más despacio.

Generalmente, se deben considerar factores adicionales a parte del tiempo cuando se discute el entrenamiento off-line:

- Complejidad de la red: tamaño, paradigma, arquitectura
- Tipo de algoritmo de aprendizaje empleado.
- El error admitido de la red final.

Si cambiamos alguno de estos factores podemos aumentar el tiempo de entrenamiento a un valor elevado u obtener un error inaceptable.

Arquitecturas de Redes Neuronales

Se denomina arquitectura a la topología, estructura o patrón de conexión de una red neuronal. En una RNA los nodos se conectan por medio de sinapsis, esta estructura de conexiones sinápticas determina el comportamiento de la red. En general, las neuronas se suelen agrupar en unidades estructurales que se denominan capas. Finalmente, el conjunto de una o más capas constituye la red neuronal.

Se distinguen tres tipos de capas:

- De entrada: compuesta por neuronas que reciben datos o señales procedentes del entorno.

- Oculta: es aquella que no tiene conexión directa con el contorno, es decir, que no se conecta directamente ni a órganos sensores ni a efectores.

- De salida: es aquella cuyas neuronas proporcionan la respuesta de la red neuronal.

Las conexiones entre las neuronas pueden ser excitatorias o inhibitorias: un peso sináptico negativo define una conexión inhibitoria, mientras que uno positivo determina una conexión excitatoria.

Los componentes de las RNA descritos anteriormente son válidos aun cuando la neurona se utilice en la entrada, salida, o capa oculta.

Las conexiones intra-capas, también denominadas laterales, tienen lugar entre las neuronas pertenecientes a una misma capa, mientras que las conexiones inter-capas se producen entre las neuronas de las diferentes capas. Existen además conexiones realimentadas, que tienen un sentido contrario al de entrada-salida. En algunos casos puede existir realimentación incluso de una neurona consigo misma.

Atendiendo a todos estos conceptos, se puede establecer distintos tipos de arquitecturas neuronales:

- Redes monocapa: son aquellas compuestas por una única capa de neuronas.

- Redes multicapa (layered networks): son aquellas cuyas neuronas se organizan en varias capas.

Atendiendo al flujo de datos en la red neuronal, podemos hablar de:

- Redes unidireccionales (feedforward): la información circula en un único sentido desde las neuronas de entrada a las de salida.

- Redes recurrentes o realimentadas (feedback): la información puede circular entre las capas en cualquier sentido

Validación de los resultados

Para la evaluación del comportamiento de las redes durante los entrenamientos se utiliza el error cuadrático medio normalizado (mean squared normalized error, mse).

Por otro lado, para evaluar la calidad de los resultados alcanzados por las distintas redes neuronales se utilizan distintos criterios, como el error cuadrático medio (root mean square error, RMSE) entre las concentraciones nominales y las predichas para cada analito, y los errores relativos porcentuales, ecuación 17 y ecuación 18, respectivamente:

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - c_i)^2}{n}} \quad (\text{Ec. 17})$$

$$\text{REP}(\%) = \frac{100}{c_{\text{mean}}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - c_i)^2}{n}} \quad (\text{Ec. 18})$$

dónde \hat{c}_i y c_i son las concentraciones estimadas y nominales respectivamente, y c_{mean} es la concentración nominal medida.

2.3 NANOPARTICULAS DE ORO (AUNPS) PARA LA DETECCION DE TIMOL Y CARVACROL EN ACEITES ESCENCIALES.

2.3.1 FORMACION DE AUNPS

Para obtener nanopartículas de oro se utiliza un método químico, que consiste en la reducción de una sal de oro Au(III) a Au(0) por agentes reductores. Las (AuNPs) poseen propiedades ópticas, producto del fenómeno conocido como Resonancia del Plasmón Superficial (SPR) característico de nanopartículas metálicas con un tamaño inferior a 100 nm¹⁰⁶. Se ha demostrado también que este fenómeno depende del tamaño, forma, constante dieléctrica del medio y de las interacciones entre partículas^{107,108}.

El tamaño y forma dependen de varios factores: agentes reductor empleado, pH del medio y agente estabilizante. A continuación se comentará la influencia de cada uno de ellos en la formación de AuNPs.

- Agente reductor: debido a que el potencial redox del oro es alto, la lista de compuestos capaces de reducir el oro es extensa, por lo que los fenoles como Timol y Carvacrol, son excelentes candidatos y los utilizados en esta tesis para la formación de nanopartículas de oro.

- Agente estabilizante: casi todas las técnicas de formación de nanopartículas tienen en común el uso de un agente que detenga el crecimiento de las partículas en la escala nanométrica, conocido como agente estabilizante¹⁰⁶. Los primeros compuestos en utilizarse y en ocasiones los mas empleados son los polímeros naturales (gelatina y dextrina), los tensioactivos iónicos: cloruro de cetil-trimetilamonio (CTAC), Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y Bis-1,4-bis (2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio (AOT), los polielectrolitos sintéticos solubles en agua (policarbonatos, polisulfonatos y polifosfatos) y los polímeros sintéticos (polivinilalcoholes, polivinilpirrolinonas, poliacrilamidas). Sin embargo en algunas ocasiones, la presencia de estos compuestos en la superficie del metal

puede afectar las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas de forma indeseada, por lo que en ocasiones se ha optado por la síntesis de partículas estabilizadas por fuerzas electroestáticas, de manera que la superficie este libre para cualquier proceso químico o físico al que se desee someter. El mejor ejemplo de este tipo de nanopartículas estabilizadas por fuerzas electroestáticas, son aquellas producidas mediante la reducción con citrato¹⁰⁹ (Figura 18).

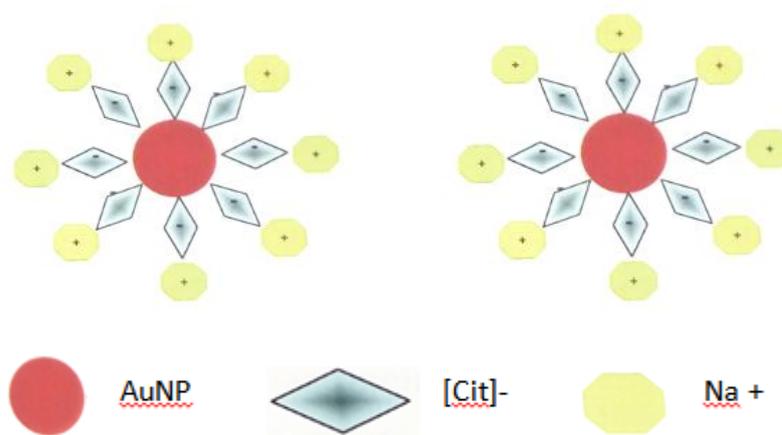


Figura 18: Estabilización de las AuNPs por el citrato de sodio a través de fuerzas electroestáticas. el citrato que se encuentre en exceso después de la reacción, se adsorbe en la superficie de la nanopartícula, manteniendo la dispersión debido a las fuerzas de repulsión entre sí y a las de atracción hacia el ión Na⁺.

- **pH del medio:** En el método propuesto por *Shiraishi y col.*¹¹⁰, para la síntesis de nanopartículas intervienen, básicamente, tres sustancias precursoras: ión citrato, el tetracloruro de oro y agua. En esta síntesis está establecido el doble papel del citrato, como estabilizador y como agente reductor, pero el citrato es una base débil reconocida, lo que implica que si varía la concentración de ión citrato también se altera el pH del medio. De igual forma se conoce que la reactividad de los complejos de oro, la fuerza intermolecular entre la superficie de las AuPNs y los grupos del ion citrato son dependientes del pH del medio. Así, se estudiaron los cambios de color presentados por las nanopartículas de oro modificadas con ácido-3 mercaptopropanoico al cambiar bruscamente el pH del medio mediante adiciones sucesivas de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, observando que en el medio ácido la disolución coloidal se tornaba morada, implicando la formación de agregados, y que en medio básico recuperaba la tonalidad rojiza, lo que implica el des-

agregado de las partículas¹¹¹. También se estudió la capacidad de formar nanopartículas de distintas formas y tamaños mediante la modificación del pH del medio mediante la variación de la concentración del ión citrato, se encontró que las mejores condiciones para producir nanopartículas esféricas y con una poca variación del tamaño promedio se encuentra a pH básico, de igual manera se puso de manifiesto que los mecanismos de reacción son distintos en medio básicos y ácidos. A pH por encima de 6,5 el mecanismo que sigue la reacción es la nucleación y crecimiento, mientras que a pH por debajo de 6,5 la reacción sigue el mecanismo de nucleación, aglomeración y suavizado^{109,111} (Figura 19).

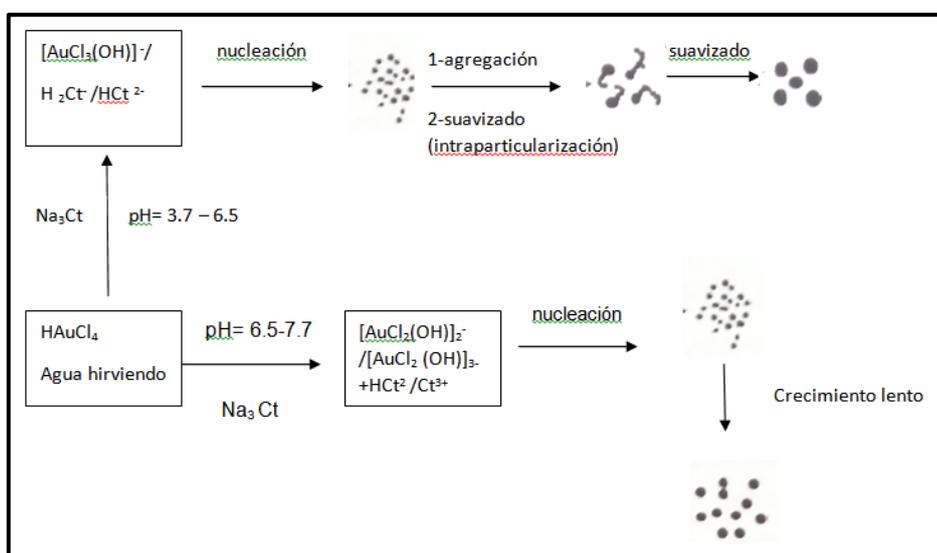


Figura 19: esquema de los posibles mecanismos de reacción que puede seguir la formación de nanopartículas de oro por reducción con citrato de sodio, de acuerdo al pH.

2.3.2 REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA FORMACIÓN DE AUNPS

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron de grado analítico y sin previas purificaciones. Timol (TI), carvacrol (CA), reactivo de Folin-Ciocalteu, cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC, 25% en agua), tetracloroaurato de hidrógeno ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99,9%), citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Hidrogeno fosfatodisódico anhidro y el dihidrogeno fosfato sódico monohidrato fueron adquiridos de Sigma-Aldrich se obtuvieron de Sigma Aldrich (Darmstadt, Alemania, www.sigmaaldrich.com). Se prepararon soluciones madre estándar de TI y CA ($1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) en metanol (Panreac, Barcelona, España, www.itwreagents.com). Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente mediante una dilución en serie precisa de la solución madre de TI y CA utilizando una

solución reguladora de pH. Las soluciones madre de CTAC (0,1 M), citrato de sodio (0,3 mM) y tetracloroaurato de hidrógeno (50 mM) se prepararon en agua. Los aceites esenciales (*Thymus vulgaris* y *Oreganum vulgare*) se compraron en tiendas locales (Alcalá de Henares, España).

Todas las soluciones se prepararon en agua Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania, www.merckmillipore.com).

2.3.3 PROCEDIMIENTO UTILIZADO PARA LA FORMACIÓN DE AuNPS .

Se utilizó el método publicado por *Scampicchio et al.*¹¹², tomando un volumen determinando de tampón fosfato de pH variable y concentración $1,0 \times 10^{-2}$ M, sobre la cual se agrega, en primer lugar, el tensioactivo CTAC, a continuación un volumen determinado de la disolución de la sal de Au(III), el agente limitador (citrato de sodio) y por último el agente reductor (analito o muestra de interés) que da lugar a la formación de nanopartículas de oro (AuNPs), cabe aclarar la importancia de respetar este orden para la formación de las misma.

El volumen final de trabajo es de 500 μ L y las concentraciones finales utilizadas para la formación de las nanopartículas de oro fueron: $3,7 \times 10^{-3}$ M de CTAC, 1×10^{-3} M de la solución de Au(III), 2×10^{-4} M de citrato de sodio y variable en el caso del analito patrón puesto que dependerá de su poder reductor. Una vez mezclado todo, la disolución resultante se mezcló y se agitó durante 2 minutos en un agitador para ependorf y se calienta a 45°C durante 10 minutos en un baño de agua. La formación de nanopartículas de oro se monitorea por espectrofotometría de UV a 550nm.

Los aceites esenciales se analizaron de la misma manera, pero tomando un volumen conocido de ellos.

Para trabajar a pH 9, se tomó un volumen conocido cada aceite esencial (5 μ L para *Thymus vulgaris* y 0,3 para *Oreganum vulgare*) y se diluyeron en metanol (volumen final de 500 μ l). Luego se tomaron 80 μ L de estas soluciones y se mezclaron con 420 μ L de solución reaccionante. A pH 12, se tomó un volumen conocido de cada aceite esencial (0,4 μ l para *Thymus vulgaris* y 0,3 para *Oreganum vulgare*) y se diluyeron en metanol (volumen final de 500 μ l). De esta solución se tomaron 30 μ L y se mezclaron con 470 μ L de solución reaccionante.

2.3.4 INSTRUMENTAL

Las mediciones de absorbancia para el ensayo colorimétrico se realizaron con un espectrofotómetro Perkin Elmer, matriz de diodos Lambda 35 (Wal t Ham, MA, EE. UU., Www.perkinelmer.com). utilizando cubetas de cuarzo con capacidad de 0,7mL y 10mm de paso óptico.

Las medidas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizaron utilizando un Microscopio de Transmisión Electrónica Zeiss EM10C.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DEL EXTRACTO HEXANICO DE *ACHYROCLINE SATUREIODES*

3.1.1 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se recolectó en los meses de enero y febrero de 2015 y 2016 período en el cual esta planta florece. Se recolectó en las sierras de Córdoba, Santa Mónica.

3.1.2 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO HEXANICO COMPLETO (EHC)

Se obtuvo la fracción de hexano, el cual tuvo un peso de 1,3251 g con un rendimiento de 0,66% p/p. Este rendimiento fue menor al obtenido anteriormente en este grupo de investigación, el cual fue de 0,75% p/p, pero esto puede deberse a variaciones propias de la composición de la planta dado que la recolección de la misma fue en años diferentes.

Como las plantas son matrices complejas que contienen una gama de metabolitos secundarios con diferentes grupos funcionales y polaridades, para extraerlos se utilizan solventes orgánicos con polaridades diferentes^{113,114}. Entonces, luego de haber macerado el vegetal seco y haber obtenido el EHA del cual se obtuvo el EA, a éste se le realizan sucesivas extracciones líquido-líquido, con solventes de polaridad creciente (hexano, tolueno, éter etílico) durante una semana cada extracción.

Estos extractos fueron obtenidos y estudiados dando como resultado actividad antimicrobiana. En estudios previos, se determinó que la fracción hexánica es la que posee mayor actividad inhibitoria contra cepas de *P.larvae*^{48,115} Por lo que primeramente trabajamos con dicha fracción.

3.1.3 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EHC

Con el fin de evaluar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios asociados con la actividad biológica, se realizó un análisis fitoquímico preliminar del EHC de las hojas y tallos de *A. satureioides* mediante diferentes reacciones de coloración, precipitación y cromatografía en capa delgada (CCD). Los resultados positivos fueron los ensayos para determinar Flavonoides, Taninos, naftoquinonas y/o antraquinonas y estereoides y/o triterpenoides, los cuales se resumen en Tabla 3.

Tabla 3 Resultados del análisis fitoquímico preliminar de la fracción hexánica

PRUEBA	RESULTADOS
Flavonoides	
-Cianidina	+++
- HCl	++
Naftoquininas y/o antraquinonas	
– reacción de Borntrager	+++
Taninos	
- FeCl ₃ al 10%	+++
Esteroides y/o Triterpenoides	
- Reactivo de Liebermann-Burchard	++

NOTA: +++ = Presente en abundancia. ++= Presente en mediana cantidad.

Con estos resultados podemos ver que la “Marcela de Campo”, posee flavonoides, donde la reacción de cianidina que indica la presencia de flavonas, flavonoles, flavononas, flovonoles e isoflavonas, dio positiva con abundante presencia, y el reconocimiento de leucoanticianidina con HCl 10%, si bien dio positivo, está presente en mediana cantidad. Estos ensayos fueron reconocidos por la aparición de una coloración rojiza tal como se describió en el capítulo de “Fundamentos y Metodología” y tal se muestra en la Figura 20.

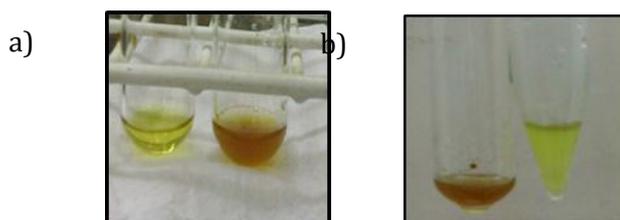


Figura 20: Reacción De Cianidina (a) Y Reaccion De Leucoanticianidina (b)

En cuanto a la presencia de taninos, también dio positivo con abundante presencia de coloraciones intensas en la gama del verde oscuro o marrón. En la Figura 21 se puede ver el ensayo

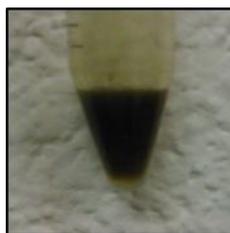


Figura 21: Reacción De Precipitación Para El Reconocimiento De Taninos

En el ensayo para detectar naftoquinonas y antraquinonas, se observó una coloración roja en la capa alcalina, la cual es indicador de una reacción positiva para estas sustancias. ésta indicó una abundante presencia de estos compuestos.(Figura 22)



Figura 22: Reacción De Bomtrager-Krauss

Por último, se observó la presencia en cantidades moderadas de esteroides y triterpenoides, donde el método empleado para este ensayo fue explicado en el anterior capítulo.

En resumen, se puede concluir que el EHC posee, principalmente, compuestos pertenecientes a las familias de los flavonoides, taninos, naftoquinonas y en menor proporción esteroides.

3.1.4 CCD PARA EL ESTUDIO DE SOLVENTES ÓPTIMOS PARA LA SEPARACIÓN DE COMPUESTOS DEL EHC.

En primer lugar se realizó un screening para determinar el sistema de solventes de baja polaridad que mejor resolvía las bandas de la fracción, es decir aquel que permitiera obtener un punto medio entre las bandas cercanas (es decir la suma de los R_f de las bandas contiguas, dividido por 2) aproximado a un valor de 0,35 o un ΔR_f de 0,35¹¹⁶. En la Tabla 4 se muestran los ΔR_f de las bandas detectadas para el EHC con las diferentes proporciones de la mezcla de solvente.

Tabla 4 Resultados de los ΔR_f .

Sistema de Solventes (Hexano:Acetona)	EHC, ΔR_f
7.5:2.5	0,42
8:2	0,309
8.5:1.5	0,22

Los estudios realizados arrojaron como resultado que el sistema que contenía la proporción 8:2 de hexano:acetona fue el que cumplió con estas condiciones. Luego se revelaron bajo luz UV a 254 nm las fracciones obtenidas con la cromatografía, y se observaron bandas bien definidas cuyos R_f se muestran en la Figura 23.

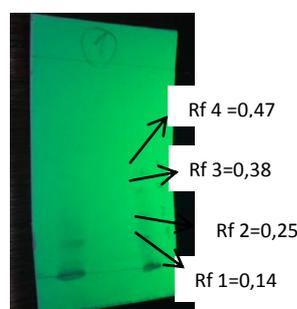


Figura 23: Bandas Observadas En CCD De EHC

Como se puede observar, se obtuvieron 4 bandas bien definidas cuyos R_f se muestran en la figura. *Heredia*⁴⁸, usando el mismo sistema de solventes obtuvo resultados similares. Sin embargo, *González*⁵⁵ obtuvo un número diferente de bandas utilizando los mismos solventes. Esta diferencia podría ser debida al origen del material. En estudios en los que se evaluaron las variaciones en la composición del AE de las partes aéreas de la “Marcela de Campo” respecto a la temporada de recolección del material vegetal, se determinó que los rendimientos de extracción y la composición química varían dependiendo de la época en que esta se lleva a cabo¹¹⁷ por lo que se podría sospechar que sucede lo mismo con los EV.

3.1.5 SEPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA FH POR CCF

Una vez que se estableció el sistema de solventes óptimos de hexano:acetona (8:2) donde las bandas del EHC se veían separadas y definidas bajo luz UV, se procedió a obtener por CCF una cantidad considerable de cada banda, como se muestra en la Figura

24, para luego comenzar el estudio de caracterización química. Para esto se recogieron 100 fracciones de 2 ml y a cada una se les realizó una CCD.



Figura 24: Columna cromatográfica

En la Figura 25 se muestra el perfil de separación de las bandas de cada una de las fracciones obtenidas en CCF, con sus respectivos Rf. Como se observa, en las distintas fracciones se detectan cuatro bandas al igual que por CCD.

