



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS
FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

DOCTORADO EN FARMACIA

TESIS DOCTORAL

Extractos de plantas medicinales de la región de
Cuyo como ingredientes activos
en formulaciones tópicas

AUTORA: MAGDALENA BELÉN ESPINO

DIRECTORA: DRA. MARÍA FERNANDA SILVA
CO-DIRECTORA: DRA. MARÍA ROXANA GÓMEZ

SAN LUIS- 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS
FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA
DOCTORADO EN FARMACIA

TRABAJO FINAL
TESIS DOCTORAL

Extractos de plantas medicinales de la región de Cuyo como
ingredientes activos en formulaciones tópicas

Autora
Farm. Magdalena Belén Espino

Directora
Dra. María Fernanda Silva

Co-Directora
Dra. María Roxana Gómez

SAN LUIS- 2019

El presente manuscrito de tesis se presenta para optar al Título de Doctora en Farmacia de la Carrera de Doctorado en Farmacia de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis.

El mismo se realizó gracias a una beca concedida por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Agradezco también a los diferentes subsidios de investigación otorgados por la Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, que permitieron financiar mi doctorado.

El comité tutorial estuvo integrado por la Dra. Soledad Cerutti, la Dra. Elisa Petenatti y el Dr. Álvaro Jimenez Kairuz, a quienes agradezco por su tiempo y por los aportes realizados.

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM-CONICET), por lo que agradezco profundamente tanto a las autoridades como a todos los integrantes del mismo por haberme acompañado en la realización de esta tesis y por colaborar en mi formación doctoral.

EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES DE LA REGIÓN DE CUYO COMO INGREDIENTES ACTIVOS EN FORMULACIONES TÓPICAS

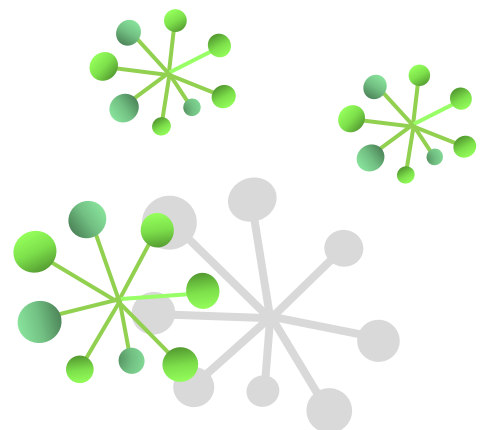


FARM. MAGDALENA BELÉN ESPINO

DIRECTORA: DRA. MARÍA FERNANDA SILVA

CO-DIRECTORA: DRA. MARÍA ROXANA GÓMEZ

“Empieza por hacer lo necesario,
luego haz lo posible
y de pronto,
te encontrarás haciendo lo imposible”
San Francisco de Asís

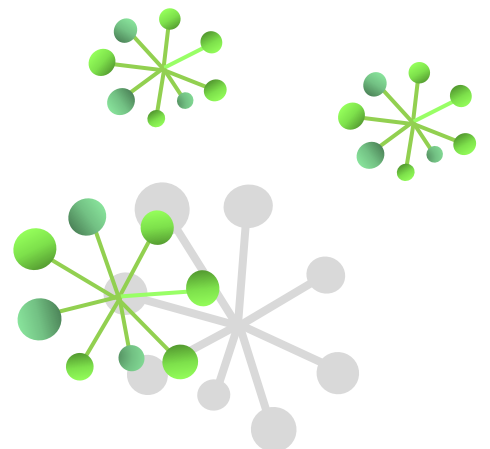


A mi papá Rubén y a mi mamá Cecilia,

que con su ejemplo,
me enseñan a amar la vida

A mi abuelita Adela,

de quién aprendí
“que la vida transcurre, eso no depende de ti,
como quieres que transcurra, eso solamente,
depende de ti”



“Las palabras no alcanzan cuando hay tanta vida compartida”

Esta quizás sea la parte más bonita de este trabajo, porque nada de esto sería posible sin todas las personas que desde su lugar me brindaron lo mas valioso, su tiempo y me ayudaron a crecer. Desde el corazón agradezco este hermoso regalo.

A mi directora Fer, por ayudarme a crecer tanto profesional como personalmente; por transmitirme su pasión por investigar y por la química verde; por motivarme a trabajar siempre en lo que me gusta, en eso que enciende el corazón; por enseñarme que todo es más bonito y enriquecedor si se trabaja en equipo y que todo es posible si uno se lo propone.

A mi codirectora Ro, por su predisposición para que podamos llevar este trabajo adelante; y en especial, por ser la primera que confió en mí y que me ayudó a ver mi profesión desde otro lugar. Estaré siempre muy agradecida por abrirme esta puerta enorme.

A todos los integrantes del IBAM, y en especial a Coti, Estefi, Clau, Lu, Mica, Lau, Isma, Mari, Joa, Fede, Ingrid, Mimi, Adri, Tincho, Caro G., Ale, Flor, Emi, Ceci, Gaby, Lean, Caro S., Romi, Migue, Cari, Ana y Cin, me siento tan afortunada de haber sido parte de este hermoso grupo, porque hacen que el lugar de trabajo sea cómodo y alegre. Me sentí siempre acompañada, gracias por el tiempo para escuchar, por los consejos y por dar esas fuerzas para que todo salga bonito.

Al Grupo de Química Analítica Verde, a Caro, Romi, Isma por su compañía y predisposición para ayudarme siempre. A Mari, Joa y Fede, por ser compañeros de aventuras en este mundo de la investigación, siempre en búsqueda de nuevos proyectos, por compartir la pasión por la química sustentable, y en especial por acompañarme en cada paso, por ocuparse para que todo se pueda resolver y por estar atentos a mí en todo momento. Este trabajo lleva el aporte de cada uno de ustedes!

A Mari cualquier gracias me queda pequeño, su compañía incondicional ha sido un gran motor para mí en esta tesis, de ella aprendí a que cuando los planes no salen, siempre hay un camino mas enriquecedor esperando, gracias por no dejarme bajar los brazos.

A la hermosa gente que me recibe y me ayuda siempre en San Luis, Leslie, Elbio, Ana, Julie y Silvia; y en especial a Manu, por su entusiasmo, por su gran predisposición para colaborar en esta tesis y por ocuparse para que todo salga bonito.

A Coti por enseñarme a buscar nuevos desafíos y a emprender cosas nuevas, y en especial por su cariño, por acompañarme en cada paso de esta tesis, por estar siempre presente, atenta y escuchándome.

A Ingrid, por su enorme paciencia, por ocuparse para resolver las cosas sin generar preocupaciones, siempre dispuesta a colaborar, y especialmente por su compañía incondicional.

A Romi por recibirme en cada viaje a San Luis, por compartir la profesión a nuestra manera, siempre en viaje, siempre en aventura, gracias por estar siempre presente.

A mi mamá y a mi papá, quienes ponen amor y dedicación en cada actividad, trabajo o emprendimiento; por darme la posibilidad a mi de trabajar de lo que me gusta, por su sostén y compañía.

A mi familia, tíos y primos, en especial a Euge y Vale, por su compañía. A Lauti, Teo y Gena, por su amor, por ser lucecitas en mi vida que me enseñan a ser simples y alegres.

A mis hermanos de la vida por acompañarme desde la fé y el amor estos cinco años; por recordarme y ayudarme a redescubrir día a día la esencia de la vida. Gracias por tanta luz!