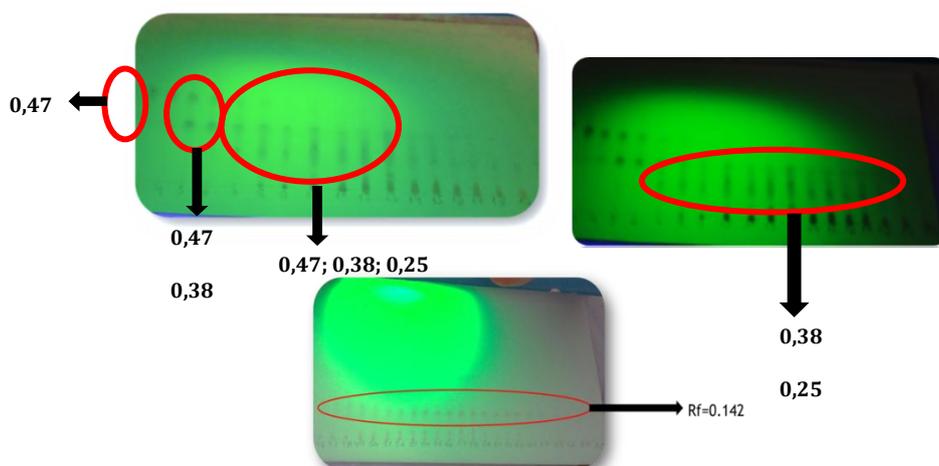


Figura 25: Perfil de las bandas obtenidas por CCF del EHC con sus respectivos Rf.

Por otra parte, de la Figura se desprende que en algunas fracciones se identifica una sola banda (un solo Rf), lo cual permite inferir en principio que se trata de un solo compuesto, al menos con el criterio de pureza de la cromatografía en CCD. Mientras que en otras fracciones hay más de una banda (identificados por distintos Rf) lo que implica que hay mezclas de compuestos que no se han podido aislar aplicando esta técnica de separación

En la Tabla 5 se muestra un resumen de las mezclas de compuestos que se obtuvieron con sus respectivos Rf, los miligramos de cada una y el rendimiento a partir de 1,3251 g de EHC.

Tabla 5: Rendimientos de cada mezcla obtenida

Mezclas- Rf	mg	% Rendimiento
1- 0,47	1,6	0,12
2- 0,47; 0,38	40	3,02
3- 0,47; 0,38; 0,25	178,0	13,43
4- 0,38; 0,25	116,2	8,76
5- 0,14	115,4	8,71

Las fracciones que contienen bandas con igual Rf se juntaron en un mismo frasco para luego proceder, si es necesario, a su posterior purificación y caracterización química. De acuerdo con la Tabla 5, las 100 fracciones originales se redujeron a 5: fracciones, 1 y 5 aparentemente puras y fracciones 2, 3 y 4 con mezclas de compuestos. De ahora en adelante se utiliza esta nomenclatura para identificar las distintas fracciones.

3.1.6 PURIFICACIÓN DE LAS BANDAS OBTENIDAS POR CCF

Cuando se procedió con los estudios de caracterización se pudo observar que las fracciones 1 y 5 no estaban puras, al igual que las restantes.

Ante esto, se aplicaron distintas técnicas cromatográficas, según la fracción, para su purificación, lo cual se seleccionaron por la cantidad de material que se poseía de las mismas, resumidas en la Tabla 6.

Tabla 6: Técnicas cromatograficas para cada mezcla de bandas obtenidas por CCF del extracto total

FRACCIÓN	TÉCNICA CROMATOGRÁFICA
1 y 5	Cromatografía Preparativa
2	Cromatografía Centrífuga Radial
3 y 4	Cromatografía Columna Flash

a) **Fraciones 1 y 5:** para la purificación de las mismas se aplicó la cromatografía preparativa. El sistema de solventes que se utilizó para esta técnica fue (Hexano:Acetato de etilo), que para la **fracción 1** fue del 15% Figura 26. Para la **fracción 5** se realizaron dos cromatografías preparativas consecutivas, utilizando el mismo sistema de solventes anterior pero primero al 25% y luego al 30%.

Al correr el solvente, para ambas fracciones, en los cromatofolios se observó una banda principal en la parte superior de los mismos, indicando que este es el compuesto principal en cada fracción. Para la caracterización química de los mismos se rasparon los cromatofolios en esa zona, se colocó el material en un tubo con acetona y luego de una hora, se filtró, se colocó en balones previamente pesados y secó

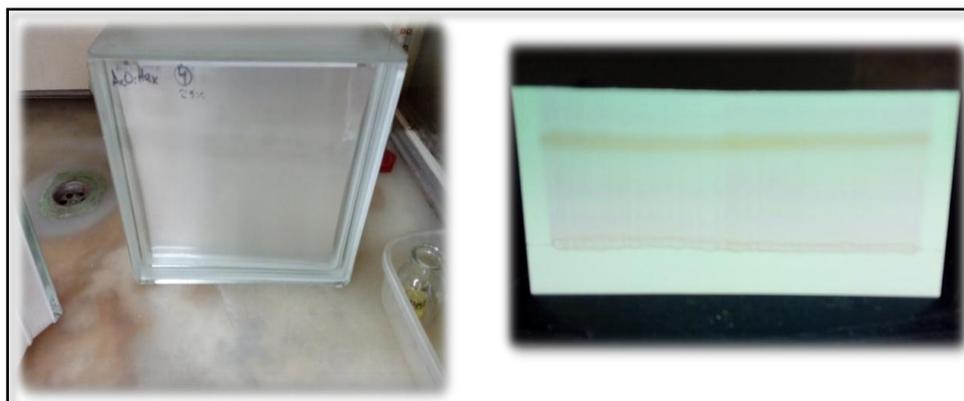


Figura 26: Cromatografía preparativa para las fracciones 1 y 5

b) Fraccion 2: para purificar esta fracción, se utilizó la técnica de Cromatografía Centrifuga Radial (Figura 27) con el mismo sistema de solvente (hexano: acetato de etilo). En este caso, se comenzó a eluir primero con hexano puro, y gradualmente se le fue aumentando la polaridad con acetato de etilo para que la separación de los compuestos sea más eficiente. Este aumento gradual de acetato de etilo fue: 0%;1%; 2%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 9%; 10 %; 11%; 12%; 13%; 15%; 17 y 20%.

En este caso, se recolectaron 240 fracciones a las cuales se le realizaron TLC o cromatografía en capa fina, se revelaron con anisaldehído y se juntaron las fracciones iguales lo cual se redujeron a 11 fracciones.

NOTA: Para un volumen de 100 ml la preparación de anisaldehído consiste en: 2,5 ml de anisaldehído; 3,5 ml de sulfúrico concentrado; 1 ml de ácido acético glacial; 93 ml de etanol.



Figura 27: Cromatografía centrífuga radial

c) **Fracciones 3 y 4:** las fracciones 3 y 4 se juntaron, y a aproximadamente 100 mg de esta mezcla se eluyó por una columna de cromatografía pequeña, tal como muestra la Figura 28. El sistema de solventes utilizado fue hexano: acetato de etilo y la sílice utilizada para este caso fue una sílice 60 (0,063-0,200 mm) marca Merck. El armado de la misma fue similar a la columna utilizada para purificar el extracto total.

Primero se eluyó con hexano solo, y se le fue subiendo gradualmente la polaridad del solvente con el agregado de acetato de etilo. De esta manera aseguramos que los compuestos apolares eluyan primero, y luego aumentándole de a poco la polaridad, aumenta la eficiencia de la columna. Este aumento gradual fue de: 0%; 2%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 10%; 12%; 14%; 17%; 20%; 25%; 40%; 100% acetato de etilo.

Se fue corroborando simultáneamente con TLC para ir monitoreando la eficiencia de la separación. Se recolectaron 240 fracciones, las cuales se redujeron a 19 fracciones cuando se analizaron por CCD.



Figura 28: CCF para 100 mg de extracto

3.1.7 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS DEL EH DE “MARCELA DE CAMPO”

A cada una de las fracciones del EH purificado, descriptas anteriormente, se les realizó espectros de Resonancia Magnética nuclear de Hidrogeno (H^1 RMN) y de Carbono 13 (C^{13} RMN) a los fines de caracterizarlos químicamente.

Fracción 1: en la Figura 29 y en la Figura 30 muestran los espectros de H^1 RMN y C^{13} RMN de la banda principal obtenida después de la Cromatografía preparativa.

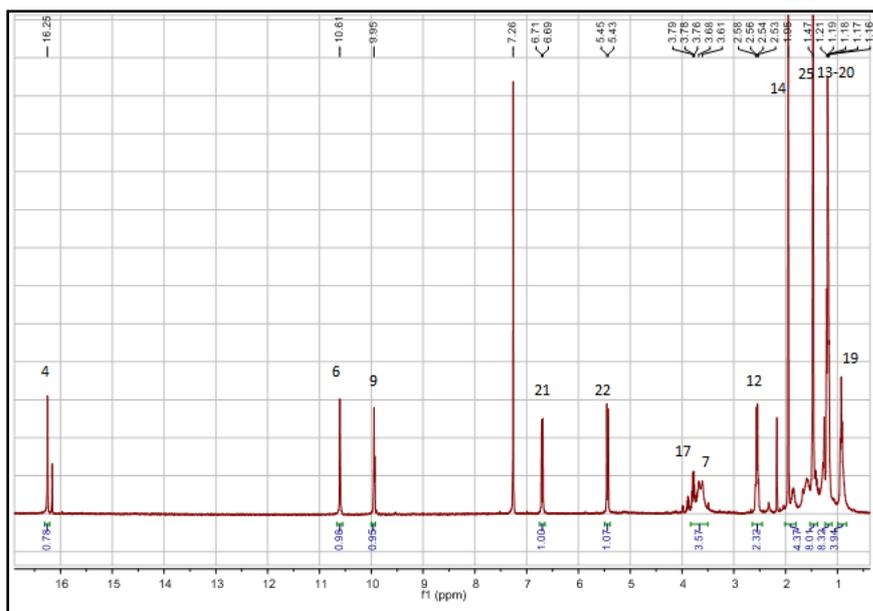


Figura 29: espectro de $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) de la Fracción 1

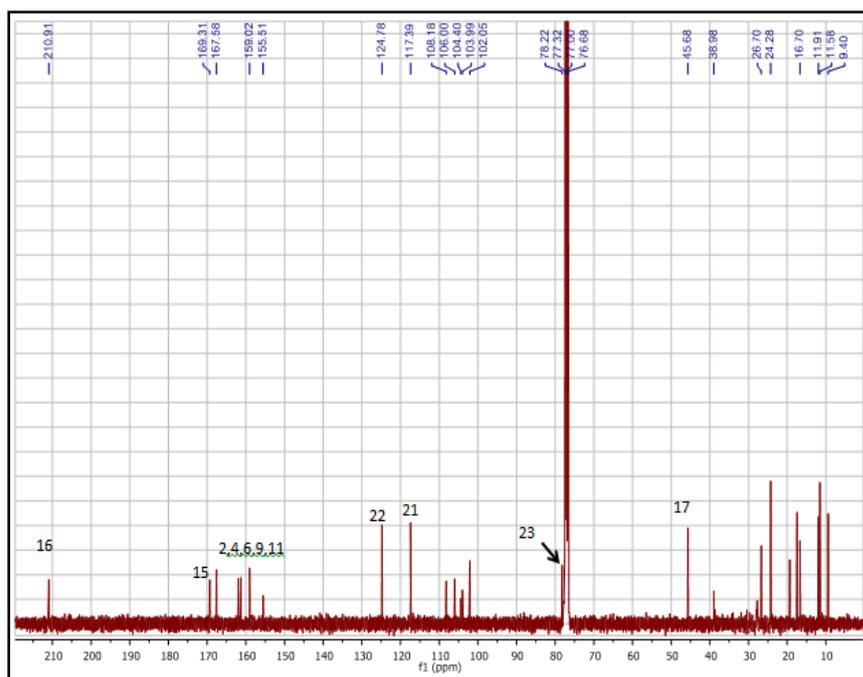


Figura 30: Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) de la Fracción 1.

Análisis: En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ se observaron tres señales singuletes a δ 16,25, δ 10,61 y δ 9,96 correspondientes a protones intercambiables con agua deuterada, como así también la presencia de un sistema AB vinílico asignado al doble enlace: H-21 (δ 6,72, d, J

= 10,0 Hz) y H-22 (δ 5,43, d, J = 10,0 Hz), un singlete característico para un metilo aromático (δ 1,92, s, 3H), las señales correspondientes a un grupo etilo (δ 2,55, c; J = 7,5 Hz, 2H; δ 1,18, t; J = 7,5 Hz, 3H) y dos señales singletes anchos de hidrógenos que corresponden a un grupo metilénico unido a dos anillos aromáticos (δ 3,68 y 3,61). Dicho espectro de protón también se caracterizó por la presencia de señales correspondientes a una función α -metil butirilo, con un sexteto a δ 3,78 (CH-17) en posición α al carbonilo (C-16), dos multipletes a δ 1,86 y δ 1,42 (CH₂-18) y dos grupos metilo a δ 0,92 y δ 1,16 asignables a CH₃-19 y CH₃-20, respectivamente.

El espectro de ¹³C-RMN mostró dos carbonos carbonílicos, del tipo cetona y ester (δ 211,1 y 169,4), asignadas a C-16 y C-15, respectivamente, como así también cinco señales aromáticas desapantallados, típicos de carbonos aromáticos unidos a funciones oxigenadas (δ 167,54; 161,93; 161,26; 158,96 y 155,45), características espectroscópicas propias de compuestos fenólicos tipo floroglucinol con sustituyentes α -pironas. En este espectro se observó la señal correspondiente a un carbono cuaternario alifático, que por su desplazamiento químico (δ 78,23), estaría unido a una función oxigenada (C-23), y dos señales correspondientes a los carbonos vinílicos C-21 y C-22 (δ 117,5 y 124,9, respectivamente).

En la Tabla 7 se describen las posiciones principales de proton y carbono para este compuesto.

Tabla 7: Datos de RMN (CDCl₃) Fracción 1

Posición	¹ H-RMN*	¹³ C-RMN
1	-	104,1
2	-	155,45
3	-	104,5
4		162,0
OH-4	16,25s	
5	-	106,1
6		158,96
OH-6	10,61 s	
7a	3,68sa	17,6
7b	3,61 sa	
8	-	102,2
9		167,54

OH-9	9,96 s	
10	-	108,3
11	-	161,4
12	2,55 c (7,5)	24,4
13	1,18 t (7,5)	11,7
14	1,94 s	9,5
15	-	169,4
16	-	211,1
17	3,78 sext (6,7)	45,8
18a	1,86 m	26,8
18b	1,42 m	
19	0,92 t (7,2)	12,1
20	1,16 d (6,6)	16,8
21	6,72 d (10,0)	117,5
22	5,43 d (10,0)	124,9
23	-	78,3
24	1,47 s	27,8
25	1,47 s	27,8

A partir de estos resultados, se pudo concluir que el compuesto hallado es: *(S)* -3 - *[[5,7-dihidroxi-2,2-dimetil-8- (2-metilbutanoil) -2H-cromen-6-il] metil] -6-etilo -4-hidroxi-5 metil-2H-piran-2-ona* (nombre de UIPAC), cuya fórmula se muestra en la Figura 31. Este compuesto se llamará **Compuesto 1**, de ahora en adelante. El mismo coincide con el hallado previamente en extractos de “Marcela de Campo” por *Caseros C. et.al*¹¹⁸.

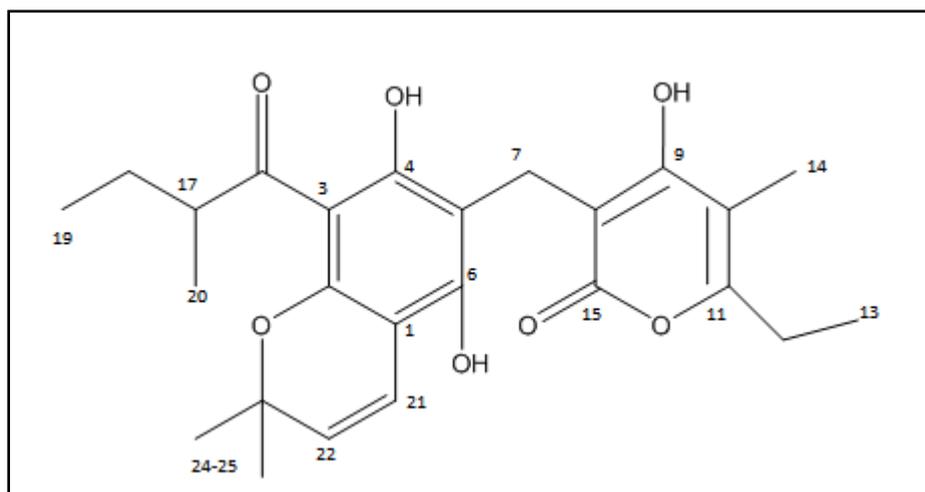


Figura 31: Compuesto 1

Fraccion 5: como se describió anteriormente, a esta fracción también se le realizó una cromatografía preparativa y los espectros de la banda principal se muestran a continuación (Figura 32 y Figura 33).

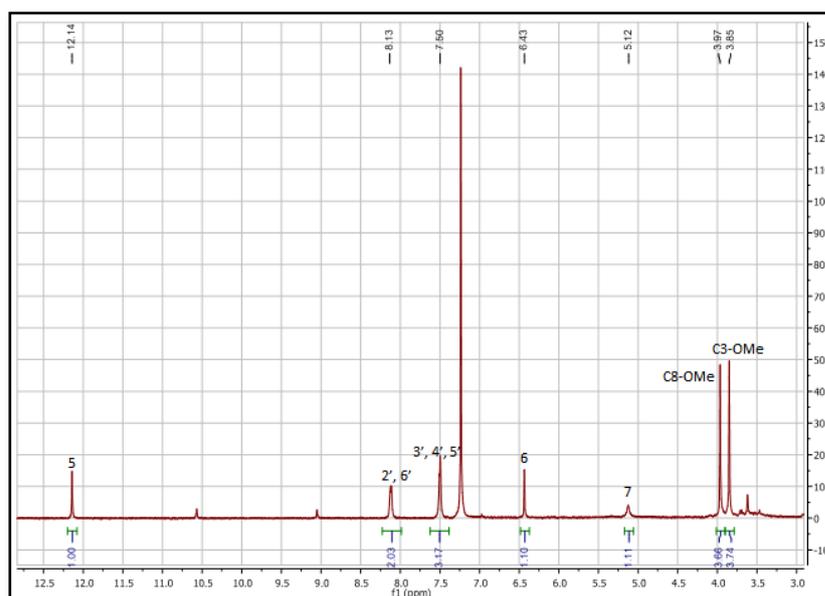


Figura 32: Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) Fracción 5

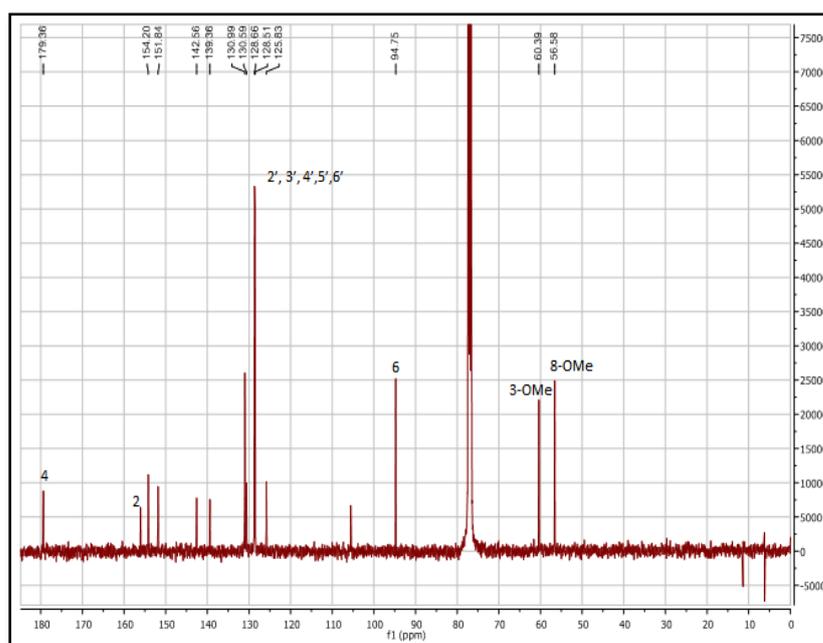


Figura 33: Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3) Fracción 5

Análisis: En el espectro de ^1H -RMN se observaron multipletes aromáticos a δ 8,13 (2H; H-2', H-6') y δ 7,50 (3H; H-3', H-4', H-5'), un singlete a δ 12,14 asignable a un protón quelado, dos señales características para metoxilos a δ 3,98 (8-OMe) y δ 3,87 (3-OMe), una señal singlete a δ 6,43 correspondiente al protón aromático H-6 y un singlete a δ 5,12, posteriormente asignada al grupo OH-7. En la Tabla 8 se muestran estas posiciones

Tabla 8: Datos de RMN (CDCl_3) Fracción 5

Posición	^1H -RMN*	^{13}C -RMN
2	-	155,98
3	-	139,4
4	-	179,5
5		154,4
OH-5	12,16 (1H; s)	
6	6,45 (1H; s)	94,4
7		151,5
OH-7	5,18 (1H; s)	
8	-	125,8
8a	-	142,7
4a	-	105,7
1'	-	130,7

2'	8,14 (1H; m)	128,6
3'	7,52 (1H; m)	128,4
4'	7,52 (1H; m)	131,0
5'	7,52 (1H; m)	128,5
6'	8,14 (1H; m)	128,6
3-OMe	3,87(3H; s)	60,6
8-Ome	3,98 (3H; s)	56,6

Estos espectros también fueron comparados con los de Caseros, *C et.al*¹¹⁸ y, debido a su semejanza, se puede decir que se trata del **5,7-dihidroxy-3,8-dimetoxiflavona (gnafaliina A)**, identificado originalmente por Rodríguez Ramos *F et.al*¹¹⁹. Este compuesto es un flavonoide, que lo llamaremos **compuesto 2**. En la Figura 34 se muestra la estructura molecular de este flavonoide.

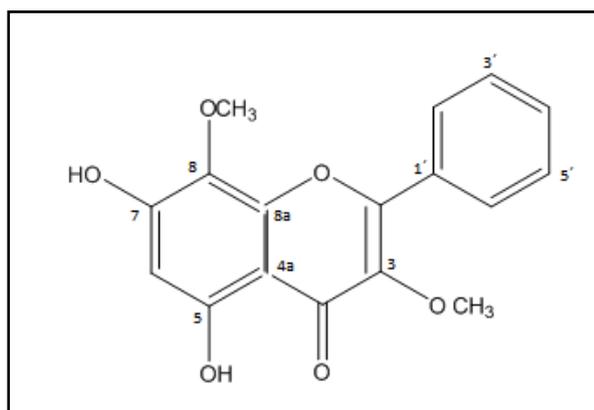


Figura 34: Gnafaliina(Compuesto 2)

Fracción 2: las 11 fracciones que se obtuvieron de la purificación de la fracción 2, se analizaron por RMN, y el compuesto mayoritario que se encontró aquí fue el **Compuesto 1**.

Fracción 3 y 4: cuando se analizaron por RMN las fracciones obtenidas por CCF, se observó que los compuestos principales fueron el **1**, el **2** que se describieron arriba, y dos compuestos nuevos, cuyos espectros se muestran a continuación, y que llamaremos **compuesto 3** y **compuesto 4**. En la Figura 35 y en la Figura 36 se muestran los espectros de hidrogeno y de carbono para el **Compuesto 3**.

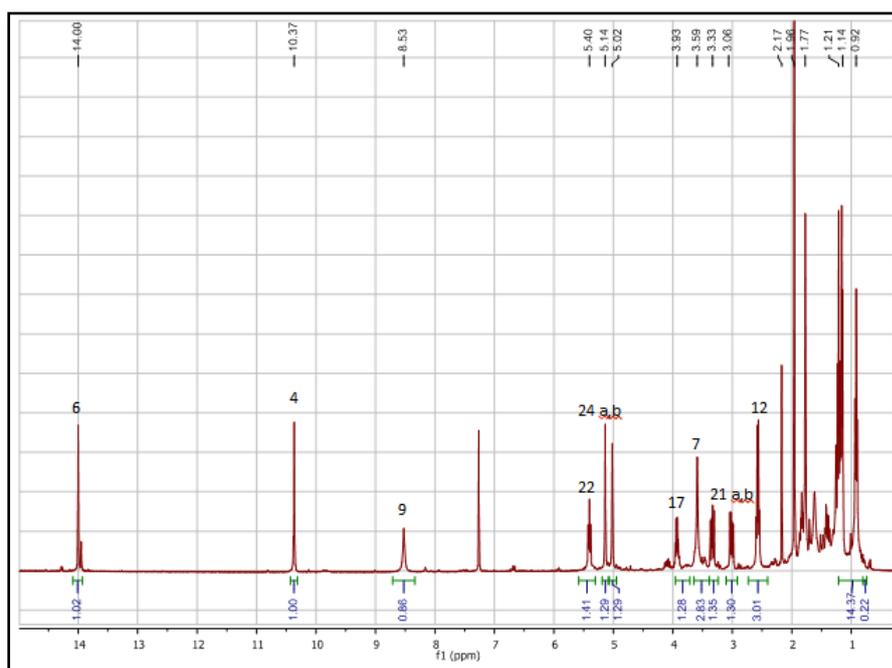


Figura 35: Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) del compuesto 3

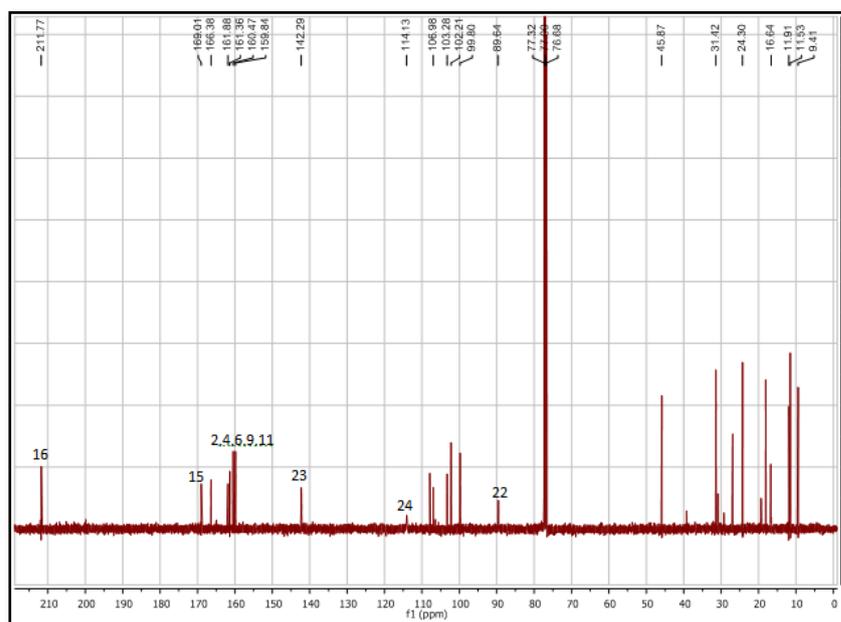


Figura 36: Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3) del compuesto 3.

Análisis: Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, revelaron datos espectroscópicos característicos de compuestos del tipo floroglucinol α -pironas, con un patrón de señales similares al **Compuesto 1** anteriormente descrito. El espectro de ^1H -RMN del

Compuesto 3, muestra señales que se corresponden a protones de grupos OH intercambiables con agua deuterada, sobre los carbonos C-4, C-6 y C-9 (δ 14,0; 10,37 y δ 8,52 respectivamente), un grupo metilo aromático (δ 1,95), una señal singlete ancho correspondiente a los protones del puente metilénico C-7 (δ 3,59) y las señales asignables al grupo etilo en posición *orto* al grupo α -pirona (δ 2,56, H-12 y δ 1,20, H-13), así como la presencia de un agrupamiento α -metil butirilo.

La diferencia en el espectro de protón de este compuesto, respecto al correspondiente al compuesto 1, radicó en la aparición de dos doble dobles a δ 3,0 (1H, $J_1 = 15$ Hz, $J_2 = 8,0$) y δ 3,32 (1H, $J_1 = 15$ Hz, $J_2 = 9,6$) asignados a los protones metilénicos H-21a y H-21b, respectivamente, una señal triplete a δ 5,40 atribuible a un protón metínico geminal a una función oxigenada y además dos singletes asignables a los protones vinílicos terminales H-24a (δ 5,14) y H-24b (δ 5,02).(Tabla 9)

El espectro de ^{13}C -RMN mostró dos señales a δ 211,77 y δ 169,01, cinco carbonos cuaternarios aromáticos unidos a oxígeno, correspondientes a los carbonos C-2, C-4, C-6, C-9 y C-11 (δ 160,47; 159,9; 161,86; 166,35 y 161,4 respectivamente), así como la señal de un carbono metínico unido a oxígeno (δ 89,64), un carbono cuaternario vinílico a δ 142,28 (C-23) y un triplete correspondiente al carbono metilénico C-24 (δ 114,13).(Tabla 9).

Tabla 9: Datos de RMN (CDCl_3) del compuesto 3.

Posición	^1H -RMN*	^{13}C -RMN
1	-	99,9
2	-	160,6
3	-	103,4
4	-	160,0
OH-4	14,0 s	
5	-	107,1
6	-	162,0
OH-6	10,37	-
7	3,59 sa	18,2
8	-	102,4
9	-	166,5
OH-9	8,52 sa	
10	-	108,1

11	-	161,5
12	2,56 c (7,5)	24,3
13	1,20 t (7,5)	11,9
14	1,95 s	9,41
15	-	169,2
16	-	211,9
17	3,93 sext (6,6)	45,87
18a	1,82 m	27,0
18b	1,40 m	
19	0,91 t (7,3)	11,9
20	1,16 d (6,8)	16,64
21a	3,0 dd (15,0; 8,0)	31,6
21b	3,32 dd (15,0; 9,6)	
22	5,40 t (8,6)	89,7
23	-	142,27
24a	5,14 s	114,2
24b	5,02 s	
25	1,77 s	16,75

A partir de estos resultados se puede proponer que el compuesto 3 corresponde a **3 - [4,6-Dihidroxil-7- (2- (S) -metilbutanoil) -2- (prop-1-en-2-il) -2,3-dihidrobencofuran-5-il) metil] -6- etil-4-hidroxi-5-metil-2H-piran-2-ona**, según la nomenclatura recomendada por IUPAC. Este compuesto también fue identificado por Caseros.C *et.al.*¹¹⁸. En la Figura 37 se muestra la estructura química del Compuesto 3.

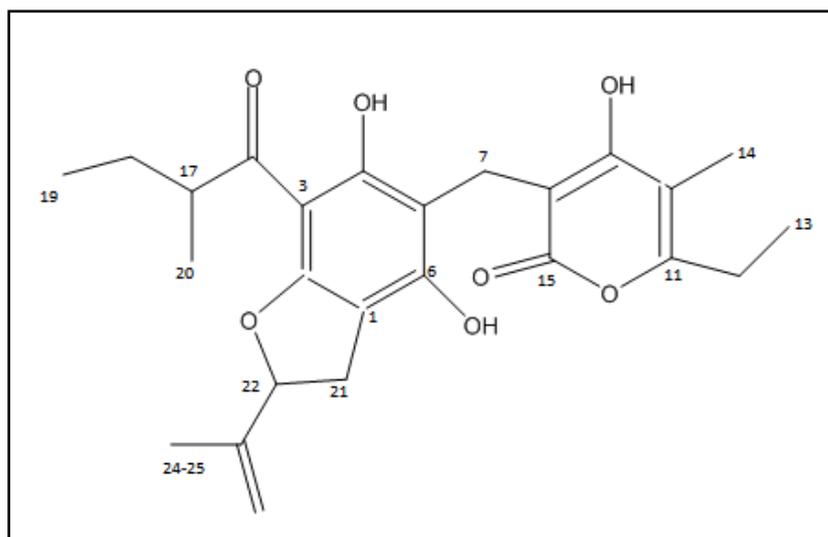


Figura 37: Compuesto 3

En la Figura 38 y en la Figura 39 se muestran los espectros de RMN para el **Compuesto 4**.

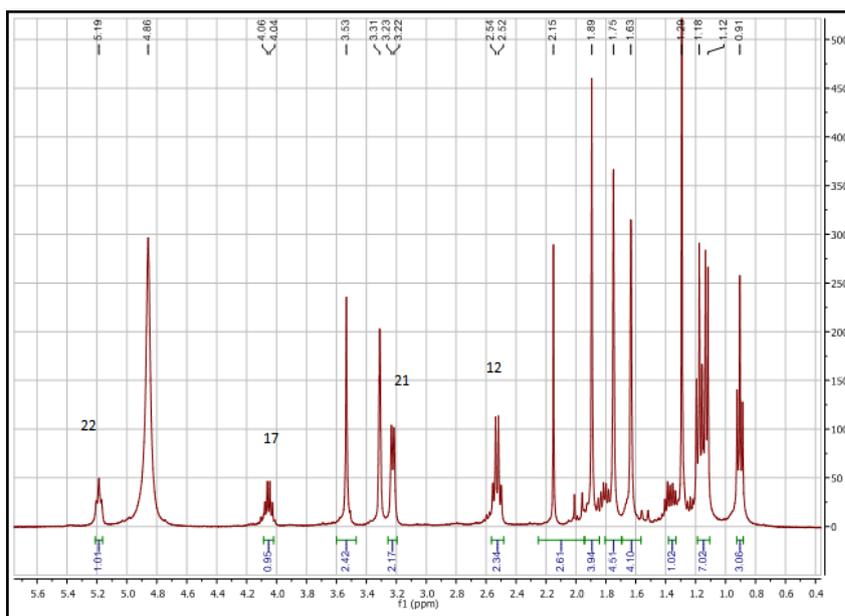


Figura 38: Espectro de ¹H-RMN (CD₃OD) del compuesto 4

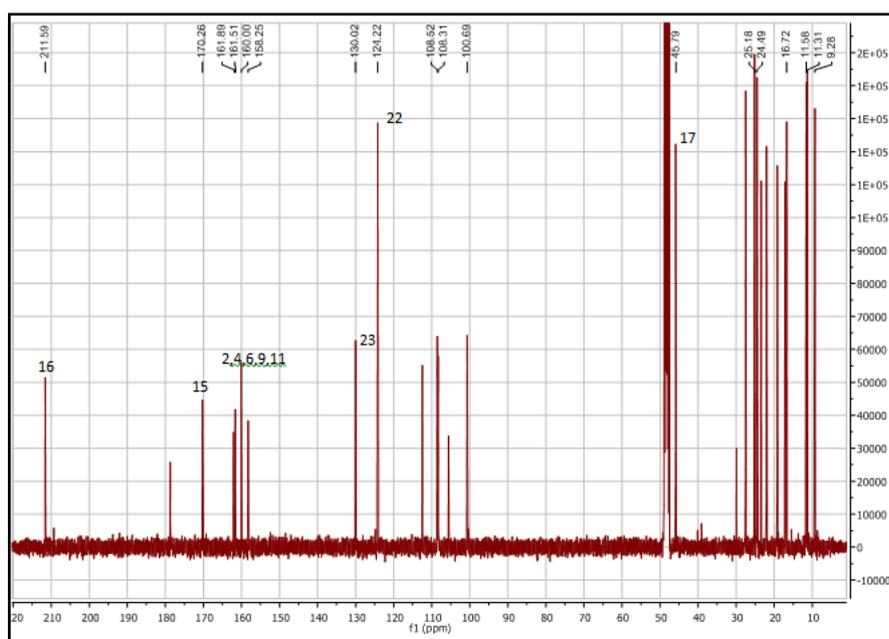


Figura 39: Espectro de ^{13}C -RMN (Metanol) del compuesto 4.

Análisis: Este compuesto fue aislado como un aceite viscoso anaranjado. Las señales obtenidas por RMN de este compuesto fueron consistentes con una estructura de tipo floroglucinol α -pironas característica, que se observó también en los compuestos 1 y 3 que se describieron anteriormente.

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN mostraron señales atribuibles a una función α -metilbutirilo, común en los compuestos ya descritos y en particular, las señales correspondientes a un grupo isoprenilo. El espectro de RMN de protón, se caracterizó por la presencia de un multiplete a δ 5,19, asignada al protón sobre el carbono vinílico C-22, y de dos singuletes anchos a δ 3,22 y δ 3,23, correspondientes a los protones metilénicos H-21a y H-21b.

La asignación de las señales de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (

Tabla 10) se confirmó por comparación con las características espectroscópicas de los metabolitos antes descritos y por experimentos de HSQC y HMBC realizados por Casero, C *et al.*¹¹⁸ lo que permitió también la ubicación de los distintos grupos funcionales sobre la unidad estructural básica. Este compuesto se considera un rotamero por lo que algunas señales de ^{13}C no fueron coincidentes con la publicación mencionada, para confirmar esto lo ideal es realizarle un espectro 2D.

Tabla 10: Datos de RMN del compuesto 4.

Posición	¹ H-RMN*	¹³ C-RMN
1	-	109,8
2	-	161,5
3	-	106,6
4		160
OH-4	-	
5	-	107,1
6		158,25
OH-6	-	
7	3,62 sa	18,9
8	-	100,3
9		170,26
OH-9	-	
10	-	110,1
11	-	161,84
12	2,60 c (7,5)	25,1
13	1,10 t (7,6)	11,8
14	1,97 s	9,7
15	-	170
16	-	211,6
17	3,97 sext (6,6)	46
18a	1,83 m	28,2
18b	1,38 m	
19	0,91 t (7,4)	12,3
20	1,13 d (6,7)	17,2
21a	3,27 sa	22,7
21b	3,29 sa	
22	5,11 m	124
23	-	129,86
24	1,76 s	18,0
25	1,65 s	25,9

De acuerdo con estos resultados, podemos decir que el Compuesto 4 es: **23-metil-6-O-desmetil-auricepirona** (nombre de UIPAC), cuya estructura se muestra en la Figura 40. Este compuesto fue reportado previamente por *Caseros.C et.al*¹¹⁸.

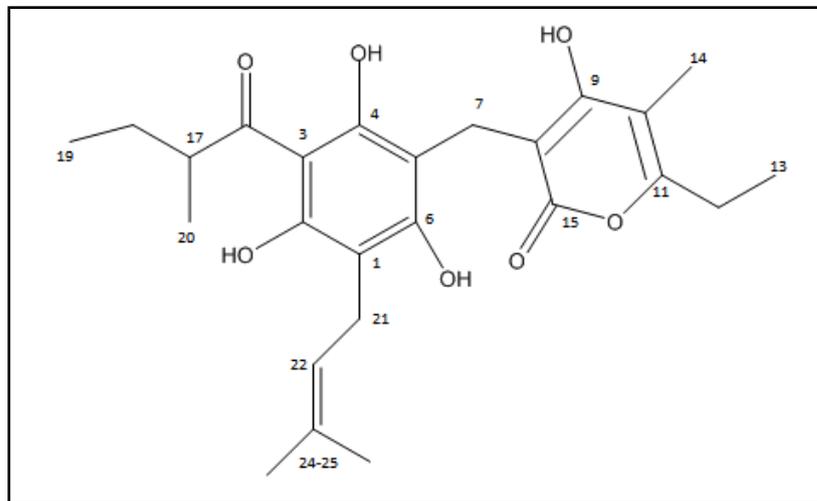


Figura 40: Compuesto 4

3.1.8 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS PUROS DE LOS EHC DE *ACHYROCLINE SATUREIODES*.

Con el protocolo explicado en la sección 2.1.6 se midió la CIM y la CBM de los compuestos 1, 2, 3 y 4 presentes en el EHC de *Achyrocline satureioides*.

En la Figura 41 se puede observar que el último pocillo coloreado para los compuestos 1 y 2 son el 8 y 6 respectivamente, entonces la CIM para cada compuesto es:

COMPUESTO 1: 1,05 ppm

COMPUESTO 2: 2,5 ppm

La CBM se muestra en la Figura 42 dando como resultado:

COMPUESTO 1: 6,5 ppm

COMPUESTO 2: 6,1 ppm

Como se puede apreciar, estos compuestos sí poseen capacidad bactericida, ya que en las placas se ve la ausencia de las colonias de *P.larvae*, es decir no creció nada ya que el extracto mató a la bacteria.

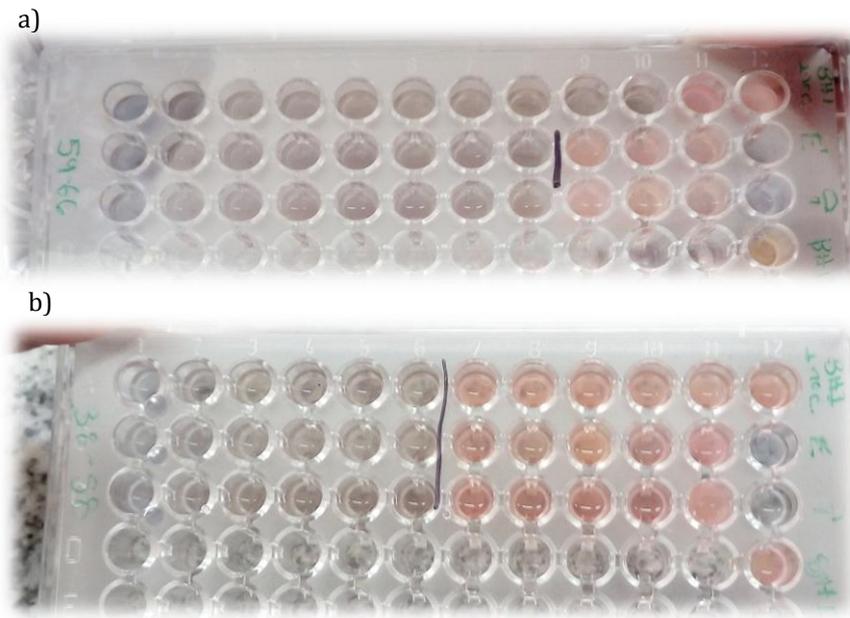


Figura 41: CIM de los compuestos a) 1 y b) 2

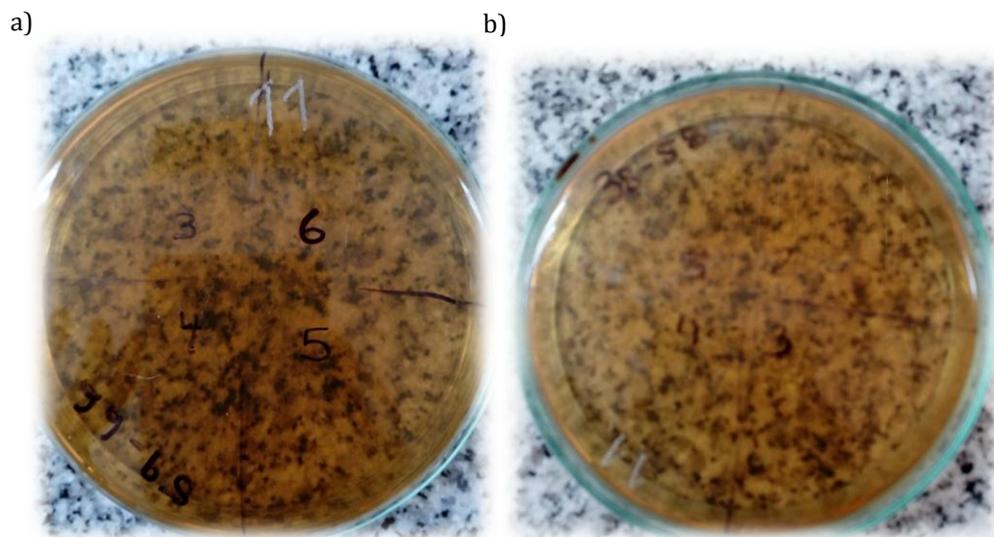


Figura 42: CBM de los compuestos a) 1 y b) 2

Para los compuestos 3 y 4, el último pocillo coloreado fue el 9 y 8 respectivamente como se muestra en la Figura 43 dando como resultado una CIM:

COMPUESTO 3: 0,07 ppm

COMPUESTO 4: 0,26 ppm

La CBM se muestra en la Figura 44 dando como resultado:

COMPUESTO 3: 0,5 ppm

COMPUESTO 4: 0,26 ppm

En este caso, se pueden apreciar la presencia de colonias de la bacteria en la primer placa, pero con la concentración del pocillo 7 de dónde se realizó el cálculo para la CIM, éstas desaparecen por acción de la presencia del compuesto 4.