A Pau, mi hermana de la vida, que desde pequeñas con su ejemplo me enseña a ser curiosa, a buscar, a aprender y a superarme día a día.

A Agus, por estar presente en cada detalle, por su compañía y por ayudarme a ver desde la simpleza del corazón.

A Perla, quién me acompaña desde pequeña en cada etapa, en cada desafío, siempre brindándome cariño y confianza.

Resumen

Las plantas son reconocidas por sus propiedades medicinales, atribuidas a sus compuestos bioactivos del metabolismo secundario. Las metodologías tradicionales de extracción presentan serias desventajas ya que emplean grandes volúmenes de solventes orgánicos con un alto costo energético. Se propuso desarrollar un procedimiento de extracción sustentable para la obtención de bioextractos a partir de matrices vegetales, con el fin de ser incorporados como ingredientes activos en formulaciones tópicas.

En primer lugar, se optimizó la preparación de un solvente eutéctico natural (NADES). Se realizaron estudios de RMN y modelado molecular con el fin de caracterizar estructuralmente estos solventes de diseño y confirmar la presencia de interacciones intermoleculares entre sus componentes. Los resultados indicaron que la combinación ácido láctico-glucosa-agua (LGH) presenta características adecuadas como medio de extracción y estabilización. Luego, se diseñó una metodología de extracción mediada por ultrasonido y NADES, teniendo como objetivos la sustentabilidad y la eficiencia del proceso. La misma se aplicó satisfactoriamente a la obtención de bioextractos de *L. divaricata*, *L. cuneifolia*, *T. vulgaris* y *O. vulgare*. La determinación de compuestos fenólicos y alcaloides, se realizó mediante HPLC-DAD; revelando diferencias cualitativas y cuantitativas entre las especies bajo estudio. LGH presentó eficiencias de extracción satisfactorias comparadas con solventes tradicionales. Los resultados comprobaron la compatibilidad del solvente eutéctico con el sistema de separación y detección. Finalmente, se evaluó la capacidad antifúngica de los bioextractos de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* frente a *Candida albicans*, y se determinó su concentración mínima inhibitoria. Estos bioextractos se incorporaron a formulaciones tópicas, que presentaron satisfactorias características físicas y organolépticas. Al evaluar la actividad antimicrobiana de las mismas; la crema preparada a partir de la combinación de ambos bioextractos mostró la mayor actividad revelando un efecto sinérgico entre las especies. Los aportes de esta tesis contribuyen al desarrollo de procedimientos sustentables y de aplicaciones novedosas para fitomedicina.

Abstract

As old as humankind, plants have been used in folk medicine since they are a rich source of natural bioactive compounds. Traditionally, extractions techniques for plant biocompounds present some drawbacks such as long extraction periods, high solvent and energy consumption that makes them harmful from an environmental perspective. In this context, a sustainable methodology was developed for biocompounds extraction from medicinal plants. Furthermore, the bioextracts were incorporated as active ingredients in topical formulations.

With the aim to replace hazardous reagents, a natural deep eutectic solvent (NADES) was prepared. The spatial proximity and the intermolecular interactions between NADES components were confirmed by nuclear magnetic resonance and theoretical studies. The mixture composed by lactic acid: glucose: water (LGH) demonstrated satisfactory features as extraction media. Thus, a sustainable LGH based-ultrasound mediated extraction of bioactive compounds from *L. divaricata*, *L. cuneifolia*, *T. vulgaris* y *O. vulgare* was developed. Furthermore, in order to determine phenolics and alkaloids in these bioextracts, HPLC-DAD procedures were developed and satisfactory applied. The extraction efficiency of the eutectic solvent was compared with traditional solvents, showing LGH outstanding extractability for both polar and weak polar compounds. Also, the results demonstrated the chromatographic compatibility of LGH. Finally, the antifungal activity of *L. divaricata* y *L. cuneifolia* was evaluated against *Candida albicans*, and the minimum inhibitory concentration was determined. The bioextracts were incorporated as active ingredients in topical formulations and the evaluation of organoleptic and physical characters were satisfactory. Notably, the mixture of *L. cuneifolia* and *L. divaricata* bioextracts in topical formulations reveal a synergistic antifungal effect highlighting their potential for candidiasis treatment.

The results of the present work contribute with the development of sustainable processes as well as encouraged the generation of novel phytoformulations.

El desarrollo del presente trabajo de tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

“Natural Designer Solvents for Greening Analytical Chemistry” **Espino, Magdalena**; Fernández, María de los Ángeles; Gómez, Federico; Silva, María Fernanda. TRAC-Trends in Analytical Chemistry 76 (126-136) 2016.

“Enhanced electrochemical detection of quercetin by natural deep eutectic solvents” Gómez, Federico J; **Espino, Magdalena**; Fernández, María de los Ángeles; Raba Julio; Silva, María Fernanda. Analytica Chimica Acta 936 (91-96) 2016.

“Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products” Fernández, María de los Ángeles; **Espino, Magdalena**; Gómez, Federico J.V.; Silva, María Fernanda. Food Chemistry 239 (671-678) 2018.

“Green analytical chemistry metrics: Towards a sustainable phenolics extraction from medicinal plants” **Espino, Magdalena**; Fernández, María de los Ángeles; Gómez, Federico J.V., Boiteux, Joana, Silva, María Fernanda. Microchemical Journal 141 (438–443) 2018.

“A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents” Gómez, Federico J; **Espino, Magdalena**; Fernández, María de los Ángeles; Silva, María Fernanda. Chemistry Select 3 -22 (6122-6125) 2018.

“Larrea divaricata volatilome and antimicrobial activity against Monilinia fructicola” Boiteux, Joana; Monardez, Carolina; Fernández, María de los Ángeles; **Espino, Magdalena**; Pizzuolo, Pablo; Silva, María Fernanda. Microchemical Journal 142 (1–8) 2018.

“Structural analysis of natural deep eutectic solvents: Theoretical and experimental study” Pisano, Pablo L.; **Espino, Magdalena**; Fernández, María de los Ángeles; Silva, María F.; Olivieri, Alejandro C. Microchemical Journal 143 (252–258) 2018.

“Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments” Fernández, María de los Ángeles; Boiteux, Joana; **Espino, Magdalena**; Gómez, Federico J.V.; Silva, María Fernanda. Analytica Chimica Acta 1-10 2018.

"Nades-mediated folk plant extracts as novel antifungal agents against *Candida albicans*" **Espino, Magdalena**; Solari, Manuel; Fernández, María de los Ángeles; Boiteux, Joana; Gómez, María Roxana; Silva, María Fernanda. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 167 (15-20) 2019.

"DES-mediated approaches towards Green Analytical Chemistry" Gómez, Federico J.V.; **Espino, Magdalena**; Fernández, María de los Ángeles; Boiteux, Joana; Silva, María Fernanda. En "Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications" Wiley-VCH book – Editores: Profs .Diego J. Ramón y Gabriela Guillena.

Asimismo, los resultados de la investigación realizada han sido presentados en congresos nacionales e internacionales:

"Phenolic Composition of folk medicinal plants with dermatological relevance by core-shell reversed-phase liquid chromatography with multiple wavelength detection" **Espino, Magdalena**; Monasterio, Romina; Gómez, María Roxana; Silva, María Fernanda. 21st International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques and 20th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology (ITP & LACE 2014).

"Grandes desafíos de la Química Analítica Verde: Solventes naturales para procesos de extracción" Fernández, María de los Ángeles; **Espino, Magdalena**; Soto Carolina; Silva María Fernanda 8° Congreso Argentino de Química Analítica 3 al 6 de noviembre de 2015. La Plata, Buenos Aires. Argentina.