Figura 43: CIM de los compuestos a) 3 y b) 4

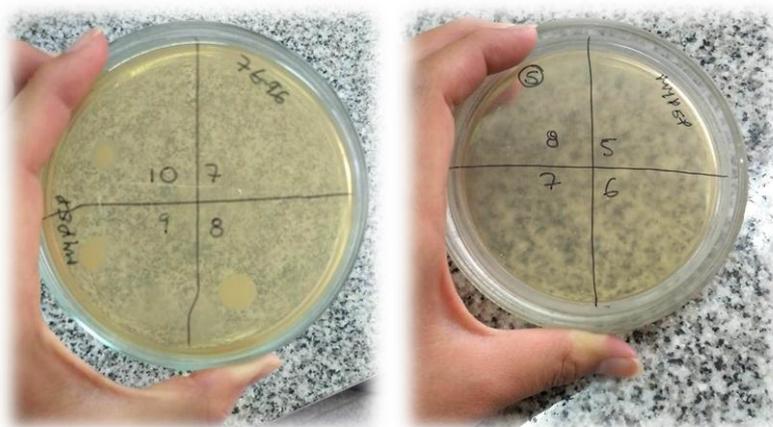


Figura 44: CBM de los compuestos a) 3 y b) 4

En resumen, la CIM y CBM de cada compuesto se muestra a continuación:

Tabla 11: CIM YCBM

Compuesto	CIM	CBM
1	1,05 ppm	6,5 ppm
2	2,5 ppm	6,1 ppm
3	0,07	0,5 ppm
4	0,26	0,26 ppm
EHC	0,4 ppm	-

Como podemos ver el compuesto 3 es el que mayor capacidad inhibitoria posee contra *P. larvae*, seguido por el compuesto 4 que también presenta buena actividad, en comparación del resto de los compuestos y el EHC. En cuanto a la capacidad bactericida, el compuesto 4 es el que tiene mayor CBM, en comparación al resto de los compuestos y al EHC al cual no se le pudo determinar la CBM. Podemos concluir, que la EHC total posee valores de CIM que se encuentran entre los valores individuales de los compuestos en estado puro. Esto estaría sugiriendo que en la mezcla de EHC se producen interacciones sinérgicas y antagónicas entre sus compuestos que determinan la capacidad antimicrobiana de la fracción completa.

Estos estudios se deben continuar para determinar las interacciones entre cada fracción en particular y cuál es la mezcla responsable de la actividad antimicrobiana.

3.2 ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE TIMOL, CARVACROL Y EUGENOL PARA SU DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA EN MIEL, UTILIZANDO COMO HERRAMIENTA COMPLEMENTARIA LA QUIMIOMETRÍA

Como se describió anteriormente, el ácaro Varroa destructor (*Acari: Varroidae*) es la plaga más destructiva de la abeja melífera, *Apis mellifera*, en todo el mundo. Para combatir este parasito se utilizan acaricidas sintéticos por su eficiencia y fácil aplicación, pero el uso intensivo de la mayoría de ellos y/o sus productos de degradación puede generar resistencia, reducir su eficacia y acumularse en los productos de la abeja, como la cera de abeja, la miel, el propóleo y la jalea real⁶⁵.

En este contexto, los productos naturales son una excelente alternativa a los pesticidas sintéticos para controlar los ácaros parásitos de las abejas y como un medio para reducir los impactos negativos que pueden generar en la salud humana y el medio ambiente. Existen estudios que indican que muchos aceites esenciales y sus componentes exhiben actividad acaricida¹²⁰. Los aceites esenciales como el de clavo y tomillo contienen eugenol

(EU), timol (TI) y carvacrol (CA), y se encuentran entre los aceites esenciales más conocidos con bioactividad contra insectos y otras plagas. Pero como los aceites esenciales requieren de una mayor frecuencia de aplicación debido a su rápida volatilización, pueden quedar residuos y, aunque no son tóxicos, son una preocupación importante debido a que pueden afectar la calidad de la miel, causando cambios en su sabor, lo cual no está permitido de acuerdo con las regulaciones internacionales de este producto. Por lo tanto, los residuos de estas sustancias en la miel deben permanecer por debajo de su umbral de sabor. Por ejemplo, el umbral de sabor para TI en miel de colza está entre 1,1 y 1,6 (mg.L^{-1})⁶⁵. Teniendo en cuenta estos valores, el límite de concentración de TI en la miel propuesto por Suiza es de $0,8 (\mu\text{g Kg}^{-1})$ ¹²¹. Por lo tanto, se necesitan métodos analíticos rápidos y precisos para la determinación de aceites esenciales en la miel.

En este trabajo se determinaran TI, CA y EU en miel utilizando la quimiometría como herramienta complementaria.

3.2.1 ESTUDIO POR VOLTAMPEROMETRÍA CICLICA

En la Figura 45 se muestran las estructuras químicas de Timol, Carvacrol y Eugenol respectivamente.

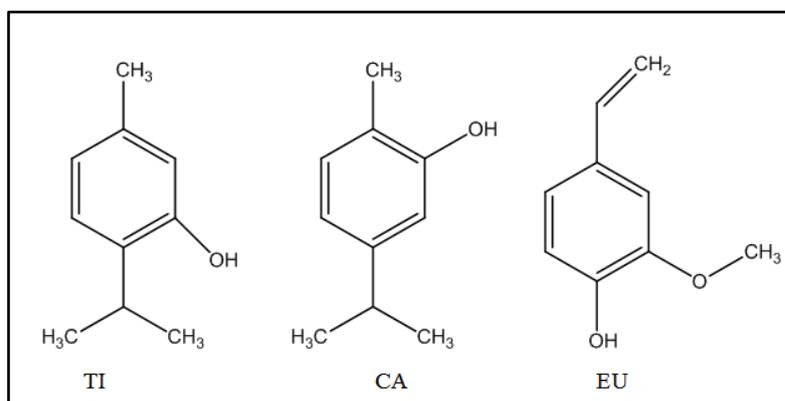


Figura 45: Estructura química de TI, CA y EU

Entonces, se comenzó a estudiar el comportamiento electroquímico de estos analitos sobre un electrodo de CV en solución reguladora de fosfato de pH 10 a 50 mVs^{-1} y temperatura 20°C , estos resultados se muestran en la Figura 46.

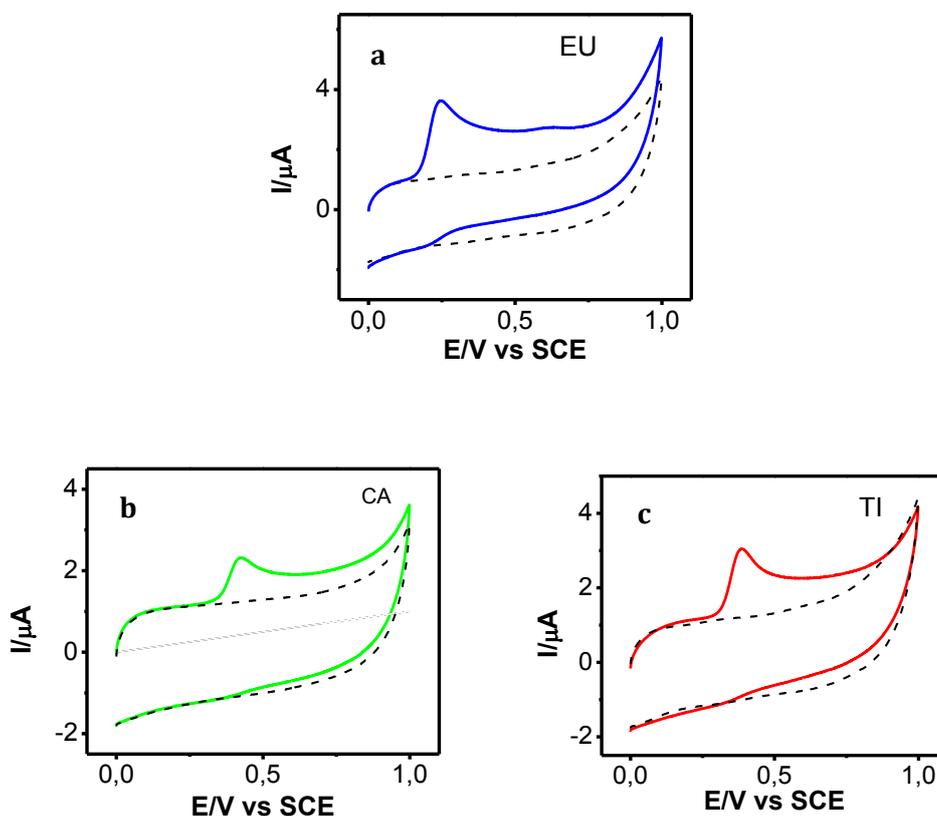


Figura 46: Voltamperogramas cíclicos a una concentración de $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, velocidad 50 mVs^{-1} , $\text{pH}=10$ y Temperatura de 20°C para a) EU b) CA y c) TI

Como se puede observar, el electrodo de CV no muestra picos redoxs en ausencia de los analitos (línea de puntos). Cuando los mismos se adicionan a la solución reguladora se observa un pico de oxidación a aproximadamente $0,30 \text{ V}$; $0,40$ y $0,42 \text{ V}$ para EU, TI y CA, respectivamente. No se detectan los correspondientes picos complementarios de reducción, bajo estas condiciones de trabajo, lo que implica que los tres analitos siguen un mecanismo redox complejo con reacciones químicas irreversibles y rápidas acopladas a la transferencia de carga¹²².

Como se observa en la Figura 45 los tres compuestos son derivados fenólicos, por lo que poseen propiedades de oxidación y reducción similares al fenol¹²³. El mecanismo de electrooxidación de fenol, es bien conocido y se resume en la Figura 47.

Dependiendo del pH del medio de reacción, la oxidación electroquímica de los fenoles tiene lugar de acuerdo con uno o ambos caminos que muestra la Figura 47. La molécula de fenol durante la primera etapa de electrooxidación (E1) a un valor de pH inferior a su pKa (9,89) da lugar a un catión radical (V), que desprotona rápidamente (C1) al radical neutro (III). Este radical continúa oxidándose (E2) al ion fenoxonio (IV) debido a que posee un potencial de oxidación menor. Finalmente, el ion fenoxonio puede reaccionar de manera irreversible con otra radicalización (V) o con un fenol sin reaccionar para formar productos diméricos o poliméricos. En el último caso, el polímero formado causa una rápida desactivación del electrodo. Sin embargo, es posible obtener señales de corriente reproducibles para la electro-oxidación de fenoles utilizando las señales de corriente obtenidas durante el primer ciclo voltamétrico. Así, en el presente estudios de respuesta electroquímica mostrados son los obtenidos durante el primer ciclo voltamétrico¹²⁴.

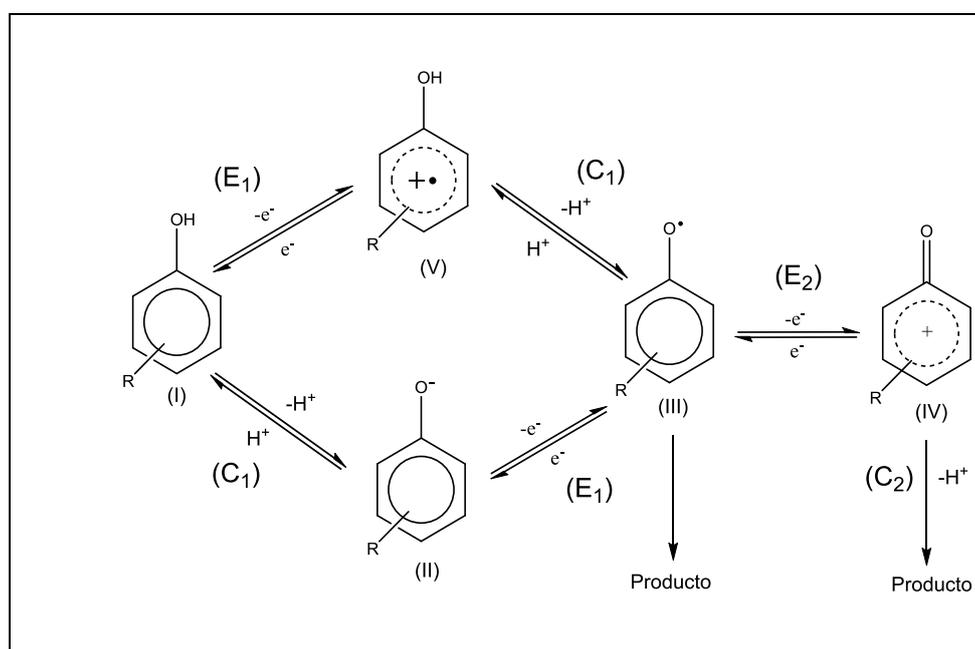
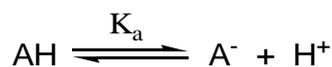


Figura 47: Mecanismo de electrooxidación del fenol

A modo general, el equilibrio ácido-base involucrado en soluciones acuosas que contienen TI, EU o CA (ácidos monopróticos) se puede representar mediante la siguiente ecuación:



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$

donde K_a es la constante de disociación ácida y AH y A^- son las formas neutras y desprotonadas de los compuestos fenólicos, respectivamente.

*Reiner et. al*¹²⁵ estimó los siguientes valores de pKa en soluciones acuosas: 11,11 para TI; 10,72 para EU y 11,02 para CA. El porcentaje de contribución de cada especie (A^- y AH) de los compuestos fenólicos, a un valor de pH dado, se puede obtener a partir de estos valores de pKa y de la concentración analítica (aprox. $1,0 \times 10^{-4}$ M). A pH=10,0, los cálculos mostraron que la especie no disociada (AH) es la predominante de los tres compuestos (TI: 93%, CA: 91% y EU: 84%). Entonces los picos de oxidación que se muestran en la Figura 41, pueden asignarse a la formación de la radicalización (V en la rama superior de la Figura 47), y el comportamiento irreversible que se ve en los voltagramas, puede atribuirse a las reacciones acopladas que consumen los productos de oxidación formados cuando el escaneo avanza.

4.2.1.1 ESTUDIO CON EL PH

Se estudió la influencia del pH en el comportamiento electroquímico de los tres analitos en discusión. Este estudio se realizó en el rango de pH de 2 a 13, por CV.

Los resultados muestran que a pH más bajos que el pKa de cada compuesto, los tres potenciales de pico anódico se desplazan hacia valores menos positivos cuando aumenta el pH, lo que indica que la oxidación se facilita (Figura 48). La relación entre el potencial pico y el pH fue casi lineal hasta aproximadamente pH 10, con una pendiente de aproximadamente 0,060 V por unidad de pH. Este resultado puede indicar que, bajo estas condiciones, los analitos se oxidan involucrando la misma cantidad de electrones que de protones.

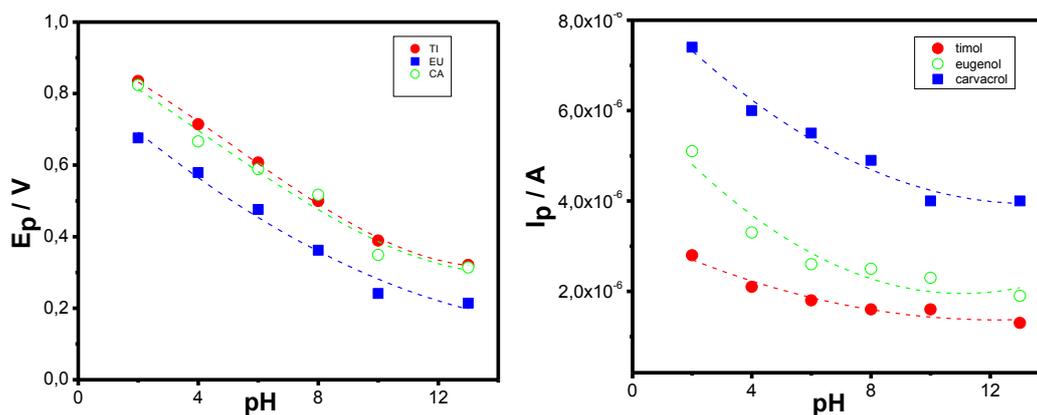


Figura 48: Grafica de la relación de la E_p e I_p con el pH respectivamente

Los compuestos fenólicos son débilmente ácido; entonces cuando aumenta el pH, la extracción de un protón se ve favorecida, tal como se muestra en la figura 47 (rama inferior), y los potenciales de oxidación son menores¹²³. Entonces, a partir de estos resultados, se elige como pH de trabajo un valor de 10, donde la I_p es constante y los analitos se oxidan a potenciales más catódicos.

Como podemos ver en la Figura 48, las respuestas electroquímicas de TI y CA se superponen casi por completo en todo el rango de pH estudiado. Por otro lado, la corriente pico anódica de TI y EU y CA disminuye (aproximadamente 50%) en el rango de pH de 2 a aproximadamente 8. Estos valores de corriente pico anódica permanecen casi constantes a partir de entonces, con esto confirmamos la elección de un pH=10 para seguir trabajando.

4.2.1.2 ESTUDIO VARIANDO LA CONCENTRACIÓN Y LA VELOCIDAD DE BARRIDO DE POTENCIAL

Para estudiar la cinética de reacción de cada compuesto, se estudió la respuesta electroquímica modificando dos variables: la velocidad ($0,002$ a $2 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) y la concentración (1×10^{-5} a $2 \times 10^{-4} \text{ M}$), siempre trabajando a pH=10.

La Figura 49 muestra la dependencia de las I_p con $v^{1/2}$, para tres concentraciones diferentes de EU, CA y TI. Como se puede observar, en los tres casos, las I_p aumentan linealmente con la raíz cuadrada de v . Este comportamiento indica que la oxidación de los tres analitos sobre la superficie del electrodo de CV es un proceso típico controlado por difusión, en el intervalo de v y concentración estudiados. Este comportamiento se vio en todo el rango de concentraciones estudiadas.

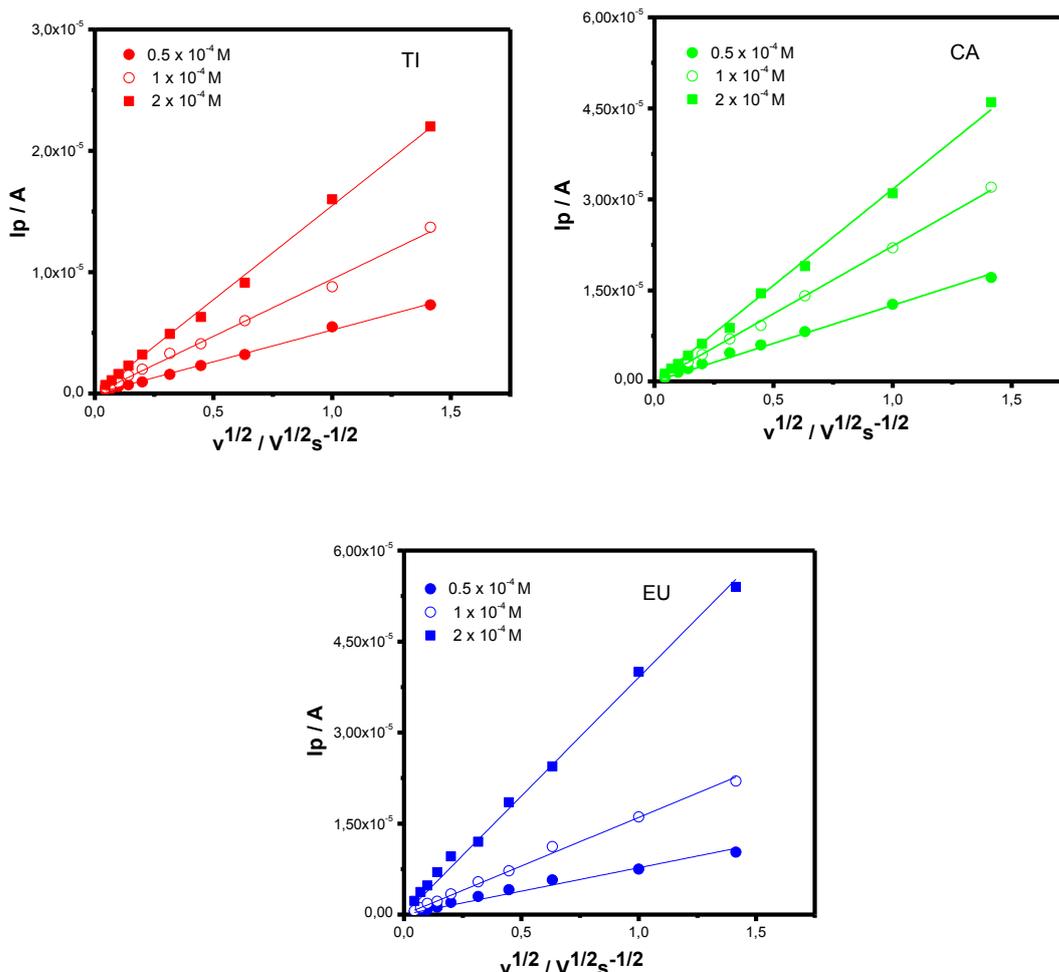


Figura 49: Gráficos de I_p vs $v^{1/2}$ para TI, CA y EU a tres concentraciones diferentes $0,5 \times 10^{-4}$ M, 1×10^{-4} M Y 2×10^{-4} M.

Otro parámetro que se analizó es la función corriente (ψ), la cual se define como:

$$\Psi = (I_p/v^{1/2} A C^*)$$

donde A es el área del electrodo y los demás parámetros han sido definidos anteriormente.

La teoría predice que la ψ en función de la $v^{1/2}$ es una recta con pendiente nula en los casos en que la especie electrogenerada no esté comprometida en procesos cinéticos acoplados e independiente de la concentración. Tal función corriente tiende a disminuir con el aumento de v en presencia de complicaciones cinéticas posteriores a la reacción electroquímica heterogénea.

Experimentalmente, se encontró que ψ disminuye a medida que la v aumenta y depende de la concentración de los analitos, tal como se muestra en la Figura 50 Este resultado confirma que existen reacciones químicas acopladas a la primera transferencia de carga y el orden de las mismas es superior a uno¹²⁶.

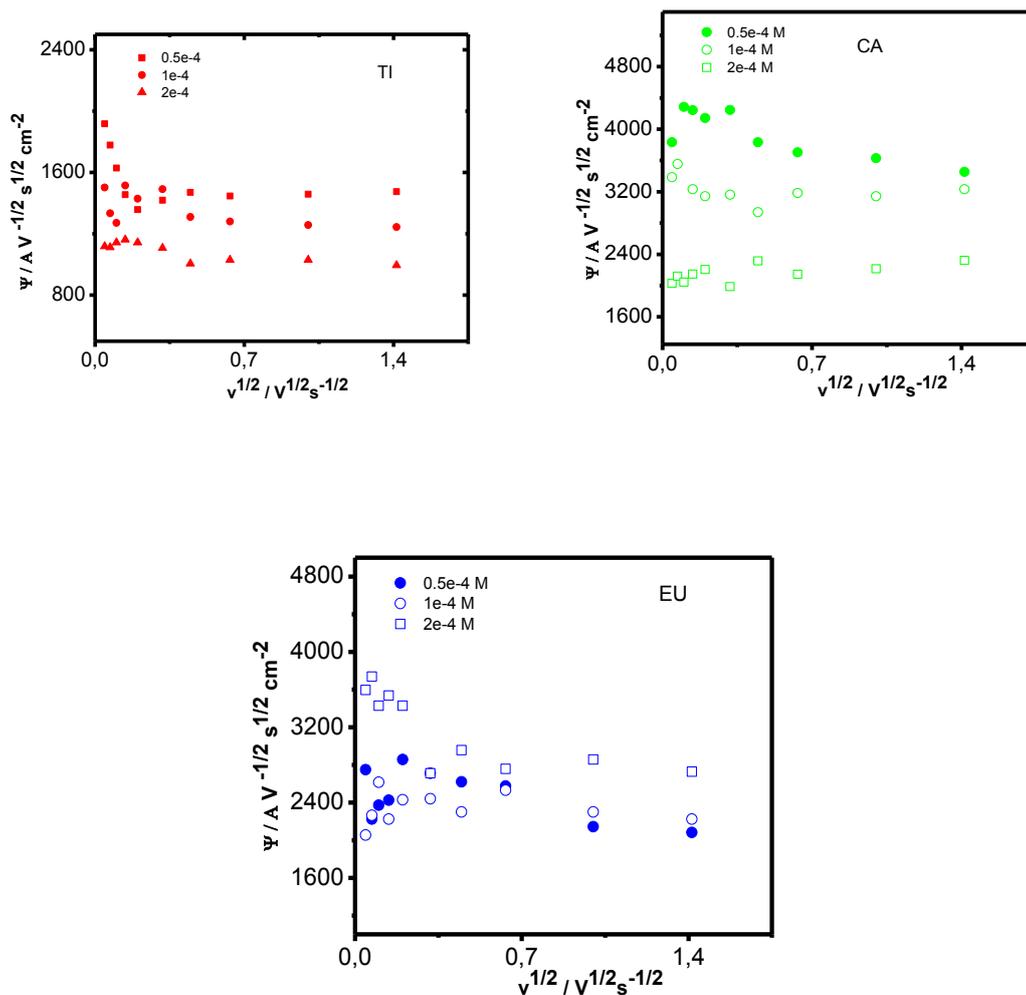


Figura 50: Grafica de Ψ vs $v^{1/2}$ de TI, CA y EU para diferentes concentraciones: $0,5 \times 10^{-4}$ M, 1×10^{-4} M y 2×10^{-4} M.

Por último, también se realizó un análisis de los resultados obtenidos al variar la concentración de los analitos, para una velocidad constante de $0,1 \text{ Vs}^{-1}$. Como se observa en las FIGURA 51 las I_p aumentan a medida que la concentración se incrementa para los tres analitos. Esta relación es lineal en el rango de concentración estudiado, tal como se muestra en la FIGURA 51, esto indica que un electrodo CV puede ser utilizado para cuantificar estos analitos.

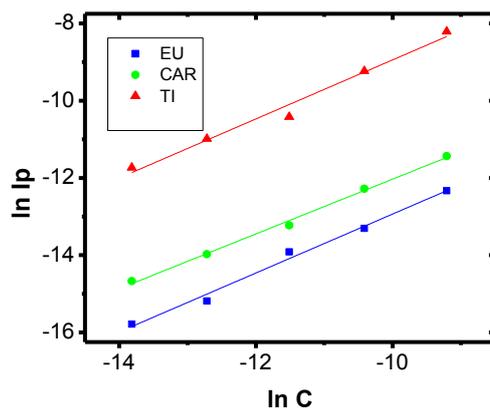


Figura 51: grafica de $\ln(I_p)$ vs $\ln(C)$ para EU, CA y TI. Velocidad de barrido $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Las concentraciones se variaron desde $8 \times 10^{-7} \text{ M}$ a $2 \times 10^{-4} \text{ M}$.

A partir de los resultados obtenidos, se establecen como parámetros óptimos de trabajo para la VC, pH 10 y una v de $0,1 \text{ Vs}^{-1}$. Bajo estas condiciones de trabajo la respuesta electroquímica de los tres analitos se muestra en la

Figura 52.

Como se puede observar, y como ya se mostró en la Figura 43, la respuesta electroquímica de CA y TI se superponen (cabe aclarar que esto sucede en todo el rango de pH y v estudiados). Por lo tanto, para realizar la cuantificación simultánea de los tres analitos en solución se debe recurrir a una herramienta complementaria como es la quimiometría (ver más adelante). Por otra parte, para realizar la cuantificación de los analitos se recurrió a una técnica electroquímica más sensible como es la VOC, bajo las condiciones de pH antes mencionado.

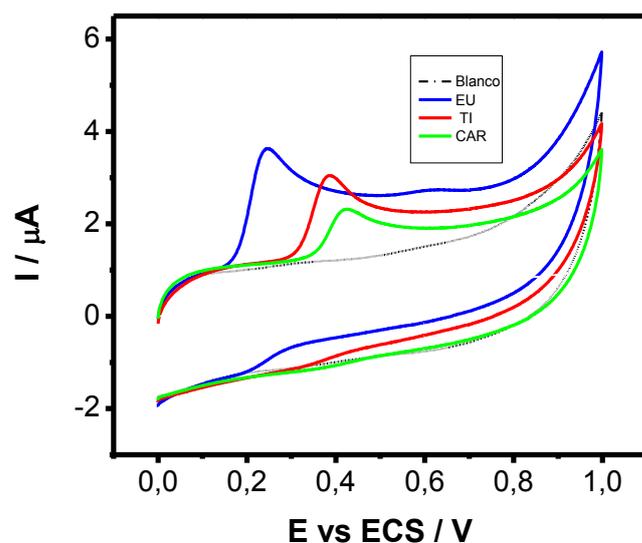


Figura 52: Grafica de VC para EU, CA y TI, concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$, $\text{pH}=10$ y $v= 0,1 \text{vs}^{-1}$.

3.2.2 VOLTAMPEROMETRÍA DE ONDA CUADRADA

En la Figura 53 se muestran los voltamperogramas de OC típicos para cada uno de los analitos para soluciones $1 \times 10^{-4} \text{M}$ y $\text{pH}=10$. Como se puede observar, la respuesta electroquímica de TI y CA claramente se superponen.

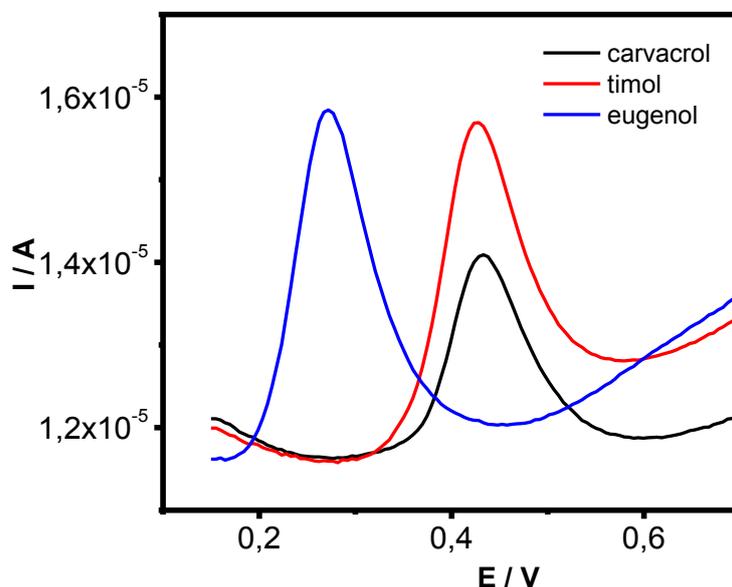


Figura 53: Voltamperogramas de onda cuadrada para TI, CA y EU en solución reguladora de $\text{pH}=10$. Concentración de los analitos $3,66 \times 10^{-5} \text{M}$.

Se optimizaron los parámetros de la VOC, para ello se utilizó una solución mezcla $1 \times 10^{-4} \text{M}$ de cada uno de los analitos a $\text{pH}=10$ y el potencial se barrió de 0 a 0,8 V. Se variaron los siguientes parámetros: ΔE_{oc} (amplitud de la onda cuadrada), ΔE_e (salto de

escalera) y fr (frecuencia). A partir de estos estudios se obtuvieron los parámetros óptimos que se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Optimización de los parámetros para VOC

Parámetros	
ΔE_{oc} (V)	0,025
ΔE_e (V)	0,005
fr (Hz)	40

3.2.3 QUIMIOMETRÍA

Tal como se describió previamente, para la construcción del modelo de calibración se implementó un modelo de regresión lineal, mínimos cuadrados parciales (PLS-1)^{127,128}, y uno no lineal, redes neuronales artificiales (RNA)¹²⁹.

Para ambas metodologías se utilizó un conjunto de voltamperogramas para la calibración y uno independiente para la validación. Ambos conjuntos se determinaron mediante un diseño experimental.

Para el conjunto de calibración se utilizó un diseño central compuesto 22 + estrella, el cual estudia el efecto de tres factores (las concentraciones en diecisiete experiencias) y con tres puntos centrales, en el intervalo de concentración de 0,42 a 4,8 ppm para EU, 0,85 a 4,2 ppm para TI y 0,65 a 4,9 ppm para CA.

Conjunto de calibración de mezclas ternarias: se prepararon 17 (diecisiete) soluciones conteniendo los tres analitos en diferentes rangos de concentración, las cuales se representan en la Tabla 13

Cada solución se prepara de la siguiente manera: en la celda electroquímica se colocan 15 ml de la solución reguladora de pH=10, y se adicionan diferentes volúmenes de las soluciones stock de cada analito, para cumplir con cada una de las concentraciones del conjunto.

Tabla 13: Conjunto de calibración de mezclas ternarias

Nº de experiencias	CA/ ppm	TI / ppm	EU / ppm
1	4,0	4,2	3,9
2	1,5	4,2	3,9

3	4,0	1,7	1,3
4	2,75	2,95	0,42
5	0,65	2,95	2,6
6	1,5	1,7	3,9
7	4,0	4,2	1,3
8	2,75	5,1	2,6
9	2,75	0,85	2,6
10	2,75	2,95	2,6
11	4,0	1,7	3,9
12	1,5	4,2	1,3
13	2,75	2,95	2,6
14	2,75	2,95	2,6
15	1,5	1,7	1,3
16	4,9	2,95	2,6
17	2,75	2,95	4,8

Como se puede observar las experiencias 10, 13 y 14 tanto CA, TI y EU tienen la misma concentración, y son las que se denominan puntos centrales, es decir, la solución se mide por triplicado.

Conjunto de calibración de mezclas binaria: se prepararon 3 (tres) soluciones conteniendo sólo dos de los analitos en diferentes rangos de concentración, tal como se describe en la Tabla 14.

Tabla 14: Conjunto de calibración de mezclas binarias.

Nro de experiencias	CA / ppm	TI / ppm	EU / ppm
1	-	2	5
2	2	5	-
3	5	-	2

Conjunto de calibración de moléculas individuales: se preparan 3 (tres) soluciones de cada uno de los analitos individualmente en las concentraciones indicadas en la siguiente

TABLA 15

Tabla 15: Conjunto de calibración de moléculas individuales.

Analito	Concentración del analito / ppm		
CA	0,4	3	5,5
TI	0,4	3	5,5
EU	0,4	3	5,5

Para el *conjunto de validación*, los intervalos de concentración se eligen mediante un diseño multifactorial de 2 niveles con tres factores (23). El intervalo de concentración es de 0,50 a 4,5 ppm, tal como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16: Conjunto De Validación

Nro de experiencias	CA / ppm	TI / ppm	EU / ppm
1	4.5	1.0	0.5
2	0.8	1.0	4.5
3	4.5	5.0	4.5
4	0.8	5.0	0.5
5	0.8	5.0	4.5
6	4.5	1.0	4.5
7	0.8	1.0	0.5
8	4.5	5.0	0.5

Para cada una de las soluciones descritas se aplicó la VOC con los parámetros óptimos establecidos en la Tabla 12. En la Figura 54 se muestran los diecisiete voltamperogramas de OC registrados para la construcción del modelo de calibración.

Para aplicar el modelo quimiométrico se realiza, a dichos voltamperogramas, una corrección por línea de base y luego se alinean aplicando COW. El resultado del procedimiento para la alineación, se muestra en la Figura 55

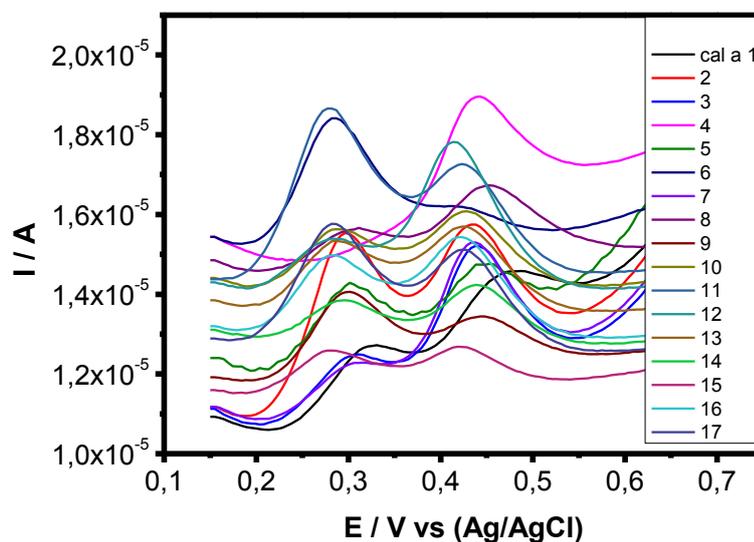


Figura 54: Gráfica de los diecisiete voltamperogramas de OC del modelo de calibración con la correspondiente corrección por líneas de base

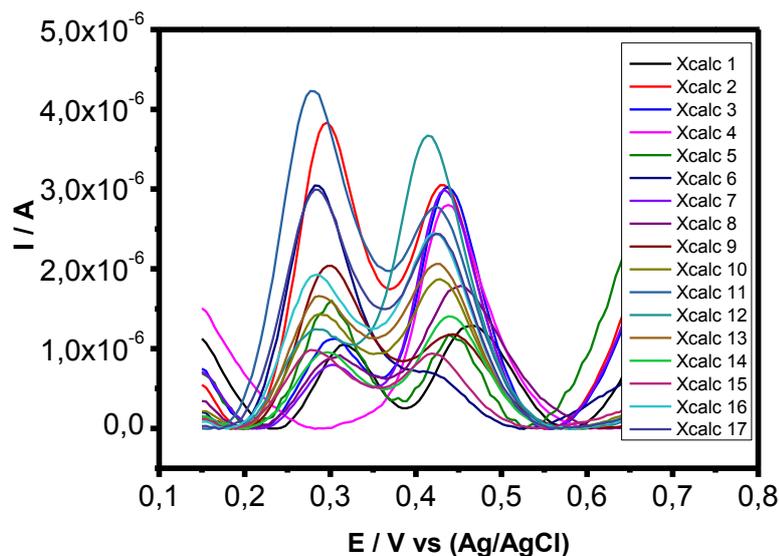


Figura 55: Grafica de los diecisiete voltamperogramas de OC del modelo de calibración con la correspondiente corrección alineación.

Por otra parte, en la Figura 56 se muestran los voltamperogramas de OC de las soluciones utilizadas para el conjunto de validación, luego de corregir la línea de base y aplicar COW para la alineación de los datos.

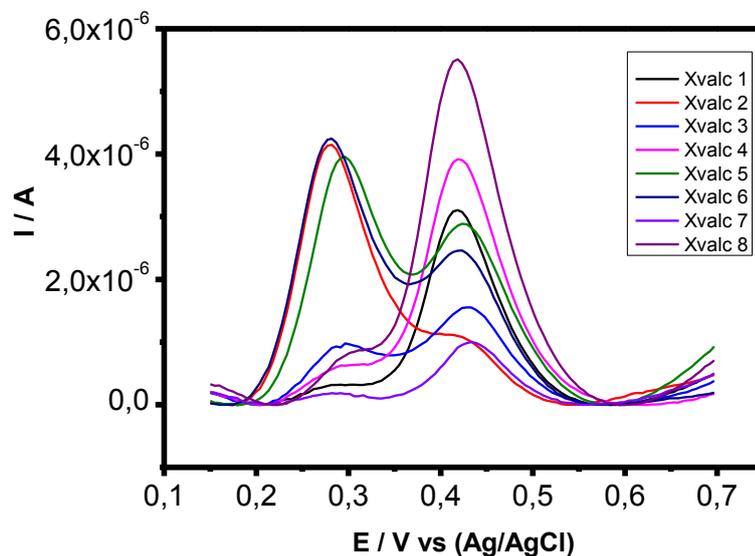


Figura 56: Voltamperogramas de OC del conjunto de validación. línea de base corregida y datos alineados.

La selección del mejor modelo se realiza teniendo en cuenta diferentes criterios. Primero, a través del seguimiento de los errores calculados, RMSE y REP% entre las concentraciones nominales y estimadas para cada sustrato. Segundo, para determinar la

exactitud y precisión del método se grafican las elipses de confianza conjunta entre la pendiente y la ordenada al origen (intercepción). Dado que, la pendiente y la intercepción no son estadísticamente independientes (siempre hay algún grado de correlación entre ellas) se analiza si el punto (1,0) ó ideal se incluye en la región elíptica de la confianza conjunta entre la pendiente y la intersección. Por lo tanto, se evalúa si las concentraciones estimadas por PLS-1 y el método RNA, difieren estadísticamente de las concentraciones nominales^{130,131}.

Entonces, la relación entre la corriente y la concentración de las mezclas de EU, TI y CA se analizaron primero por el método PLS-1 a través de una calibración multivariada realizada con el programa MATLAB¹²⁸.

Los resultados para el conjunto de las soluciones de validación se muestran en la Tabla 17 y las correspondientes gráficas de las elipses en la Figura 57 para cada analito. Los resultados obtenidos para TI y EU por el método PLS-1 incluyen el punto ideal, pero muestran una gran dispersión, mientras que para el CA no incluye dicho punto. Por lo tanto, se puede concluir que la aplicación del modelo de PLS-1 no muestra una capacidad predictiva para la cuantificación simultánea de TI, EU y CA.

Tabla 17: Resultados Para El Conjunto De Validación

Analitos	Región óptima (V)	PLS-1 componentes	RMSE	REP (%)	R ²
EU	0,1 a 0,7	2	0,96	37	0,76
TI	0,5 a 0,7	4	1,52	52	0,41
CA	0,4 a 0,6	6	1,64	60	0,19

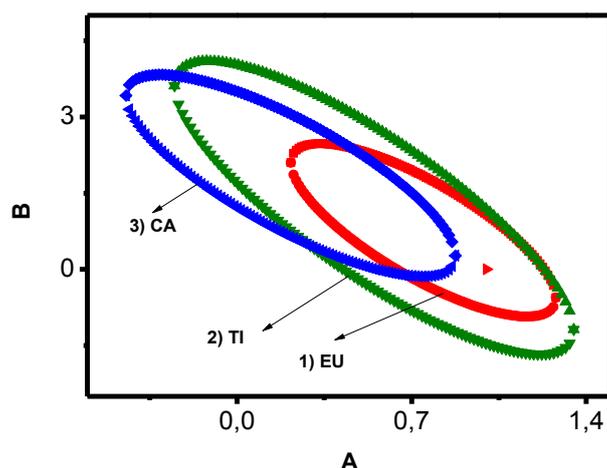


Figura 57: Región elíptica de confianza del conjunto de validación por PLS-1, para 1) EU, 2) TI y 3) CA, respectivamente, (▼) es el punto ideal.

De acuerdo a estos resultados, se aplicó el método RNA para la determinación simultánea de EU, CA y TI en miel. Para un modelo no lineal, se realiza únicamente una corrección de línea de base para los datos crudos y luego, los datos corregidos se utilizan para el próximo cálculo. Como se ha descrito anteriormente, el número de neuronas de la capa de entrada es igual al número de variables independientes introducidos en el modelo. En este caso, 113 parámetros obtenidos a partir de las respuestas voltamétricas, y el número de neuronas en la capa de salida se correspondieron con el número de variables de salida del modelo, es decir, las concentraciones nominales de cada analito.

Los parámetros optimizados y los errores estimados a partir de la metodología de la RNA se muestran en la Tabla 18 y en la Tabla 19 respectivamente.