"Determinación de compuestos fenólicos en plantas medicinales de la región de Cuyo" **Espino, Magdalena**; Fernández, María de los Ángeles; Boiteux, Joana; Gómez, Roxana; Silva, María Fernanda. 8 Congreso Argentino de Química Analítica 3 al 6 de noviembre de 2015. La Plata, Buenos Aires. Argentina.

"Solventes sustentables para la puesta en valor de plantas nativas de Argentina" **Espino, Magdalena**; Fernández, María de los Ángeles; Gómez, Federico; Silva, María Fernanda. V

Encuentro Trinacional de Investigación (UNCuyo- Universidad de Talca- Unicamp) 21 y 22 de noviembre de 2016. Universidad Estatal de Campinas, Sao Pablo, Brasil- Comunicación Oral.

“Análisis estructural de solventes eutécticos naturales mediante un estudio teórico y experimental” Pisano, Pablo; **Espino, Magdalena**; Fernández, María de los Ángeles; Silva, María Fernanda; Olivieri, Alejandro. 9° Congreso Argentino de Química Analítica, 7 al 10 de noviembre de 2017. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

“Análisis de compuestos volátiles de jarilla y su actividad antimicrobiana frente a Monilinia spp.” Boiteux, Joana; Monardez, Carolina; Fernández, María de los Ángeles; **Espino, Magdalena**; Pizzuolo, Pablo; Lucero, Gabriela; Silva, María Fernanda 9° Congreso Argentino de Química Analítica, 7 al 10 de noviembre de 2017. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

“Solventes eutécticos naturales para la revalorización de subproductos vitivinícolas” Fernández, María de los Ángeles; **Espino, Magdalena**; Mauri, Virginia; Silva, María Fernanda 9° Congreso Argentino de Química Analítica, 7 al 10 de noviembre de 2017. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

“Aplicación de la eco-escala analítica en un proceso de extracción mediado por NADES” **Espino, Magdalena**; Fernández, María de los Ángeles; Gómez, Federico; Silva, María Fernanda 9° Congreso Argentino de Química Analítica, 7 al 10 de noviembre de 2017. Río Cuarto, Córdoba, Argentina- Comunicación Oral.

“Antimicrobial activity of Larrea divaricata alkaloids against olive tree pathogens” Boiteux, Joana; Monardez, María de los Ángeles; **Espino, Magdalena**; Lucero, Gabriela; Silva, María Fernanda. 23rd LACE, 2 al 5 de diciembre 2017. México, México.

“Analytical eco scale in the extraction of phenolic compounds mediated by natural solvents” **Espino, Magdalena**; Fernández, María de los Ángeles; Gómez, Federico; Silva, María Fernanda. 23rd LACE, 2 al 5 de diciembre 2017. México, México.

“Formulaciones tópicas antifúngicas a partir de bioextractos de jarilla” **Espino, Magdalena**; Solari, Manuel, Fernández, María de los Ángeles; Boiteux, Joana; Gómez, María Roxana; Silva, María Fernanda. 5° Reunión Internacional del Ciencias Farmacéuticas (RICiFa) -50° Reunión

Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE), 14 al 16 de noviembre 2018. Ciudad de La Punta, San Luis, Argentina.

Prólogo

La medicina convencional se enfrenta a grandes desafíos debido a numerosos aspectos entre los que se destacan el aumento de cepas resistentes, los efectos adversos de los fármacos y las recaídas en los tratamientos. En este contexto, la mirada vuelve nuevamente a las plantas, donde tuvieron origen los primeros fármacos de síntesis.

La fitomedicina es una alternativa a la medicina convencional. En este sentido, una formulación fitoterápica, para ser segura y eficaz, debe ser formulada e indicada por profesionales tal como los fármacos de síntesis.

Sin embargo, por su origen natural, el uso de formulaciones con extractos de plantas es considerado inocuo y administrado en muchos casos sin recomendaciones médicas o farmacéuticas. Esto ha llevado a errores tanto de toxicidad como de ineffectividad en los tratamientos. Asimismo, la elaboración debe realizarse por personal capacitado para evitar errores de identificación de especies así como también problemas de contaminación del material vegetal con pesticidas, medicamentos, metales, entre otros.

En este sentido, surge la necesidad de profundizar en el estudio del material vegetal, mediante la determinación de sus metabolitos bioactivos, su caracterización y estandarización. Considerando los objetivos de la Química Analítica Contemporánea, el desafío de mayor trascendencia es alinear los procedimientos con los principios de la Química Verde de modo de resolver un problema con el máximo nivel de confiabilidad, generando el mínimo impacto tanto medio ambiental como para el operario.

Esto permite aprovechar el potencial que nos ofrece la naturaleza, brindando bases científicas para una fitoterapia segura y eficaz.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1 Plantas Medicinales.....	1
1.1.1 Compuestos Bioactivos	2
1.1.1.1 Compuestos fenólicos.....	3
1.1.1.2 Alcaloides.....	5
1.1.1.3 Compuestos Volátiles	6
1.1.2 Propiedades antimicrobianas de extractos de plantas medicinales	7
1.1.2.1 Extractos de plantas medicinales para el control de <i>Candida albicans</i>	8
1.2 Química Analítica Verde	9
1.2.1 Métricas de Sustentabilidad	11
1.2.2 Metodologías de extracción convencionales vs no convencionales	16
1.2.2.1 Solventes Verdes.....	20
1.2.2.1.1 Líquidos Iónicos.....	20
1.2.2.1.2 Solventes Eutécticos	20
1.2.2.1.3 Solventes Eutécticos Naturales	21
1.2.2.1.3.1 Composición y preparación de NADES.....	22
1.2.2.1.3.2 Estructura supramolecular y efecto de la dilución	23
1.2.2.1.3.3 Propiedades físicas y toxicidad	24
1.2.2.1.3.4 Principales aplicaciones de los NADES	26
1.3 Objetivos	30
1.3.1 Objetivo General	30
1.3.1.1 Objetivos Específicos	30
1.4 Configuración instrumental	31
1.5 Bibliografía.....	32