Tabla 18: Parámetros optimizados

Fenol	EU	TI	CA
Arquitectura	113-4-1	113-8-1	113-7-1
Números de iteraciones	30	25	23
Función de transferencia capa oculta	Tansing	Tansing	Tansing
RMSETr, C ^a	0.0116	0.0121	0.0838
RSMEM, C ^b	0.0709	0.3716	0.0915
RSMET, C ^c	0.0131	0.0532	0.0771

^{a,b,c} Son el RMSE para el entrenamiento, supervisión y pruebas para el conjunto de calibración, respectivamente.

TABLA 19: Errores estimados

	EU	TI	CA
RMSE,C ^a	0.0914	0.2332	0.2901
REP ^a (%)	3.51	7.89	10.6

^a Para el conjunto de calibración

La relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones nominales para EU, CA y TI son lineales. Los parámetros se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20

y = A x + B			
Analito	A	B (ppm)	R
CA	(0.89 ± 0.06)	(0.26 ± 0.18)	0.96786
EU	(0.99 ± 0.02)	(- 0.03 ± 0.05)	0.99728
TI	(0.92 ± 0.05)	(0.31 ± 0.15)	0.98144

Por otra parte, en la Figura 58 se muestra la región elíptica de confianza conjunta obtenida a partir del conjunto de calibración por RNA, para 1) EU, 2) TI y 3) CA, respectivamente, (▼) es el punto ideal.

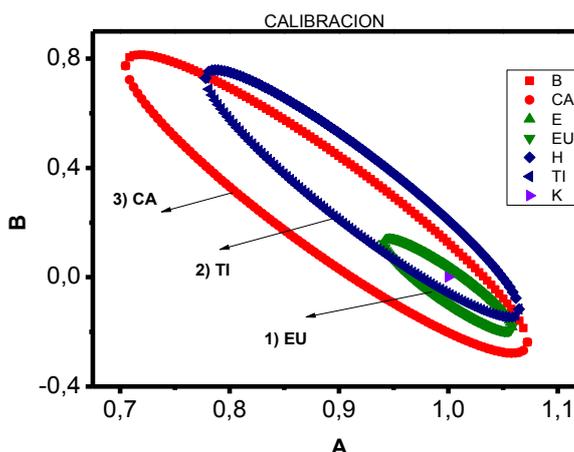


Figura 58: Región elíptica de confianza del conjunto de calibración por RNA, para 1) EU, 2) TI y 3) CA, respectivamente, (▼) es el punto ideal.

Después de optimizar el modelo aplicando RNA con el conjunto de calibración, se utilizó otro conjunto de voltamperogramas para realizar la etapa de validación o predicción, a través del análisis de exactitud y precisión. Las gráficas de las elipses y los errores estimados se muestran en la Figura 59 y en la Tabla 21 para cada sustrato.

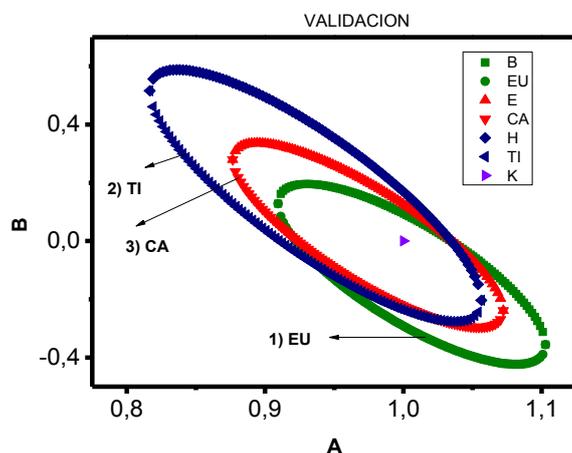


Figura 59: Región elíptica de confianza del conjunto de validación por RNA, para 1) EU, 2) TI y 3) CAR, respectivamente, (▼) es el punto ideal.

Tabla 21: Errores Estimados

	EU	TI	CA
RMSE,Pa	0.1587	0.2019	0.1336
REPa (%)	6.34	6.729	5.04

Como se puede observar, los resultados obtenidos por el método RNA incluyen el punto ideal para los tres analitos con una buena precisión y exactitud. Por lo tanto, el método de RNA resulta adecuado como un modelo de calibración para la determinación simultánea de EU, TI y CA.

Se calcularon los límites de detección y cuantificación para este método, los cuales se muestran a continuación (Tabla 22).

Tabla 22: Límites de detección y cuantificación

	EU/ mgL ⁻¹	TI/ mgL ⁻¹	CA/ mgL ⁻¹
LOD ^a (n=3)	0.010	0.240	0.210
LOQ ^a (n=3)	0.027	0.720	0.640

Por lo tanto el método ANNs es adecuado como un modelo de calibración para detectar simultáneamente TI, EU y CA.

Finalmente, se realizó una evaluación del efecto de la matriz con un conjunto de soluciones prueba, obtenidas contaminando miel con los analitos. Se preparó un conjunto de 5 (cinco) mezclas ternarias, con una cantidad aleatoria de cada analito en el mismo intervalo de concentración utilizada para la calibración. En la Tabla 23 se representan las concentraciones seleccionadas:

Todas las muestras fueron diluidas a un 15% con la solución reguladora de fosfato de pH=10, para ajustar el pH, y a continuación se transfirió una cantidad apropiada de cada muestra diluida a la celda electroquímica y las soluciones que se midieron en orden aleatorio.

Tabla 23: Evaluación de efecto matriz. mezclas ternarias.

Ppm	EU	CA	TI
C1	0,5	2,5	4,5
C2	1,5	4,5	0,5
C3	2,5	0,5	1,5
C4	3,5	1,5	3,5
C5	4,5	3,5	2,5

En la Figura 60 se muestran los voltamperogramas obtenidos luego de corregir la línea de base para cada una de estas soluciones. En la Tabla 24 y Tabla 25 se resumen los porcentajes de recuperación de cada analito y los errores luego de haber aplicado el modelo RNA.

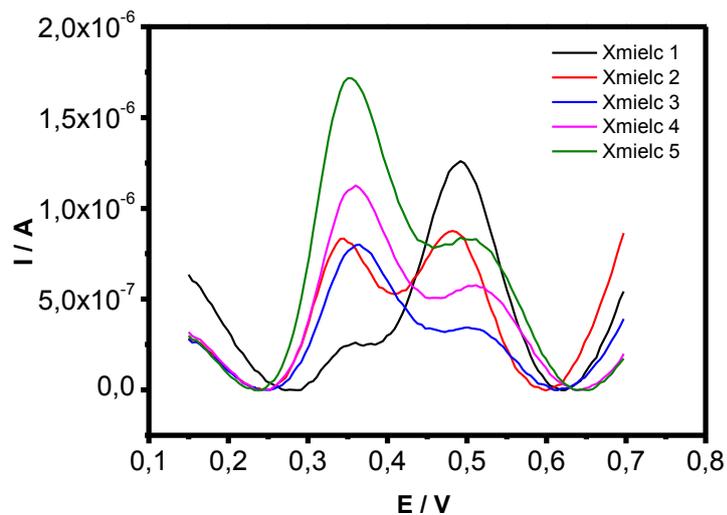


Figura 60: Voltamperogramas de las soluciones descritas en la Tabla 23 luego de corregir la línea de base de cada una. C1: 1, C2:2, C3: 3, C4: 4, C5:5

TABLA 24: Resultados obtenidos en la determinación de EU, TI y CA en muestra de miel diluídas al 15% en solución reguladora de fosfato a pH=10

EU	Concentración Nominal / mg L ⁻¹	Concentración estimada / mg L ⁻¹	Porcentaje de recuperación/ %
	0.5	0.52	104.0
	1.5	1.31	87.3
	2.5	2.32	92.8
	3.5	3.63	103.7
	4.5	4.51	100.2
TI			
	4.5	4.53	100.7
	0.5	0.68	136.0
	1.5	1.59	106.0
	3.5	3.36	96.0
	2.5	2.71	108.4
CA			
	2.5	2.49	99.6
	4.5	4.32	96.0
	0.5	0.36	72.0
	1.5	1.71	114.0
	3.5	3.16	90.3

Tabla 25: Errores Obtenidos

	EU	TI	CA
REP ^a (%)	5.24	5.79	8.17

Como conclusión, se han podido detectar simultáneamente TI, CA Y EU en miel utilizando el método de calibración multivariada no lineal (RNA) con el cual se obtuvieron muy buenos porcentajes de recuperación.

3.3 DETERMINACION COLORIMÉTRICA DE TIMOL Y CARVACROL EN ACEITES ESCENCIALES, LIBRE DE EXTRACCION, MEDIANTE LA FORMACIÓN DE NANOPARTICULAS DE ORO DEPENDIENTES DEL PH

Timol (TI) y carvacrol (CA) son los constituyentes principales de los aceites esenciales extraídos de las plantas aromáticas de orégano y tomillo^{132,133}. Ambos compuestos son fenoles e isómeros, como se puede apreciar en su estructura química (como se mostró en la sección 3.2.1), y tienen propiedades antibacteriana, antifúngicas, acaricidas y antioxidantes^{132,134,135}. Por esta razón, los aceites esenciales de tomillo y orégano se proponen como antimicrobianos y conservantes naturales en el ámbito alimenticio y de agricultura. Además, ambos compuestos actúan de manera sinérgica y se demostró que una proporción adecuada tiene mayor efecto antimicrobiano y acaracida^{136,137}.

Como la composición de estos AE depende del medio ambiente, tiempo de cosecha, técnica de extracción y métodos de procesamiento^{138,139} poder cuantificar estos compuestos y su proporción en aceites esenciales, puede ser un excelente indicador del poder antimicrobianos de estos productos naturales.

Una manera rápida y sencilla de determinar el contenido de fenoles totales, es a través de la formación de nanopartículas de oro (AuNPs), esta metodología consiste en aprovechar la capacidad reductora de los compuestos fenólicos para reducir el Au(III) a Au(0) y, mediante condiciones específicas, formar AuNPs. La cantidad de nanopartículas que se forman (indicadora de la presencia de compuestos fenólicos) se monitorea por espectrofotometría visible (en torno a 550 nm), aprovechando el efecto de plasmón superficial de las nanopartículas de oro, y a simple vista la solución coloidal cambia de color por la presencia de las mismas.

3.3.1 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE TIMOL Y CARVACROL PARA FORMAR NANOPARTICULAS DE ORO.

El esquema seguido para la formación de las AuNPs fue descrito en la sección 3.3.3, y se realizó un estudio variando el pH de 8 a 12. De este estudio se observó que a pHs ≤ 11 sólo CA forma AuNPs, observándose la banda de absorción en el UV-visible alrededor de 550 nm y a pH=12, ambos analitos muestran señales de absorción a 550 nm producto de la presencia de AuNPs. (Figura 61)

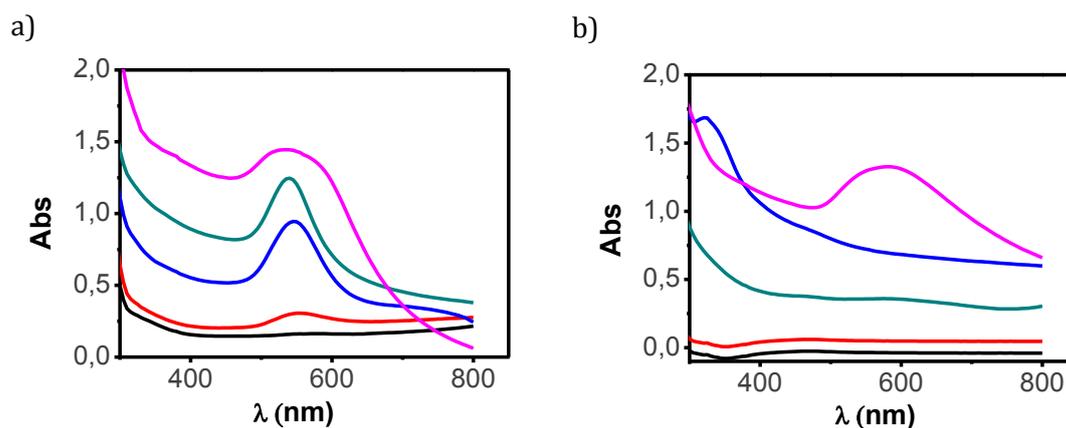


Figura 61: Espectro de absorbancia 0,25 mM a) CA y a) TI. línea negra: solución a pH=8; línea roja solución a pH=9; línea azul solución a pH=10; línea verde solución a pH=11; línea rosa solución a pH= 12.

Luego de estos hallazgos, se realizó un estudio comparativo entre pH=9 y pH=12 para ambos compuestos. En la Figura 62 se muestra el espectro de absorción de AuNPs, la fotografía de las soluciones coloreadas y las imágenes del TEM para TI, CA y el blanco a pH=9. Como se puede observar en el espectro, sólo el CA presenta una absorción alrededor de 550 nm (solución colorada-roseasa), siendo que el TI no presenta absorción (solución incolora) en comparación del blanco (solución incolora). Las imágenes del TEM confirman la presencia de nanopartículas de oro en la solución de CA y la ausencia de ellas en las soluciones de TI.

Luego, en la Figura 63, se muestra el espectro de absorción de AuNPs, la fotografía de las soluciones coloreadas y las imágenes del TEM para TI, CA y el blanco a pH=12, confirmando que en estas condiciones ambos analitos forman nanopartículas de oro.

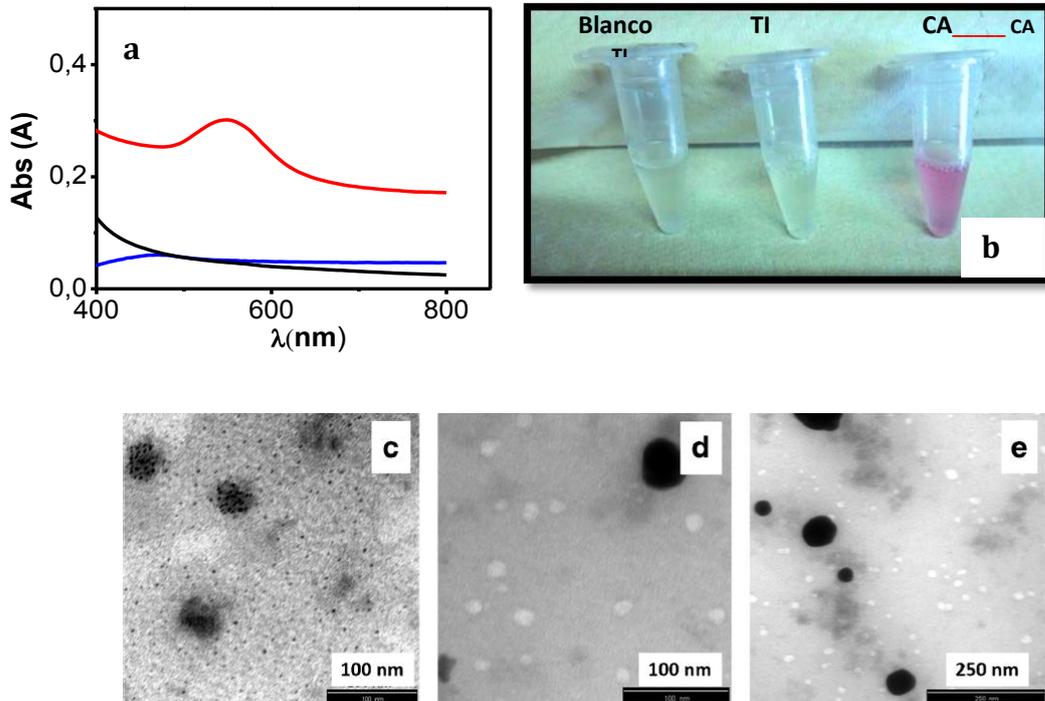


Figura 62: Banda de absorción característica de AuNPs a 500 nm sólo para CA, cambio de color en la solución coloidal de CA y caracterización por TEM: CA (c);TI (d) y blanco (e) (pH=9, 0,25 mm)

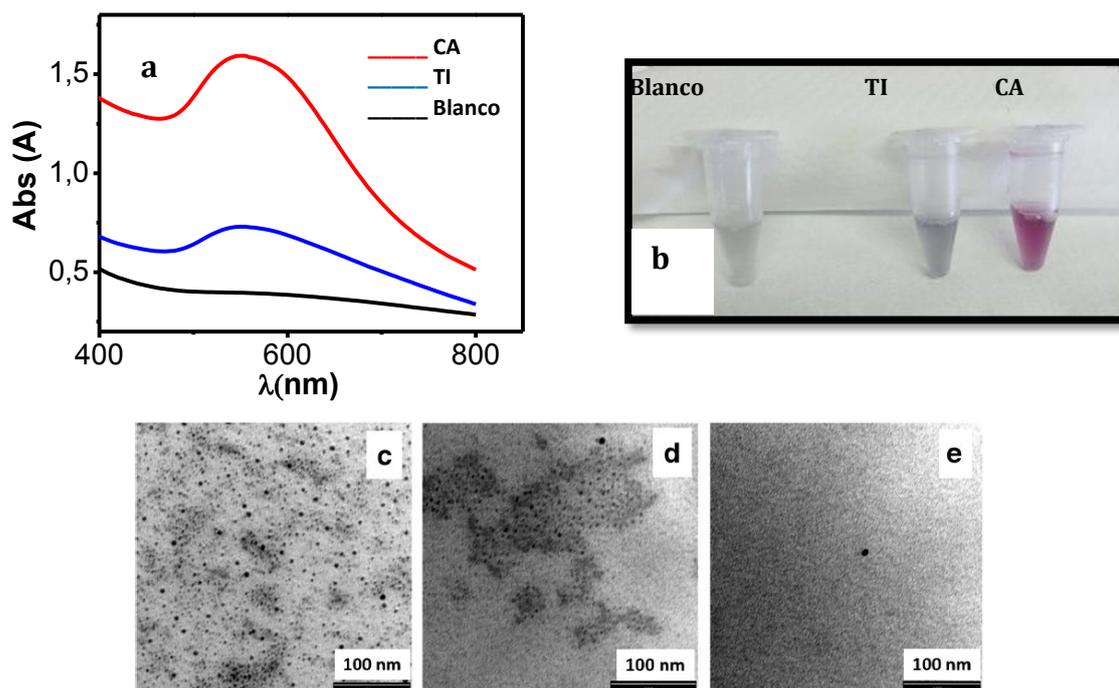


Figura 63: Banda de absorción característica de AuNPs a 500nm para TI y CA, cambio de color en la solución coloidal de ambos analitos y caracterización por TEM: CA (c); TI (d) y blanco (e) (pH=12, 0,1 mm)

Sin embargo a pH=12 se observan bandas más anchas alrededor de 550 nm y con cola hacia la región del rojo para TI y CA (Figura 63 a) y además un pequeño corrimiento del máximo de absorción también hacia la región del rojo para el CA en comparación de lo que se observa a pH=9, por estas razones la solución de CA es mas purpura, y mas azulada para el TI. Supusimos que este cambio de color está relacionado con la agregación de las nanopartículas de oro y no con un aumento en el tamaño de ellas ya que el tamaño es similar entre pH 9 y pH 12 ($\phi \leq 20$ nm).

Ya es conocido que cuando se produce una disminución en la distancia entre partículas, se superponen los campos de plasmón de las partículas cercanas, lo que provoca un desplazamiento al rojo de la banda de resonancia de plasmón de superficial¹⁴⁰.

Para poder entender este comportamiento de formación y no formación de AuNPs del TI según el pH, se realizaron voltagramas cíclicos en tampones fosfato a pH=9 y pH= 12 de TI y CA para estudiarles las propiedades electroquímicas. Estos voltagramas fueron recorridos de -0,2 a 0,4 V para pH=12, y de -0,2 a 0,8 V para pH=9 a una velocidad de 50 mV/s.

La Figura 64 muestra que el comportamiento electroquímico de ambos compuestos a los pHs estudiados es similar, es decir que los valores de potencial de los picos anódicos de TI y CA son muy parecidos entre ellos y a ambos pHs, viéndose un corrimiento hacia potenciales menos positivos cuando el pH aumenta, es decir que la oxidación se facilita a pH mas alcalinos. Esto se debe a que los fenoles tiene un carácter de ácido débil (el pK_a en solución acuosa del TI y CA son $pK_a = 11.11$ y $pK_a = 11.02$ respectivamente) por lo que la abstracción del H^+ se ve favorecida a pHs más alcalinos (pK_a fenol = 10), formando el anión fenolato el cual se oxida más fácilmente que la molécula no dissociada.

Por lo tanto, los potenciales de pico no explican la diferencia del comportamiento de CA y TI. Respecto a las corrientes faradaicas, CA mostró valores más altos que TI, por lo que significa que CA posee una mayor capacidad antioxidante que TI ya que ambos compuestos exhiben un potencial de oxidación idéntico. Esto podría explicar la diferencia en el comportamiento que tienen estos analitos para formar nanoparticulas de oro según el pH del medio.

Otra explicación a este comportamiento, es que el TI posee un grupo isopropilo en posición orto respecto al grupo hidroxilo, lo cual le estaría provocando un impedimento estérico para que pueda reducir el Au(III) y así formar AuNPs a pH menos básicos, en contracara con el CA donde el grupo voluminoso isopropilo se encuentra en posición meta respecto al grupo hidroxilo, pero para concluir esto, se deben realizar más experiencias.

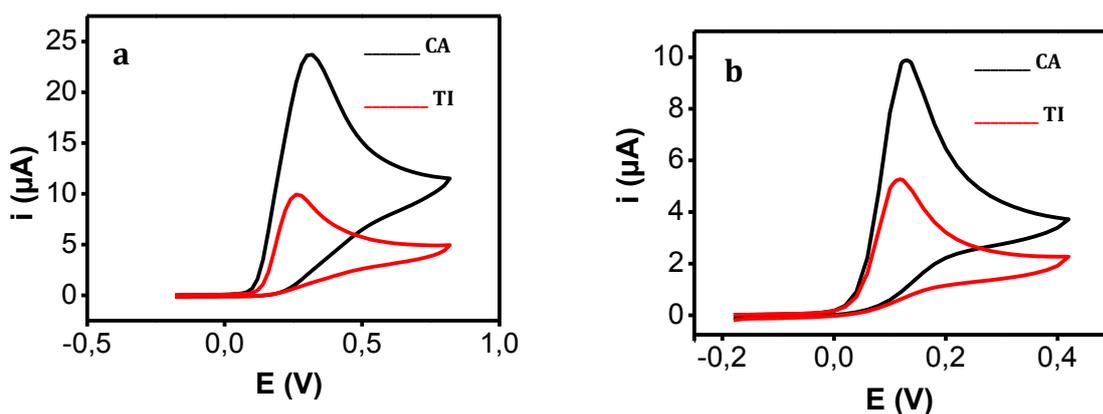


Figura 64: Voltagramas cíclicos de TI y CA a) pH=9, b) pH= 12. Velocidad de barrido: 50mV/s.

3.3.2 DETERMINACIÓN TOTAL Y CUANTIFICACIÓN DIFERENCIAL DE TI Y CA EN ACEITES ESENCIALES

3.3.2.1 CURVAS DE CALIBRACION A PH=9 Y 12

De acuerdo a los resultados anteriores, se desarrollaron dos métodos de trabajo: uno, para cuantificar sólo CA a pH=9, y otro para determinar el contenido total de CA y TI trabajando a pH=12.

En la

Figura 65 se muestran las curvas de calibración que se realizaron utilizando como estándar el CA a pH=9 y pH=12. En ambas se obtuvieron una muy buena relación lineal entre absorbancia y concentración, donde el rango de concentraciones para CA utilizados a pH=9 fue de 0,1 mM a 1 mM ($r=0,993$) con un límite de detección de $0,09 \mu\text{M}$ y a pH=12 fue de 0,05 mM a 0,2 mM ($r=0,994$), con un límite de detección de $0,02 \mu\text{M}$.

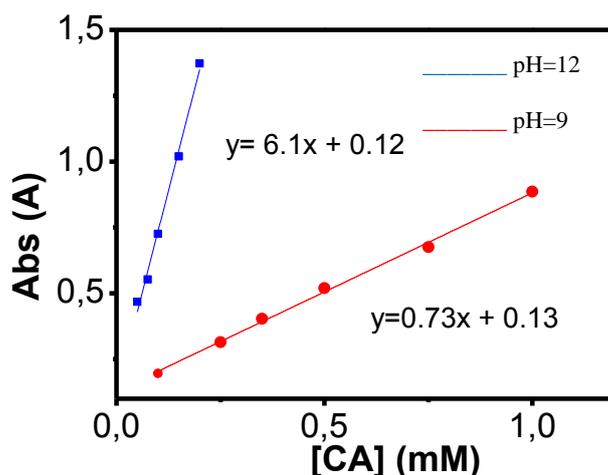


Figura 65: Curvas de calibración a pH=9 y 12. Las medidas de absorbancia fueron medidas a 550nm.

Luego se utilizaron estas curvas para cuantificar TI y CA en aceites esenciales de tomillo y orégano.

3.3.2.2 CUANTIFICACION DE TI Y CA EN TOMILLO Y OREGANO

Para esto, se prepararon las disoluciones coloidales con los aceites siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.3.3, y se midió la absorbancia a 550nm, con este valor se extrapó en la curva de calibración y así se obtuvo el valor de la concentración de CA y

TI en Tomillo y Orégano a pH=12, y sólo la de CA a pH=9. Por diferencia también se obtiene la concentración de TI en estos aceites (

Tabla 26).

Nuestros resultados indican que el aceite esencial de *Origanum vulgare* contiene más CA que TI, a diferencia del *Thymus vulgaris*, que contiene principalmente TI. Estos resultados no se confirman con otras metodologías, pero son muy consistentes con la bibliografía^{133,134,138}. Además podemos decir que las AuNPs fueron formadas exclusivamente por estos analitos ya que son los compuestos principales de estos aceites.

Tabla 26: cuantificación diferencial de TI y CA en AE de Tomillo y Orégano

Muestra	Cuantificación a pH=12 (CA+TI) %p/p	Cuantificación a pH=9 (CA) %p/p	Cuantificación por diferencia (TI) %p/p	Relación CA/TI
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	0,46	0,10	0,36	0,3
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	0,75	0,41	0,34	1,2

3.3.2.3 VALIDACION DEL METODO

Nuestro método se validó con el ya estudiado Folin-Ciocalteu. Este es un método espectrofotométrico que cuantifica la concentración total de grupos hidroxilos fenólicos presentes en la muestra, entonces lo comparamos con nuestro método a pH=12 que también detecta nuestro fenoles en cantidades totales.

Esta técnica se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, dicho reactivo se reduce por acción de los polifenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida absorbe a 760 nm. Si bien el método tradicionalmente utiliza patrones de ácido gálico, en este trabajo se utilizaron patrones de CA para que los métodos sean más comparativos.

Para ello se tomaron 0,5ml de muestra patrón, blanco o aceite esencial y se depositaron en matraces de 25 mL de capacidad. A continuación se añadieron 0,5 mL de reactivo Folin agitando la mezcla durante 3 minutos. Posteriormente se añadieron 10mL de Carbonato de Sodio Anhidro (75 g/L) y se enrazó con agua a 25 mL. La mezcla se mantuvo durante una

hora agitando. Finalmente, las disoluciones se midieron espectrofotométricamente a 750 nm y se armó una curva de calibración. Luego se cuantifico fenoles totales en los AE.

Se realizaron los estudios estadísticos para poder comparar ambos métodos y analizar si el nuevo método es válido para cuantificar los analitos en aceites esenciales. Los resultados se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27: Desviación Estándar Y Estándar Porcentual-

Muestra	Método	Concentración (% p/p)±s	RDS (%) (n=3)
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	AuNPs pH=12	0,46±0,02	5
	Folin-Ciocalteu	0,44±0,01	3
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	AuNPs pH=9	0,75±0,02	4
	Folin-Ciocalteu	0,70±0,04	6

Los resultados muestran una muy buena correlación entre ambos métodos ($\alpha=0,05$), por lo que esta metodología permite calcular las proporciones de CA / TI y puede ser un enfoque interesante para medir el poder antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo y orégano.

Además, es importante hacer hincapié en que esto no necesita un procedimiento de extracción previo, lo cual lo vuelve más interesante aun.

CAPÍTULO 4: CONCLUSIÓN

La sanidad es uno de los factores más importantes para el logro de una buena producción apícola, ya que son numerosas las enfermedades que afectan a las abejas, en sus diferentes estados de desarrollo, debilitando las poblaciones en las colmenas. Entre ellas, las de mayor incidencia son la Loque Americana y la Varroasis. La primera producida por la bacteria *Paenibacillus larvae* y la segunda por el ácaro *Varroa destructor*. Para su control se emplean habitualmente antibióticos y acaricidas sintéticos, respectivamente. La tendencia mundial a exigir alimentos de calidad que no perjudiquen la salud ni el ambiente ha llevado a tratar de disminuir el empleo de este tipo de sustancias. El uso de productos naturales, no nocivos para el ser humano y obtenidos por metodologías sencillas podría representar una alternativa. Los extractos vegetales y aceites esenciales han sido reconocidos como agentes antimicrobianos y acaricidas y han atraído, recientemente, el interés científico.

Achyrocline satureioides, popularmente conocida como “Marcela de Campo”, es una planta medicinal que se utiliza con diversos fines terapéuticos. Esta planta fue seleccionada como objeto de estudio particularmente, por su actividad antimicrobiana contra *P. Larvae*.

Las plantas utilizadas para el estudio fueron recolectadas en Santa Mónica, Provincia de Córdoba y caracterizadas botánicamente. En primer lugar, se realizó una maceración hidroalcohólica de la planta y luego sucesivas extracciones con hexano, ya que esta fracción es la que presenta mayor actividad inhibitoria contra cepas de *P.larvae*. Finalmente, se evaporó el solvente y se obtuvo el extracto hexánico completo con un rendimiento de 0,66% p/p. A dicho extracto se le realizó un análisis fitoquímico preliminar el cual arrojó que contiene principalmente flavonoides, taninos, naftoquinonas y en menor proporción esteroides.

El extracto hexánico completo (EHC) se sometió a una CCF para su purificación, como resultado se obtuvieron cinco fracciones, que fueron identificadas por CCD por sus diferentes Rf. Cada una de estas fracciones se purificaron aplicando distintas técnicas cromatográficas y se procedió a la caracterización química de los compuestos activos por espectroscopía de ^1H RMN y ^{13}C RMN. Estos estudios arrojaron como resultado la identificación de cuatro compuestos mayoritarios: el (S) -3 - *[{5,7-dihidroxi-2,2-dimetil-8-(2-metilbutanoil) -2H-cromen-6-il} metil] -6-etilo -4-hidroxi-5 metil-2H-piran-2-ona*

(compuesto 1); el *5,7-dihidroxy-3,8-dimetoxiflavona (gnafaliina A)* (compuesto 2), el *3 - [[4,6-Dihidroxi-7- (2- (S) -metilbutanoil) -2- (prop-1-en-2-il) -2,3-dihidrobenzofuran-5-il] metil] -6- etil-4-hidroxi-5-metil-2H-piran-2-ona* (compuesto 3), y por último el *23-metil-6-O-desmetil-auricepirona* (compuesto 4), que coinciden con los reportados previamente en literatura para “Marcela de Campo”, aplicando un método diferente de extracción.

Si bien estos compuestos ya han sido aislados e identificados por otros autores, como se mencionó anteriormente, no se ha estudiado su actividad antimicrobiana contra *P.larvae*. Por lo tanto, a cada uno de estos compuestos puros y al EHC se les midió la actividad antimicrobiana frente a una cepa de *P.larvae*. Los resultados mostraron que el compuesto 3 es el que mayor CIM (0,07 ppm) posee seguido por el compuesto 4 que también presenta buena actividad (0,26 ppm), en comparación con los compuestos 1 y 2 (1,05 ppm y 2,5 ppm, respectivamente). Por otra parte, el EHC posee menor CIM (0,4 ppm) que los compuestos 1 y 2 pero mayor que la de los compuestos 3 y 4. En cuanto a la capacidad bactericida, el compuesto 4 es el que tiene mayor CBM (0,26 ppm) seguido por el compuesto 3 con una CBM de un orden similar (0,5 ppm), pero muy por encima de los compuestos 1 y 2 (6,5 ppm y 6,2 ppm, respectivamente) y del EHC al cual no se pudo determinar la CBM. Estos resultados indicarían que en el EHC se producen interacciones sinérgicas y antagónicas entre sus compuestos que determinan el comportamiento de la fracción completa. Estos estudios se deben continuar para determinar las interacciones entre cada fracción en particular y cuál es la mezcla responsable de la actividad antimicrobiana.

La Varroasis, como se mencionó anteriormente, es otra de las enfermedades que preocupa ampliamente a los apicultores. Para el tratamiento de esta enfermedad se utilizan como componentes naturales alternativos, en reemplazo de los acaricidas sintéticos, aceites esenciales que poseen todos o algunos de los fenoles: Timol, Carvacrol y Eugenol. Sin embargo, estos compuestos deben ser utilizados de manera correcta y en la cantidad adecuada dado que pueden cambiar algunas de las propiedades organolépticas de la miel dificultando su comercialización. Por lo tanto, es indispensable contar con métodos de análisis rápidos, que no requieran un pretratamiento de la muestra y de bajo costo para detectarlos en miel o cuantificarlos en los aceites esenciales.

En este trabajo se desarrollaron dos metodologías de análisis para TI, CA y EU. Una de ellas, un método electroquímico empleando una herramienta quimiométrica que

permitió cuantificar en forma simultánea los tres componentes en miel, sin previo tratamiento de la muestra. Este trabajo fue publicado en el año 2016 en la revista *Talanta*¹⁴¹.

La otra metodología desarrollada es un método espectroscópico que se basa en la capacidad de TI y CA para formar nanopartículas de oro (AuNPs), dependiendo del pH del medio de reacción y se utilizó para cuantificar el contenido total y la proporción de TI y CA en aceites esenciales de tomillo y orégano. Esto resulta de gran interés dado que la cantidad de estos compuestos fenólicos, presentes en los aceites esenciales, depende de varios factores como el lugar de siembra, época de cosecha, clima etc. Por otra parte, resulta interesante determinar la proporción de CA/TI dado que los mismos actúan de manera sinérgica.

La metodología consiste en aprovechar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos para reducir el Au(III) a Au(0) y, mediante condiciones específicas, formar AuNPs. La cantidad de nanopartículas que se forman se monitorea por espectrofotometría visible (en torno a 550 nm) aprovechando el efecto de plasmón superficial de las AuNPs. Los resultados mostraron que a $\text{pH} \leq 11$ solo el CA formaba AuNPs, mientras que a pH 12 ambos compuestos lo hacían. En base a esto, se desarrollaron dos métodos trabajando a diferentes pHs: a pH 12 para determinar el contenido total de CA y TI y a pH 9 para estimar el contenido de CA únicamente. Su eficacia se comprobó analizando aceites esenciales de tomillo y orégano. El método a pH 12 se comparó con el método estándar Folin Ciocalteu para medir polifenoles totales obteniéndose una buena correlación. Este trabajo fue publicado en el año 2018 en la revista *Microchimica Acta*¹⁴².

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Garzón, J.M.; Young, M. La Actividad Apícola En Córdoba. Aspectos Básicos Y Potencial Productivo, IERAL. *Ministerio de Agricultura y Ganadería de Córdoba*. 2016.
- (2) [Http://supercampo.perfil.com/2014/06/la-argentina-](http://supercampo.perfil.com/2014/06/la-argentina-). La Argentina, el país con más colmenas del Hemisferio Sur.
- (3) Mondragón Cortez, P.M.; Rodríguez Rodríguez, R. *Apicultura En El Noroeste de Córdoba*; Cordoba, 2013.
- (4) Crozier, R. H., & Crozier, Y. C. The Mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis Mellifera*: Complete Sequence and Genome Organization. *Genetic* **1993**, *133* (1), 97–117.
- (5) Ospina Rua, D. N. *Caracterizacion de La Produccion Apicola*; Buenos Aires, Argentina, 2009.
- (6) Simon-Delso, N.; Martin, G. S.; Bruneau, E.; Minsart, L. A.; Mouret, C.; Hautier, L. Honeybee Colony Disorder in Crop Areas: The Role of Pesticides and Viruses. *PLoS One* **2014**, *9* (7), 1–16.
- (7) Meana, A.; Llorens-Picher, M.; Euba, A.; Bernal, J. L.; Bernal, J.; García-Chao, M.; Dagnac, T.; Castro-Hermida, J. A.; Gonzalez-Porto, A. V.; Higes, M.; et al. Risk Factors Associated with Honey Bee Colony Loss in Apiaries in Galicia, NW Spain. *Spanish J. Agric. Res.* **2017**, *15* (1), e0501.
- (8) Dubois, E.; Reis, C.; Schurr, F.; Cougoule, N.; Ribière-Chabert, M. Effect of Pollen Traps on the Relapse of Chronic Bee Paralysis Virus in Honeybee (*Apis Mellifera*) Colonies. *Apidologie* **2018**, *49* (2), 235–242.
- (9) Kulhanek, K.; Steinhauer, N.; Rennich, K.; Caron, D. M.; Sagili, R. R.; Pettis, J. S.; Ellis, J. D.; Wilson, M. E.; Wilkes, J. T.; Tarry, D. R.; et al. A National Survey of Managed Honey Bee 2015–2016 Annual Colony Losses in the USA. *J. Apic. Res.* **2017**, *56* (4), 328–340.
- (10) Ratnieks, F. L. W.; Carreck, N. L. Clarity on Honey Bee Collapse? *Science* (80-.). **2010**, *327* (5962), 152–153.
- (11) Richardson, L. A. A Swarm of Bee Research. *Plos Biol.* **2017**, *14* (1), 5–8.
- (12) Oldroyd, B. P. What’s Killing American Honey Bees?. *PLoS Biol.* **2007**, *6* (5), 168.
- (13) Genchi García, M. L., Plischuk, S., Bravi, C. M., & Reynaldi, F. J. Síndrome de Despoblamiento de Colmenas: Estudio de Caso En La Provincia de Buenos Aires. *IV Congr. Int. Científico y Tecnológico-CONCYT 2017*. **2017**.
- (14) Cox-Foster, D. L.; Conlan, S.; Holmes, E. C.; Palacios, G.; Evans, J. D.; Moran, N. A.; Quan, P. L.; Briese, T.; Hornig, M.; Geiser, D. M.; et al. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science* (80-.). **2007**, *318* (5848), 283–287.
- (15) Paxton, R. J. Does Infection by *Nosema Ceranae* Cause “Colony Collapse Disorder” in Honey Bees (*Apis Mellifera*)? *J. Apic. Res.* **2010**, *49* (1), 80–84.
- (16) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).

CÓDIGO INTERNACIONAL RECOMENDADO REVISADO DE PRÁCTICAS-
PRINCIPIOS GENERALES DE HIGIENE DE LOS ALIMENTOS (CAC/RCP 1-
1969, Rev 3. *Control* **2003**, 35.

- (17) Bogdanov, S.; Kilchenmann, V.; Imdorf, A. Acaricide Residues in Honey , Beeswax and Propolis. *Swiss Bee Res. Cent.* **1999**, 1–11.
- (18) <http://www.mincyt.gob.ar/adjuntos/archivos/000/047/0000047560.pdf>.
PROSPECTIVA TECNOLÓGICA AL 2025 DEL COMPLEJO APÍCOLA.
- (19) SENASA. Manejo sanitario integral <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/abejas/prod>.
- (20) Tiranti, K.1; Melegatti, P.1, 2; Ingrassia, M.1, 2; Julian, A.1, 2; Degioanni, A.1; Aime, F. . y; Larriestra, A. 1. Prevalencia de Enfermedades En Abejas Melíferas (*Apis Mellifera* L.) En Apiarios Del Sur de La Provincia de Córdoba. *Veterinaria* **2018**, 35 (362), 1–9.
- (21) Traver, B. E.; Fell, R. D. Nosema Ceranae in Drone Honey Bees (*Apis Mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* **2011**, 107 (3), 234–236.
- (22) Ivars, J. Enfermedades de las colmenas: Nosemosis
<https://www.latiendadelapicultor.com>.
- (23) Nazzi, F.; Le Conte, Y. Ecology of *Varroa Destructor* , the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis Mellifera*. *Annu. Rev. Entomol.* **2016**, 61 (1), 417–432.
- (24) Hansen, H.; Brødsgaard, C. J. American Foulbrood: A Review of Its Biology, Diagnosis and Control. *Bee World* **1999**, 80 (1), 5–23.
- (25) Invernizzi, C.; Antúnez, K.; Campa, J. P.; Harriet, J.; Mendoza, Y.; Santos, E.; Zunino, P. Situación Sanitaria de Las Abejas Melíferas En Uruguay. *Vet.* **2011**, 47 (181), 15–27.
- (26) Brødsgaard, C. J.; Ritter, W.; Hansen, H. Response of in Vitro Reared Honey Bee Larvae to Various Doses of *Paenibacillus* Larvae Spores. *Apidologie* **1998**, 29 (6), 569–578.
- (27) Brødsgaard, C. J., Ritter, W., & Hansen, H. Response of in Vitro Reared Honey Bee Larvae to Various Doses of *Paenibacillus* Larvae Spores. *Apidologie* **2010**, 29 (6), 569–578.
- (28) Alippi, A. Loque Americana: Problemática Actual En Argentina. *Vida Apícola* **1995**, 73, 49–53.
- (29) Genersch, E. American Foulbrood in Honeybees and Its Causative Agent, *Paenibacillus* Larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, 103 (SUPPL. 1), 10–19.
- (30) Chantawannakul, P.; Dancer, B. N. The Proteases of American Foulbrood. *J. Invertebr. Pathol.* **1997**, 70 (70), 79–87.
- (31) Yue, D.; Nordhoff, M.; Wieler, L. H.; Genersch, E. Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) Analysis of the Interactions between Honeybee Larvae and *Paenibacillus* Larvae, the Causative Agent of American Foulbrood of Honeybees (*Apis Mellifera*). *Environ. Microbiol.* **2008**, 10 (6), 1612–1620.
- (32) Alippi, A. M. (1996). Caracterización de Aislamientos de *Paenibacillus* Larvae Mediante Tipo Bioquímico Y Resistencia a Oxitetraciclina. *Rev. Argent. Microbiol.*

- 1996, 28 (4), 197–203.
- (33) García, D. . Impacto Social de La Presencia de Residuos Químicos de Síntesis En Los Productos de La Colmena. *REDVET. Rev. Electrónica Vet.* **2007**, 8 (10), 1–12.
- (34) Genersch, E. American Foulbrood in Honeybees and Its Causative Agent, Paenibacillus Larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, 103 (1), S10–S19.
- (35) Rosenkranz, P.; Aumeier, P.; Ziegelmann, B. Biology and Control of Varroa Destructor. *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, 103 (1), S96–S119.
- (36) Anderson, D.; Trueman, J. Varroa Jacobsoni (Acari: Varroidae) Is More than One Species. *Exp. Appl. Acarol.* **2000**, 24 (3), 165–189.
- (37) Pino, O.; Sánchez, Y.; Rodríguez, H.; Correa, T.; Demedio, J.; Sanabria, J. CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ACARICIDAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL FROM Piper Aduncum Subsp. Ossanum against Varroa Destructor. *Rev. Protección Veg.* **2011**, 26 (1), 52–61.
- (38) Marín, I.; Sayas-Barberá, E.; Viuda-Martos, M.; Navarro, C.; Sendra, E. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Organic Fennel, Parsley, and Lavender from Spain. *Foods* **2016**, 5 (1), 18.
- (39) Rakholiya, K. D.; Kaneria, M. J.; Chanda, S. V. Medicinal Plants as Alternative Sources of Therapeutics against Multidrug-Resistant Pathogenic Microorganisms Based on Their Antimicrobial Potential and Synergistic Properties. In *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*; Academic Press, Ed.; 2013; pp 165–179.
- (40) Muñoz, F. *Plantas Medicinales Y Aromáticas, Estudio Cultivo Y Procesado*; Prensa, M., Ed.; Madrid-España, 1996.
- (41) Fernández, A. Fitoquímica Del Agave Salmiana. (Tesis Profesional, Cholula Puebla, 2005.
- (42) Rakholiya, K., Vaghela, P., Rathod, T., & Chanda, S. Comparative Study of Hydroalcoholic Extracts of Momordica Charantia L. against Foodborne Pathogens. *Indian J. Pharm. Sci.* **2014**, 76 (2), 148.
- (43) Oliva, M. de las M.; Carezzano, M. E.; Giuliano, M.; Daghero, J.; Zygadlo, J.; Bogino, P.; Giordano, W.; Demo, M. Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Thymus Vulgaris* and *Origanum Vulgare* on Phytopathogenic Strains Isolated from Soybean. *Plant Biol.* **2015**, 17 (3), 758–765.
- (44) Cushnie, T. T. and A. . Lamb, Antimicrobial Activity of Flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, 26 (5), 343–356.
- (45) Shashank, K.; Pandey, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids. *Hindawi Sci. World J.* **2013**, 2013 (12), 533–548.
- (46) Friedman, M.; Henika, P. R.; Levin, C. E.; Mandrell, R. E. Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against Escherichia Coli O157:H7 and Salmonella Enterica in Apple Juice. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (19), 6042–6048.
- (47) Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological Effects of Essential Oils - A Review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46 (2), 446–475.