CAPÍTULO 2 SOLVENTES EUTÉCTICOS NATURALES

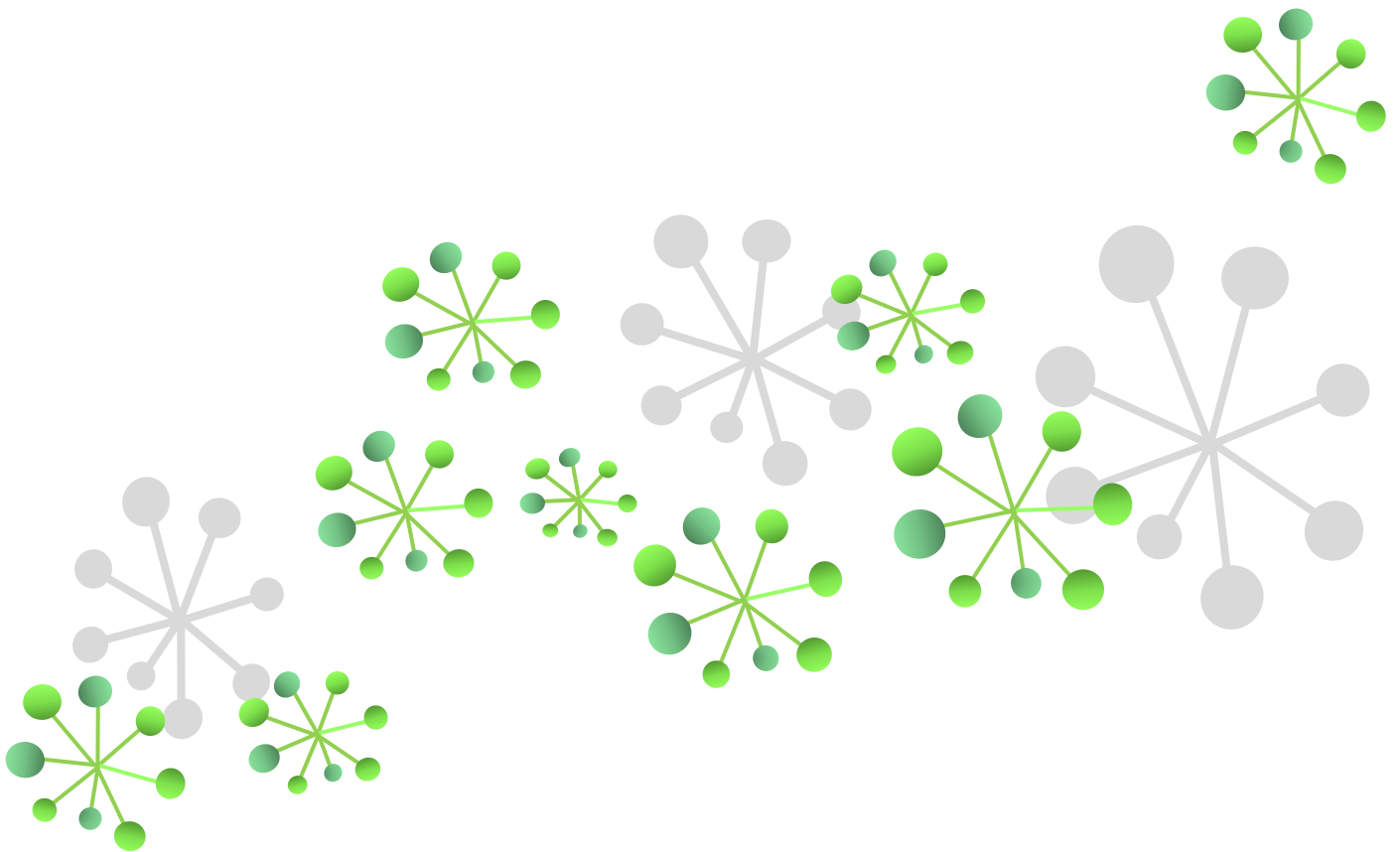
2.1 Introducción	41
2.2 Materiales y métodos.....	42
2.2.1 Reactivos y soluciones.....	42
2.2.2 Optimización de la preparación de NADES	43
2.2.2.1 Diseño Experimental y Análisis Estadístico	44
2.2.3 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).....	44
2.2.3.1 Efecto Nuclear de Overhauser (NOE)	44
2.2.3.2 Métodos computacionales	45
2.2.4 Monitoreo de la estabilidad por cromatografía líquida de alta performance	46

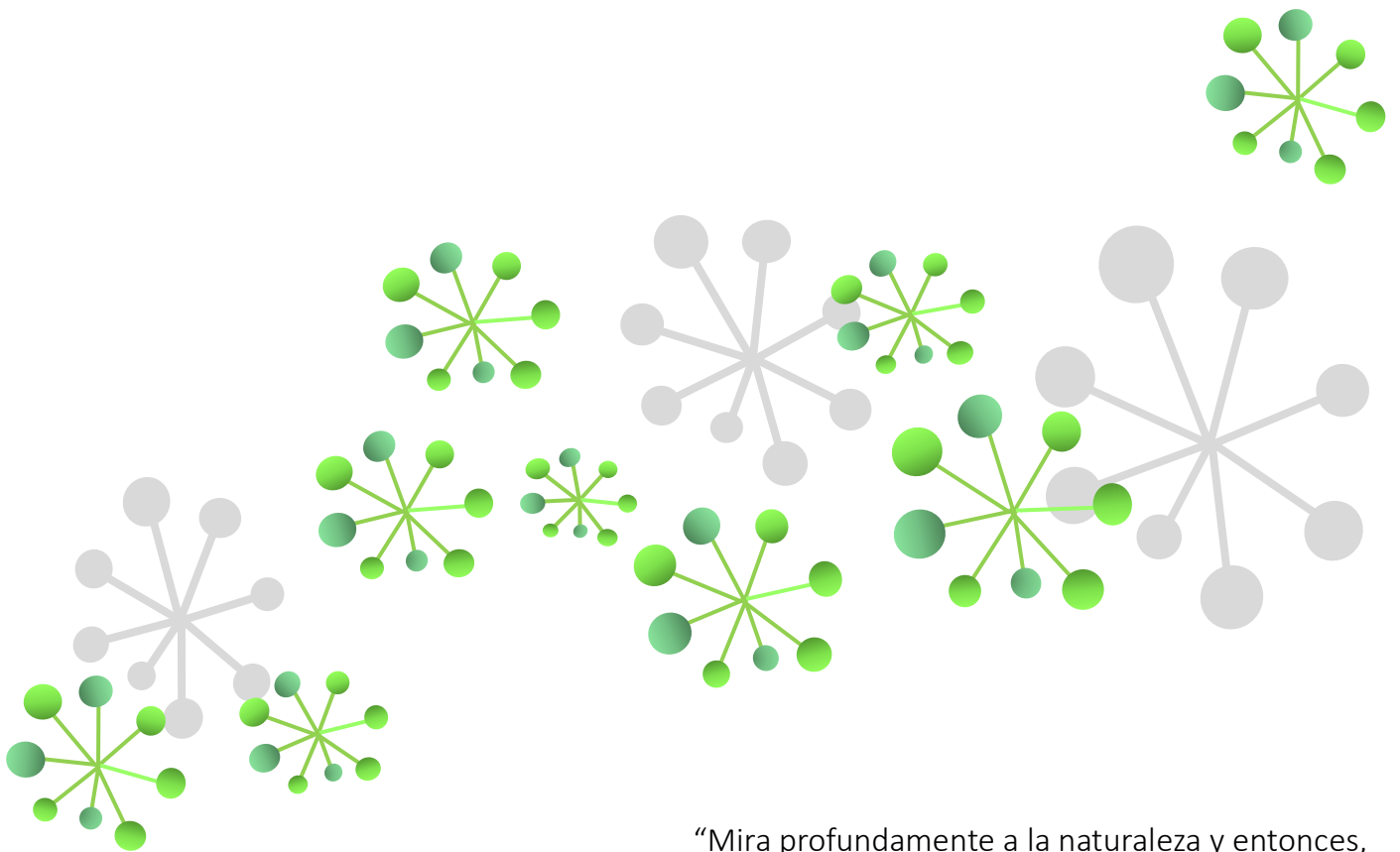
2.3 Resultados y discusión.....	48
2.3.1 Optimización de la preparación de NADES	48
2.3.2 Efecto Nuclear Overhauser	54
2.3.2.1. Efecto de la dilución.....	59
2.3.2.2. Interacción de los NADES con biocompuestos.....	63
2.3.2.3 Estudio teórico	64
2.3.3 Estabilidad de compuestos fenólicos	68
2.4 Conclusiones parciales	73
2.5 Bibliografía.....	73
 CAPÍTULO 3 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS	
3.1 Introducción	77
3.2 Materiales y Métodos	78
3.2.1 Reactivos y equipamiento.....	78
3.2.2 Material Vegetal	79
3.2.3 Obtención de extractos.....	80
3.2.3.1 Métricas Sustentables.....	80
3.2.3.2 Optimización de la extracción	81
3.2.3.2.1 Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	82
3.2.4 Caracterización de los extractos.....	82
3.2.4.1 Compuestos fenólicos totales	82
3.2.4.2 Capacidad antioxidante	83
3.2.4.2.1 DPPH.....	83
3.2.4.2.2 ABTS.....	83
3.2.4.3 Determinación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD	84
3.2.4.4 Determinación de alcaloides por HPLC-DAD	85
3.3 Resultados.....	86
3.3.1 Métricas de Sustentabilidad	86
3.3.2 Optimización de la extracción mediada por LGH-UAE.	89
3.3.3 Caracterización de los extractos.....	93
3.3.3.1 Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.....	93
3.3.3.2 Determinación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD	96
3.3.3.2.1 Parámetros analíticos	100
3.3.3.2.1.1 Efecto matriz.....	100
3.3.3.2.1.2 Figuras de mérito.....	101
3.3.3.2.2 Determinación de fenoles en los bioextractos	104
3.3.3.3 Determinación de alcaloides por HPLC-DAD	106
3.3.3.3.1 Parámetros analíticos	110
3.3.3.3.1.1 Efecto matriz.....	110
3.3.3.3.1.2 Figuras de mérito.....	111

3.3.3.3.2 Determinación de alcaloides en los bioextractos.	112
3.4 Conclusiones parciales	114
3.5 Bibliografía.....	115
 CAPÍTULO 4 CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS Y ELABORACIÓN DE FORMULACIONES TÓPICAS	
4.1 Introducción	121
4.2 Materiales y métodos.....	122
4.2.1 Reactivos y equipamiento.....	122
4.2.2 Microorganismos.....	122
4.2.3 Capacidad antimicrobiana frente a <i>Candida albicans</i>	123
4.2.3.1 Evaluación mediante disco de difusión.....	123
4.2.3.2 Concentración mínima inhibitoria.....	123
4.2.4 Elaboración de formulaciones tópicas	125
4.3 Resultados.....	126
4.3.1 Evaluación de la actividad antifúngica	126
4.3.2 Actividad antimicrobiana de los compuestos individuales	127
4.3.3 Concentración mínima inhibitoria	129
4.3.4 Formulaciones tópicas	131
4.3.4.1 Actividad antimicrobiana de las formulaciones tópicas.....	132
4.4 Conclusiones.....	133
4.5 Bibliografía.....	134
 CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES GENERALES.....	138
ANEXO	139

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN





“Mira profundamente a la naturaleza y entonces,
comprenderás todo mucho mejor”
Albert Einstein

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1 Plantas Medicinales

Desde los comienzos de la humanidad las plantas han sido utilizadas por sus propiedades benéficas para la salud [1]. La medicina tradicional es la base de la medicina convencional, ya que la mayor parte de los principios activos de síntesis han encontrado su origen en compuestos sintetizados por plantas [2, 3]. Existen aproximadamente 400 mil especies de plantas en el mundo, de las cuales un 20 % han sido reportadas por sus propiedades medicinales [4]. Si bien en la actualidad, el uso de formulaciones obtenidas a partir de material vegetal ha aumentado significativamente, el conocimiento de su composición química, seguridad y toxicidad es aún escaso [5].

En Argentina, la variedad de climas y ecosistemas da lugar a una gran diversidad de flora, contando con alrededor de 10 mil especies de plantas de las cuales solo 600 son conocidas por sus propiedades terapéuticas [6, 7]. Entre las especies más reconocidas en la región de Cuyo (Mendoza, San Luis y San Juan) se encuentran las del género *Larrea*. Dentro de este género, la especie más difundida es *L. divaricata*, aunque también se encuentran en estas zonas *L. cuneifolia* y *L. nitida* (Figura 1.1). *Larrea spp* habitan en lugares secos y ventosos, resistiendo una gran amplitud térmica (veranos calurosos e inviernos con heladas frecuentes) [8]. Estas plantas son utilizadas en medicina popular por sus propiedades antirreumáticas, antiinflamatorias y analgésicas, mediante distintas preparaciones tales como infusiones, emplastos o cataplasmas [9].

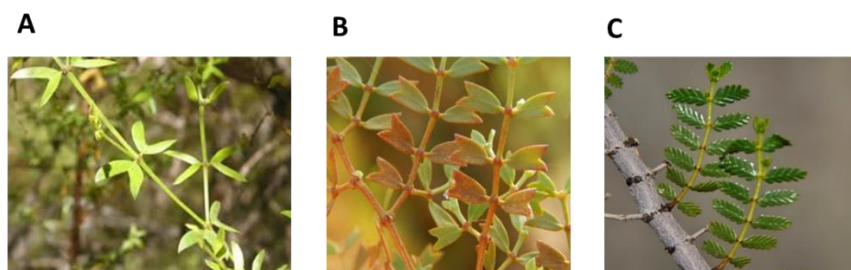


Figura 1.1. Plantas de **A:** *L. divaricata*, **B:** *L. cuneifolia*, **C:** *L. nitida*.

En las últimas décadas, se ha explorado la composición química de algunas especies de *Larrea*, principalmente *L. divaricata* [10-12]. Recientemente, se incluyeron extractos de *Larrea* como ingrediente activo en formulaciones comerciales, generando nuevas perspectivas en el área de la fitomedicina [13].

1.1.1 Compuestos Bioactivos

Las plantas sintetizan una gran diversidad de metabolitos a través de diferentes rutas metabólicas. El metabolismo primario de las plantas comprende los procesos químicos que intervienen en forma directa en su supervivencia, crecimiento y reproducción. Entre los compuestos que participan en estos procesos se encuentran aminoácidos, azúcares y nucleótidos. Por otro lado, las plantas sintetizan otros compuestos que no participan de forma directa en sus procesos vitales. A estos metabolitos se los denomina metabolitos secundarios los cuales, a diferencia de los metabolitos primarios, son moléculas de mayor complejidad tales como compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides [14].

A pesar de que aún existen numerosos metabolitos secundarios de los cuales no se conoce su función, se ha demostrado que algunos poseen función de defensa frente a predadores o en otros casos actúan como agentes de atracción de polinizadores [15]. La síntesis de estos biocompuestos es afectada por diferentes factores tales como estrés, etapas de floración, edad de la planta y tipo de suelo [6]. Muchos de ellos, son producidos y almacenados en tejidos jóvenes, como hojas, flores y semillas [15].

Por lo tanto, los extractos vegetales obtenidos a partir de estos órganos representan una fuente valiosa de metabolitos secundarios con diversas propiedades, entre las que se destacan la actividad antimicrobiana, antioxidante, alelopática y antiinflamatoria [16, 17]. Entre los principales metabolitos secundarios sintetizados por las plantas podemos mencionar a los compuestos polifenólicos, terpenoides y alcaloides [18, 19].

1.1.1.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos fitoquímicos caracterizados por su gran poder antioxidante, actividad antimicrobiana y antiinflamatoria, lo que motiva su estudio en extractos de plantas [20].