- (48) Heredia, J. Extractos de *Achyrocline Satureioides* (Marcela) Como Alternativa Natural Para El Control de *P. Syringae*, Fitopat6gena de Soja Y *P. Larvae*, Agente Causal de Loque Americana En *A. Mellifera*, Universidad Nacional de Rio Cuarto (UNRC), 2015.
- (49) Lorenzo, D.; Atti-Serafini, L.; Santos, A. C.; Frizzo, C. D.; Paroul, N.; Paz, D.; Dellacassa, E.; Moyna, P. *Achyrocline Satureioides* Essential Oils from Southern Brazil and Uruguay. *Planta Med.* **2000**, *66* (5), 476–477.
- (50) Retta, D.; Dellacassa, E.; Villamil, J.; Su1rez, S. A.; Bandoni, A. L. Marcela, a Promising Medicinal and Aromatic Plant from Latin America: A Review. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *38* (1), 27–38.
- (51) Parodi, D. Enciclopedia Argentina de Agricultura Y Jardinería. *ACME*; 1979; pp 125–140.
- (52) Lorenzi, H., & Matos, F. J. *Plantas Mediciniais No Brasil: Nativas E Ex6ticas.*; Sao Paulo, Brasil, 2002.
- (53) Gupta, M. *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*; Editorial Presencia, Ed.; Santaf6 de Bogot1, Colombia, 1995.
- (54) Alonso, A., & Desmarchelier, C. *Plantas Medicinales Aut6ctonas de La Argentina. Bases Científicas Para Su Aplicaci6n En Atenci6n Primaria de La Salud*; Fitociencia, E., Ed.; Buenos Aires, Argentina, 2005.
- (55) Gonzales, M. Caracterizaci6n de Algunos Productos Naturales Con Actividad Antimicrobiana Contra *Paenibacillus Larvae*, Agente Causal de Loque Americana, Universidad Nacional de Río Cuarto, 2011.
- (56) Tepe, B.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Sokmen, M.; Polissiou, M. Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Various Extracts of *Salvia Tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem.* **2005**, *90* (3), 333–340.
- (57) Ramzi, H.; Ismaili, M. R.; Aberchane, M.; Zaanoun, S. Chemical Characterization and Acaricidal Activity of *Thymus Satureioides* C. & B. and *Origanum Elongatum* E. & M. (Lamiaceae) Essential Oils against *Varroa Destructor* Anderson & Trueman (Acari: Varroidae). *Ind. Crops Prod.* **2017**, *108* (January), 201–207.
- (58) Bustos, M., Flores, J. M., Puerta, F., Ruiz, J. A., & Ruz, J. M. Situaci6n Actual de La Parasitosis Por *Varroa*. *MG Mundo Ganad.* **2000**, *120* (7), 49–51.
- (59) Ramzi, H.; Ismaili, M. R.; Aberchane, M.; Zaanoun, S. Chemical Characterization and Acaricidal Activity of *Thymus Satureioides* C. & B. and *Origanum Elongatum* E. & M. (Lamiaceae) Essential Oils against *Varroa Destructor* Anderson & Trueman (Acari: Varroidae). *Ind. Crops Prod.* **2017**, *108* (June), 201–207.
- (60) Girişgin, A. O.; Barel, S.; Barzilai Zilberman, D.; Girişgin, O. Determining the Stability of Clove Oil (Eugenol) For Use as an Acaricide in Beeswax. *Isr. Vet. J.* **2014**, *69* (December), 192–196.
- (61) Rasool, K.; Ahad, I.; Rasool, R. Efficacy of Various Botanicals and Chemicals on Ectoparasitic Mite , *Varroa Destructor* Feeding on European Honey Bee , *Apis Mellifera*. **2017**, *5* (5), 589–595.
- (62) Amrine, J.; Noel, B.; Mallow, H.; Stasny, T.; Skidmore, R. Results of Research : Using Essential Oils for Honey Bee Mite Control. *Retrieved April 1996*, *23* (6), 96–

105.

- (63) Neira, M. *Aceites Esenciales Y Ácidos Orgánicos En El Control de Varroa Destructor Anderson & Trueman*; Quillota, 2003.
- (64) Serra Bonvehí, J.; Ventura Coll, F.; Ruiz Martínez, J. A. Residues of Essential Oils in Honey after Treatments to Control Varroa Destructor. *J. Essent. Oil Res.* **2016**, *28* (1), 22–28.
- (65) Bogdanov, S.; Imdorf, A.; Kilchenmann, V. Residues in Wax and Honey after Apilife VAR® Treatment. *Apidologie* **1998**, *29* (6), 513–524.
- (66) Brondi, S. H. G.; Lanças, F. M. HPLC Determination of Pesticide Residues Widely Employed in Sugar-Cane Cultures in River Water Samples. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2004**, *27* (1), 171–179.
- (67) Viñas, P.; Soler-Romera, M. J.; Hernández-Córdoba, M. Liquid Chromatographic Determination of Phenol, Thymol and Carvacrol in Honey Using Fluorimetric Detection. *Talanta* **2006**, *69* (5), 1063–1067.
- (68) Lee, Y.; Suntivich, J.; May, K. J.; Perry, E. E.; Shao-Horn, Y.; Berry, K. L.; Aftandilian, V. D.; Gilbert, W. W.; Meibohm, E. P. H.; Young, H. S.; et al. Strong Sulfur Binding with Conducting Magné Li-Phase Ti. *J. Appl. Electrochem.* **1994**, *14* (3), 160–164.
- (69) Casella, I. G.; Gatta, M.; Cataldi., T. R. I. Amperometric Determination of Underivatized Amino Acids at a Nickel- Modified Gold Electrode by Anion-Exchange Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, *878* (1), 57–67.
- (70) D'Eramo, F.; Sereno, L. E.; Arévalo, A. H. Electrocatalytic Properties of a Novel Poly-1-Naphthylamine-Modified Electrode Using Ascorbic Acid as Molecule Probe. *Electroanalysis* **2007**, *19* (1), 96–102.
- (71) Pissinis, D. E.; Marioli, J. M. Electrochemical Detection of 2,6-Diisopropylphenol (Propofol) in Reversed Phase HPLC at High pH. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2007**, *30* (12), 1787–1795.
- (72) Costa, D. C.; Costa, H. S.; Albuquerque, T. G.; Ramos, F.; Castilho, M. C.; Sanches-Silva, A. Advances in Phenolic Compounds Analysis of Aromatic Plants and Their Potential Applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *45* (2), 336–354.
- (73) Escarpa, A.; González, M. C. Approach to the Content of Total Extractable Phenolic Compounds from Different Food Samples by Comparison of Chromatographic and Spectrophotometric Methods. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *427* (1), 119–127.
- (74) Safaei-Ghomi, J.; Ebrahimabadi, A. H.; Djafari-Bidgoli, Z.; Batooli, H. GC/MS Analysis and in Vitro Antioxidant Activity of Essential Oil and Methanol Extracts of Thymus Caramanicus Jalas and Its Main Constituent Carvacrol. *Food Chem.* **2009**, *115* (4), 1524–1528.
- (75) Chizzola, R.; Michitsch, H.; Franz, C. Antioxidative Properties of Thymus Vulgaris Leaves : Chemotypes. *J. Agric. Food Chem* **2008**, *56* (16), 6897–6904.
- (76) Mechergui, K.; Coelho, J. A.; Serra, M. C.; Lamine, S. B.; Boukhchina, S.; Khouja, M. L. Essential Oils of Origanum Vulgare L. Subsp. Glandulosum (Desf.) Ietswaart from Tunisia: Chemical Composition and Antioxidant Activity. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90* (10), 1745–1749.

- (77) Raaman, N. *Phytochemical Techniques*; New India Publishing, Ed.; 2006.
- (78) Sánchez, M. F. . *Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas Y Perfumes*; Ediciones., A., Ed.; 2006.
- (79) Torres, P. Respuesta de La Hierba Buena (*Mentha Piperita* L.) a Dos Distancias de Siembra Y a La Aplicación Edáfica de Dos Abonos Orgánicos Más Compuestos Minerales a Tres Dosis, Universidad Central del Ecuador, 2013.
- (80) Galindo, A. . *Análisis Fitoquímico Preliminar.*; Bogota, 1988.
- (81) ROBINSON, T. *The Biochemistry of Alkaloids*, vol 3.; Media., S. S. & B., Ed.; 2012.
- (82) Anderson, L., N. Doggett, and M. R. The Non-specificity of Dragendorff's Reagent in Thin Layer Chromatography. *Planta Med.* **1977**, 32 (6), 125–129.
- (83) Wall, B. M. E.; Krider, M. M.; Krewson, C. F.; Eddy, C. R. Steroidal Sapogenins VII. Survey of Plants for Steroidal Sapogenins and Other Constituents. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1954**, 43 (1), 1–7.
- (84) Medina, J. E. Phytochemical Screening of Argentine Plants with Potential Pharmacological Activity (Part VII) 1. *Planta Med.* **1977**, 2 (31), 136–140.
- (85) Domínguez, X.A. Balick, M. J., Cicció, J. F., Joel, D. M., Marbach, I., Mayer, A. M., & Hilton, J. J. Métodos de Investigación Fitoquímica, Centro Regional de Ayuda Técnica, 1973.
- (86) Simonyan, A. V., Shinkarenko, A. L., Aganesyan, É. T., & Frolova, V. I. Use of the Cyanidin Reaction in Flavonoid Analysis. *Pharm. Chem. J.* **1973**, 7 (2), 126–128.
- (87) Bryant, E. . A Note on the Differentiation between Flavonoid Glycosides and Their Aglucones. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1950**, 8 (39), 480–480.
- (88) Domingo, D., & López-Brea, M. Plantas Con Acción Antimicrobiana. *Rev Esp Quimioter.* **2014**, 16 (4), 385–393.
- (89) Activity, A.; Nitrogen, D. C. Synthesis, Antitumor Activity and Docking of 2,3-(Substituted)-1,4-Naphthoquinone Derivatives Containing Nitrogen, Oxygen and Sulfur. **2015**, 26 (9), 1804–1816.
- (90) Abe, H.; Sakaguchi, M.; Konishi, H.; Tani, T.; Arichi, S. The Effects of Saikosaponins on Biological Membranes. *J. Med. Plant Res.* **1978**, 34, 160–166.
- (91) Wall, M. E.; Taylor, H.; Ambrosio, L.; Davis, K. Plant Antitumor Agents III: A Convenient Separation of Tannins from Other Plant Constituents. *J. Pharm. Sci.* **1969**, 58 (7), 839–841.
- (92) Da Cruz, R. C.; Denardi, L. B.; Mossmann, N. J.; Piana, M.; Alves, S. H.; De Campos, M. M. A. Antimicrobial Activity and Chromatographic Analysis of Extracts from *Tropaeolum Pentaphyllum* Lam. Tubers. *Molecules* **2016**, 21 (5), 1–11.
- (93) Remington, A. *Farmacía de Remington*; Editorial Panamericana, M., Ed.; Buenos Aires, Argentina, 2003.
- (94) Kenneth A. Rubinson, J. F. . *Análisis Instrumental*, 5th ed.; Hall, P., Ed.; 2004.
- (95) Kimbrough, D.K., M.; Reynolds, R.; O'Dell, C.; Wigman, L.; Kelsch, C. Four

- Exciting Chromatography Activities. *J. Chem. Educ.* **1992**, No. 69, 987 – 992.
- (96) Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *J. Org. Chem.* **1978**, 43 (14), 2923–2925.
- (97) Flores, D. M. L. *Complemento Teórico Cromatografías Especiales*; Comodoro Rivadavia, Chubt. Argentina, 2010.
- (98) Hore, P. . *Resonancia Magnética Nuclear*, 1° Edición.; Eudeba, Ed.; Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2000.
- (99) Chang, R. *Electroquímica*, 9th ed.; Collage, W., Ed.; 2007.
- (100) Bard, A. J. *Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications*, 2da ed.; John Wiley and Sons. INC, Ed.; New York, 2001.
- (101) Osteryoung, J., O’Dea, J. . Square Wave Voltammetry. In *Electroanalytical chemistry*. Bard, A.J; Dekker, M., Ed.; New York, USA, 1987; p 1100.
- (102) Brereton, J. W. B. *Chemometrics: Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory System.*, 2da ed.; 2005.
- (103) Lavine, B. K.; Workman, J. Chemometrics. *Anal. Chem.* **2012**, 80 (12), 4519–4531.
- (104) Einax, J. W. Steven D. Brown, Romà Tauler, Beata Walczak (Eds.): Comprehensive Chemometrics. Chemical and Biochemical Data Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 396 (2), 551–552.
- (105) Müller, B.; Reinhardt, J.; Strickland, M. T. *Neural Networks: An Introduction.*, vol 1.; Media:, S. & B., Ed.; 1995.
- (106) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Why Gold Nanoparticles Are More Precious than Pretty Gold: Noble Metal Surface Plasmon Resonance and Its Enhancement of the Radiative and Nonradiative Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35 (3), 209–217.
- (107) Roduner, E. Size Matters: Why Nanomaterials Are Different. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35 (7), 583.
- (108) Klabunde, K. J.; Li, Y. X.; Tan, B. J. Solvated Metal Atom Dispersed Catalysts. *Chem. Mater.* **1991**, 3 (1), 30–39.
- (109) Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X. Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (45), 13939–13948.
- (110) Shiraishi, Y.; Arakawa, D.; Toshima, N. pH-Dependent Color Change of Colloidal Dispersions of Gold Nanoclusters: Effect of Stabilizer. *Eur. Phys. J. E* **2002**, 8 (4), 377–383.
- (111) Haruta, M.; Daté, M. Advances in the Catalysis of Au Nanoparticles. *Appl. Catal. A Gen.* **2001**, 222 (1–2), 427–437.
- (112) Scampicchio, M.; Wang, J.; Blasco, A. J.; Arribas, A. S.; Mannino, S.; Escarpa, A. Nanoparticle-Based Assays of Antioxidant Activity. *Anal. Chem.* **2006**, 78 (6), 2060–2063.
- (113) Bulughapitiya, V. P. *Plants Based Natural Products Extraction , Isolation and Phytochemical Screening*; 2018.

- (114) Sarker, S.L., Z.; Gray, A. *Natural Products Isolation. Methods in Biotechnology*; New Jersey, United State., 2006.
- (115) González, M. J.; Beoletto, V. G.; Agnese, A. M.; Audisio, M. C.; Marioli, J. M. Purification of Substances from *Achyrocline Satureioides* with Inhibitory Activity Against *Paenibacillus* Larvae, the Causal Agent of American Foulbrood in Honeybees' Larvae. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *175* (7), 3349–3359.
- (116) Furniss, B. . *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry.*, 5th ed.; Education, P., Ed.; India., 1989.
- (117) Cezarotto, V. S.; Giacomelli, S. R.; Flores, É. M. D. M.; Mack, J. M. Seasonal Variation , Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Achyrocline Satureoides* (Lam .) D . C . **2011**, *30* (8), 1536–1541.
- (118) Casero, C.; Machín, F.; Méndez-Álvarez, S.; Demo, M.; Ravelo, Á. G.; Pérez-Hernández, N.; Joseph-Nathan, P.; Estévez-Braun, A. Structure and Antimicrobial Activity of Phloroglucinol Derivatives from *Achyrocline Satureioides*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (1), 93–102.
- (119) Rodríguez-Ramos, F.; Navarrete, A. Solving the Confusion of Gnaphaliin Structure: Gnaphaliin A and Gnaphaliin B Identified as Active Principles of *Gnaphalium Liebmannii* with Tracheal Smooth Muscle Relaxant Properties. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72* (6), 1061–1064.
- (120) Imdorf, A.; Bogdanov, S.; Ochoa, R. I.; Calderone, N. W. Use of Essential Oils for the Control of *Varroa Jacobsoni* Oud. in Honey Bee Colonies. *Apidologie* **1999**, *30* (2–3), 209–228.
- (121) Gao, H., Cao, W., Liang, Y., Cheng, N., Wang, B. N., & Zheng, J. B. Determination of Thymol and Phenol in Honey by LC with Electrochemical Detection. *Chromatographia* **2010**, *72* (3–4), 361–363.
- (122) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *ELECTROCHEMICAL METHODS. Fundamentals and Applications*, Second Edi.; John Wiley & Sons, I., Ed.; 2001.
- (123) Enache, T. A.; Oliveira-Brett, A. M. Phenol and Para-Substituted Phenols Electrochemical Oxidation Pathways. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *655* (1), 9–16.
- (124) Gil, E. S.; Couto, R. O. Flavonoid Electrochemistry: A Review on the Electroanalytical Applications. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2013**, *23* (3), 542–558.
- (125) Reiner, G. N.; Labuckas, D. O.; García, D. A. Lipophilicity of Some GABAergic Phenols and Related Compounds Determined by HPLC and Partition Coefficients in Different Systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49* (3), 686–691.
- (126) Nicholson, R. S. Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics. *Anal. Chem.* **1965**, *37* (11), 1351–1355.
- (127) Zapata-Urzúa, C.; Pérez-Ortiz, M.; Bravo, M.; Olivieri, A. C.; Álvarez-Lueje, A. Simultaneous Voltammetric Determination of Levodopa, Carbidopa and Benserazide in Pharmaceuticals Using Multivariate Calibration. *Talanta* **2010**, *82* (3), 962–968.
- (128) Olivieri, A. C.; Goicoechea, H. C.; Iñón, F. A. MVC1: An Integrated MatLab Toolbox for First-Order Multivariate Calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2004**, *73* (2), 189–197.

- (129) Tesio, A. Y.; Robledo, S. N.; Granero, A. M.; Fernández, H.; Zon, M. A. Simultaneous Electroanalytical Determination of Luteolin and Rutin Using Artificial Neural Networks. *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, *203*, 655–662.
- (130) Goicoechea, H. C., & Olivieri, A. C. *La Calibración En Química Analítica.*, Ediciones.; Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, 2007.
- (131) Riu, J.; Rius, F. X. Assessing the Accuracy of Analytical Methods Using Linear Regression with Errors in Both Axes. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (11), 1851–1857.
- (132) Memar, M. Y.; Raei, P.; Alizadeh, N.; Aghdam, M. A.; Kafil, H. S. Carvacrol and Thymol: Strong Antimicrobial Agents against Resistant Isolates. *Rev. Med. Microbiol.* **2017**, *28* (2), 63–68.
- (133) Daferera, D. J.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. G. Characterization of Essential Oils from Lamiaceae Species by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (20), 5503–5507.
- (134) Nabavi, S. M.; Marchese, A.; Izadi, M.; Curti, V.; Daglia, M.; Nabavi, S. F. Plants Belonging to the Genus *Thymus* as Antibacterial Agents: From Farm to Pharmacy. *Food Chem.* **2015**, *173*, 339–347.
- (135) Friedman, M. Chemistry and Multibeneficial Bioactivities of Carvacrol (4-Isopropyl-2-Methylphenol), a Component of Essential Oils Produced by Aromatic Plants and Spices. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (31), 7652–7670.
- (136) Guarda, A.; Rubilar, J. F.; Miltz, J.; Galotto, M. J. The Antimicrobial Activity of Microencapsulated Thymol and Carvacrol. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *146* (2), 144–150.
- (137) Bassolé, I. H. N.; Juliani, H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules* **2012**, *17* (4), 3989–4006.
- (138) Torras, J., Grau, M. D., López, J. F., & de las Heras, F. X. C. Analysis of Essential Oils from Chemotypes of *Thymus Vulgaris* in Catalonia. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *12* (87), 2327–2333.
- (139) Dima, C.; Dima, S. Essential Oils in Foods: Extraction, Stabilization, and Toxicity. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *5*, 29–35.
- (140) Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A. Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles. *Science* (80-.). **1997**, *277* (5329), 1078–1081.
- (141) Tonello, N.; Moressi, M. B.; Robledo, S. N.; D'Eramo, F.; Marioli, J. M. Square Wave Voltammetry with Multivariate Calibration Tools for Determination of Eugenol, Carvacrol and Thymol in Honey. *Talanta* **2016**, *158*, 306–314.
- (142) Tonello, N. V.; D'Eramo, F.; Marioli, J. M.; Crevillen, A. G.; Escarpa, A. Extraction-Free Colorimetric Determination of Thymol and Carvacrol Isomers in Essential Oils by pH-Dependent Formation of Gold Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2018**, *185* (7), 2–9.