Los fenoles están constituidos por un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo. Conforman un grupo muy diverso existiendo aproximadamente 8.000 estructuras fenólicas, las cuales son agrupadas en diferentes clases dependiendo de su esqueleto estructural (Figura 1.2) [21]. Se pueden encontrar desde moléculas sencillas, como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. Los polifenoles más abundantes en las plantas son los ácidos fenólicos y flavonoides [22]. Los ácidos fenólicos se dividen en dos grupos, los derivados del ácido benzoico (ácido gálico, protocatéquico, p- aminobenzoico, vanílico y salicílico) y los derivados del ácido cinámico (p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico) [20]. Los flavonoides poseen un esqueleto básico (C6-C3-C6) constituido por dos anillos aromáticos C6 y un anillo heterocíclico que contiene un átomo de oxígeno. Este grupo a su vez se divide en: flavonas (luteonina, apigenina); flavonoles (quercetina, miricetina); flavanonas (naringenina); flavan-3-ol (catequinas y epicatequinas); isoflavonas (genisteína) y antocianidinas (cianidina, malvidina). Otros grupos de flavonoides son las auronas, taninos condensados y xantonas [22].

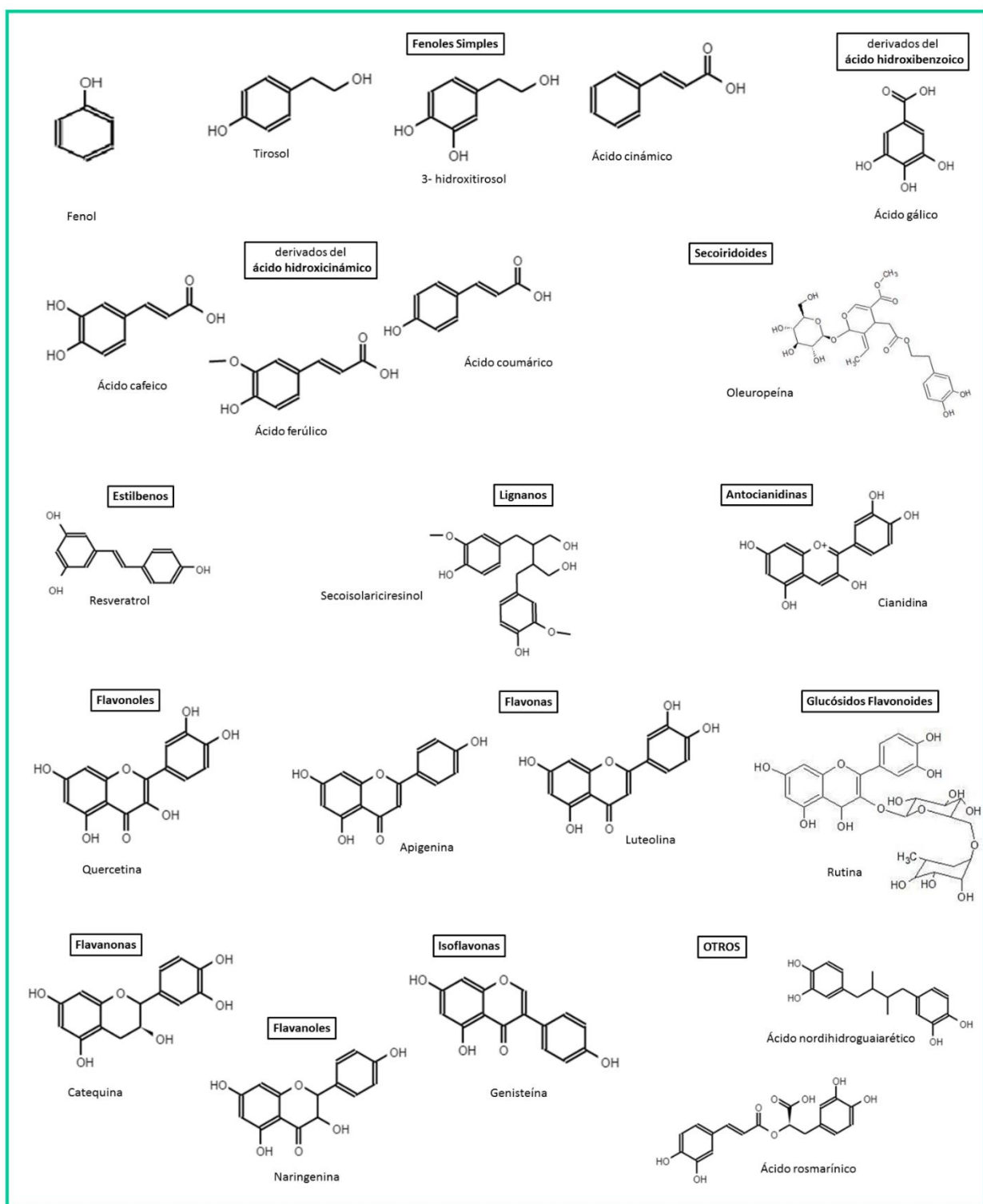


Figura 1.2. Compuestos fenólicos pertenecientes a distintas familias.

1.1.1.2 Alkaloides

Los alcaloides son metabolitos secundarios, cuyos precursores son los aminoácidos, que se caracterizan por contener nitrógeno en su estructura química, normalmente formando parte de un heterociclo, de carácter más o menos básico (Figura 1.3) [23]. El criterio de clasificación de los alcaloides es muy diverso, pudiéndose clasificar según su taxonomía, origen biogénico o en base al tipo de heterociclo de nitrógeno presente en su estructura [24]. La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica de los alcaloides hacen que sea un grupo importante entre las sustancias naturales de interés terapéutico. Un gran número de medicamentos, con diversas propiedades farmacológicas, se han obtenido de plantas que contienen concentraciones significativas de alcaloides [23].

Durante la última década se han estudiado diferentes tipos de alcaloides derivados de diversas especies vegetales debido a sus propiedades farmacológicas y/o medicinales [23]. Entre los alcaloides que han despertado el interés científico podemos mencionar a la piperina, teofilina, teobromina, harmalina, nicotina y cafeína. Éstos han sido destacados por sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas, broncodilatadores, antiinflamatorias, entre otras [25, 26].

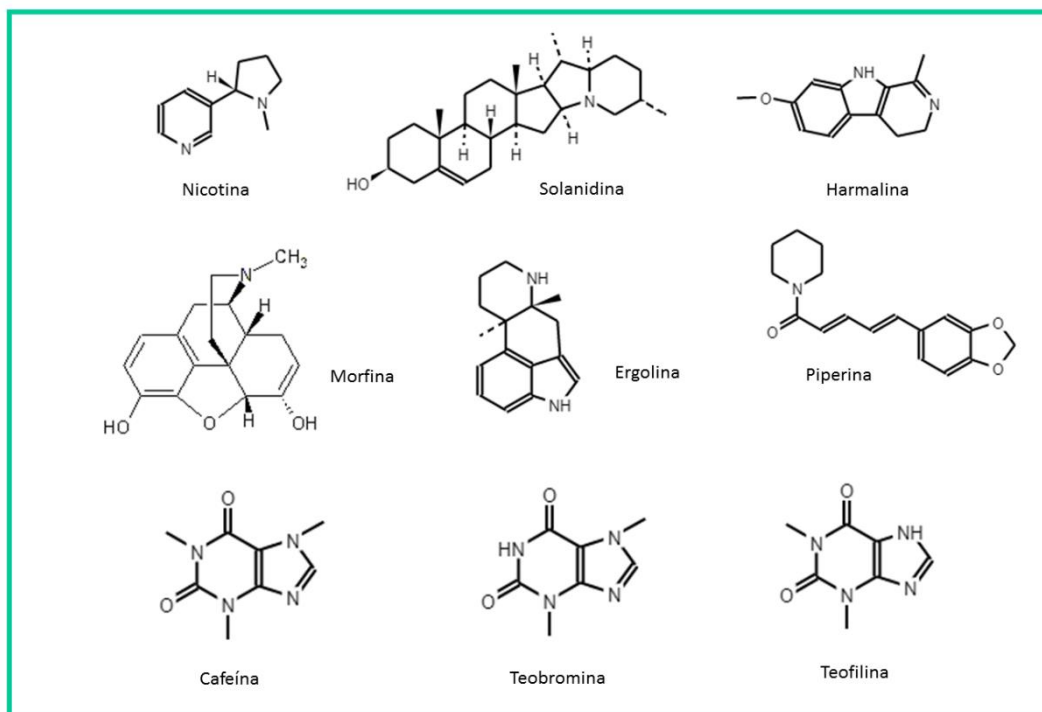


Figura 1.3. Estructura de alcaloides pertenecientes a distintas familias.

1.1.1.3 Compuestos Volátiles

Los Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs; por sus siglas en inglés Volatile Organic Compounds) son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas bajo la influencia de múltiples factores de estrés biótico y abiótico [27]. Se han identificado alrededor de 1700 compuestos volátiles en más de 90 familias de plantas [28]. Dentro de este grupo se encuentran los terpenoides (homo-, mono-, di- y sesquiterpenoides), derivados de ácidos grasos (hidrocarburos saturados e insaturados), benzenoides, fenilpropanoides, así como ciertos alcanos, alquenos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y cetonas (Figura 1.4) [29, 30]. Los compuestos orgánicos volátiles cumplen diversas funciones en las plantas, entre las que se destacan la defensa contra herbívoros y microorganismos patógenos, atracción de polinizadores y microorganismos beneficiosos y por último, algunos de estos compuestos sirven como señales de comunicación química entre las plantas [28, 30].

Entre los VOCs más importantes se destacan los terpenoides, así como también los derivados de ácidos grasos, benzenoides y fenilpropanoides [31]. Los terpenoides son

compuestos generalmente no saturados formados por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno de estructura no aromática que se encuentran sobre todo en los aceites esenciales y resinas. Muchas de las plantas deben a sus compuestos terpénicos, sus propiedades aromáticas y fármacodinámicas variables. Se ha reportado que los VOCs poseen actividad antioxidante y antimicrobiana contra diferentes microorganismos patógenos [32, 33].

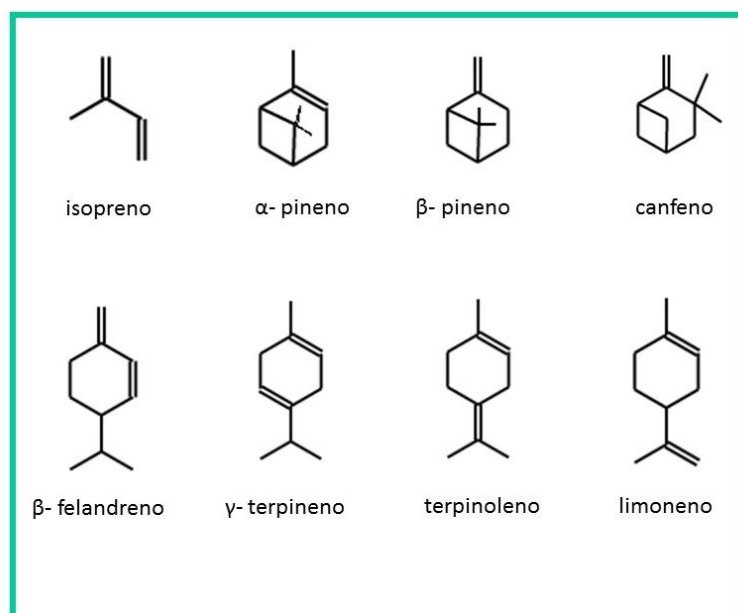


Figura 1.4. Compuestos volátiles.

1.1.2 Propiedades antimicrobianas de extractos de plantas medicinales

Entre las aplicaciones de los extractos de plantas se destaca su uso como agentes antimicrobianos frente a patógenos que afectan la salud humana. Diversos reportes evalúan esta propiedad para preparaciones obtenidas a partir de las especies de *Larrea*. Stege y colaboradores demostraron la actividad de extractos acuosos de *L. divaricata* obtenidos mediante infusión, maceración y decocción frente a *Helicobacter pylori* [34]. Por otro lado, extractos alcohólicos de especies de *Larrea* obtenidos por maceración fueron evaluados satisfactoriamente frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, entre otros [35]. La respuesta de macrófagos frente a *C. albicans* fue

evaluada por Martino y colaboradores [36], observando un efecto inductor de macrófagos por parte del extracto de *L. divaricata*. Recientemente, Moreno y colaboradores [37] evaluaron el uso de extractos secos de *L. cuneifolia* y *L. divaricata* en cepas aisladas de candidiasis vaginal. Este patógeno resulta de especial interés debido a su elevada prevalencia en humanos.

1.1.2.1 Extractos de plantas medicinales para el control de *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo perteneciente al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación [38]. Este hongo forma parte de la flora habitual del organismo humano, encontrándose en piel y mucosas (cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, puede proliferar como agente patógeno [39].

Dentro del género *Candida* la especie de mayor prevalencia en humanos es *C. albicans* y es causal de una alta tasa de mortalidad a nivel mundial (Figura 1.5) [40]. Las infecciones producidas por este patógeno, conocidas como candidiasis, afectan predominantemente la piel y mucosas (oral y vaginal); pudiendo también generar serias infecciones sistémicas (especialmente en pacientes inmuno comprometidos) [39, 41, 42].



Figura 1.5. Ejemplos de candidiasis dérmica.

El tratamiento convencional para candidiasis se asocia a un gran número de efectos secundarios, lo que limita la cantidad y frecuencia de las dosis. Además, el uso extensivo de un limitado número de agentes antifúngicos, principalmente azoles, ha llevado a la aparición

de cepas resistentes, un problema de gran preocupación. En el caso de infecciones dérmicas, las recaídas debido a éste patógeno son ilógicamente altas [43]. En este contexto, la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos para el desarrollo de formulaciones tópicas, que permitan el control de este patógeno, representa un gran desafío en el campo de la fitomedicina.

En la actualidad, diversos investigadores han demostrado la efectividad de diferentes extractos vegetales en el control de *C. albicans* [39, 44]. Sin embargo, es importante destacar, que si bien éstos reportes destacan el potencial antimicrobiano de los extractos vegetales, todas las extracciones son llevadas a cabo utilizando metodologías que involucran solventes tóxicos, ya sea en la extracción o para su posterior disolución. Por lo que es necesario establecer nuevas bases para procedimientos que maximicen el rendimiento de extracción sin utilizar reactivos que comprometan la salud y el medio ambiente. El uso de extractos de plantas obtenidos mediante procedimientos analíticos sustentables, a futuro, podría constituirse en un método de vanguardia para el control de este patógeno.

1.2 Química Analítica Verde

La Química Analítica es la disciplina que produce resultados que minimizan la incerteza de la información cualitativa, cuantitativa y estructural de la materia, en el espacio y tiempo. Uno de los aspectos relacionados con la *Química Analítica* es *“la selección de una metodología apropiada para obtener datos de calidad que nos permiten tomar decisiones sobre un problema planteado, siendo lo más eficiente posible.”* Para lograr este propósito, una metodología analítica compromete una serie de pasos, donde la cantidad y la selección adecuada de cada uno de estos pasos depende tanto de las características de la muestra como también de la respuesta que buscamos obtener (Figura 1.6).

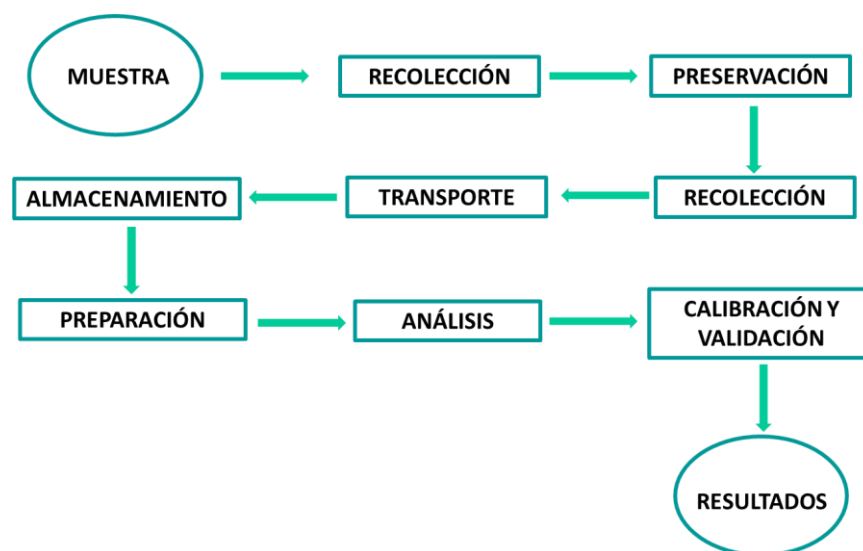


Figura 1.6. Diagrama de un procedimiento analítico.

Enmarcados en una tendencia mundial al desarrollo de procesos sostenibles y cuidado del medio ambiente, el desafío de actuar responsablemente compromete también al área de la Química. En los años 90 surge la Química Verde (QV) como una contribución de la comunidad química al desarrollo sustentable. En 1999, Paul T. Anastas propone que los principales objetivos de la QV son la reducción y, en el caso ideal, la eliminación del uso de reactivos tóxicos, así como también la disminución y eliminación de los residuos generados [45]. Luego, en el año 2000 Anastas y Warner establecieron los 12 principios de la QV, los cuales resaltan la necesidad de evitar el uso de reactivos tóxicos, reducir el consumo energético, la generación de residuos y buscar tanto el cuidado del operario como del ambiente [46].

Recientemente, Galuszka y colaboradores [47] establecieron los principios de la QAV que se muestran en la Figura 1.7. Es importante resaltar que los primeros pasos de lo que es hoy la Química Analítica Verde (QAV) fueron dados por de la Guardia y Ruzicka en 1995 [48]. Éstos autores expresaron la problemática de la cantidad de solventes tóxicos usados y de residuos generados en procedimientos analíticos; incluso en aquellos servicios destinados a la detección de contaminantes ambientales, siendo esto una seria contradicción. Asimismo, remarcaron que la mayoría de los métodos certificados por la EPA (Agencia de Protección Ambiental) y la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) requerían el uso de

solventes tóxicos y corrosivos sin ninguna alternativa disponible. Ante esta situación, proponen como principal estrategia la miniaturización de las metodologías para lograr la reducción de volúmenes implicados.

PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA ANALÍTICA VERDE	
1	Seleccionar técnicas analíticas directas.
2	Integrar procedimientos analíticos y operaciones.
3	Generar la mínima cantidad posible de residuos, y tratarlos correctamente.
4	No desperdiciar energía.
5	Implementar la automatización y miniaturización de procedimientos.
6	Utilizar reactivos obtenidos de fuentes renovables.
7	Proteger al operador.
8	Realizar mediciones in-situ.
9	Evitar derivatización .
10	Minimizar el número de muestra y su tamaño.
11	Elegir métodos multi-analito o multi parámetros.
12	Eliminar o reemplazar reactivos tóxicos.

Figura 1.7. Principios de la Química Analítica Verde (Galuzka et al. [49]).

Analizando el concepto de Química Analítica desde una perspectiva sustentable podemos decir que un “*procedimiento analítico verde*”, debe ser capaz de resolver un problema con el máximo nivel de confiabilidad, generando el mínimo impacto tanto medio ambiental como para el operario. A raíz de esto, se desprende la necesidad de utilizar un sistema de medida y evaluación que nos permita determinar el grado en que una metodología impacta negativamente sobre el medio ambiente y la salud humana.

1.2.1 Métricas de Sustentabilidad

El desarrollo y la aplicación de métricas para evaluar la sustentabilidad de un procedimiento se presenta como uno de los grandes retos de la Química Verde. Una evaluación correcta debe permitir comparar entre técnicas existentes, tomar la decisión de

emplear la que implique menos riesgos así como también, en caso de ser necesario, detectar los pasos que deben optimizarse [50].

Se han desarrollado diferentes métricas para procedimientos industriales como así también para síntesis orgánica. Sin embargo, un procedimiento analítico se diferencia de uno industrial principalmente por las escalas, por lo que no sería correcto emplear las mismas valoraciones para ambos. A esto se suma la complejidad de una metodología analítica debido a la gran diversidad de analitos, técnicas empleadas y complejidad de ciertas matrices. Es por esto que se debe estudiar cada uno de los pasos, desde la toma de muestra hasta el análisis de datos, para lograr una correcta evaluación de un procedimiento analítico.

La primera propuesta para evaluar la sustentabilidad de una metodología analítica fue el pictograma NEMI (*National Environmental Methods Index*), establecido en 2002. Éste pictograma consiste en un círculo dividido en 4 partes, representando: 1) PBT (persistencia, bioacumulación y toxicidad); 2) peligrosidad del proceso y de los productos, 3) carácter corrosivo de los solventes usados, y 4) residuos generados. Si la metodología cumple con los criterios establecidos para cada cuadrante, se pintan de verde (Figura 1.8).

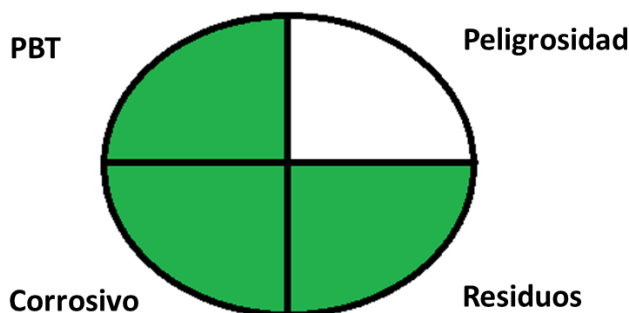


Figura 1.8. Pictograma NEMI-2002.

Si bien ésta fue la primera propuesta en métricas de sustentabilidad y presenta la ventaja de ser fácil de interpretar, es sólo una aproximación cualitativa. Además, solo tiene en cuenta

los efectos negativos del uso de reactivos y la generación de residuos, dejando de lado aspectos importantes como el consumo energético [50, 51].

Raynie y Driver [52] propusieron una modificación al sistema NEMI, que denominaron “Perfil de Valoración Verde” (*Green Assessment Profile*), el cual incluye el consumo energético, permitiendo aumentar el poder de discriminación entre técnicas. Además, la contribución de “peligrosidad” del pictograma NEMI fue dividida en tres sectores diferentes considerando individualmente salud humana, seguridad y medio ambiente (Figura 1.9).

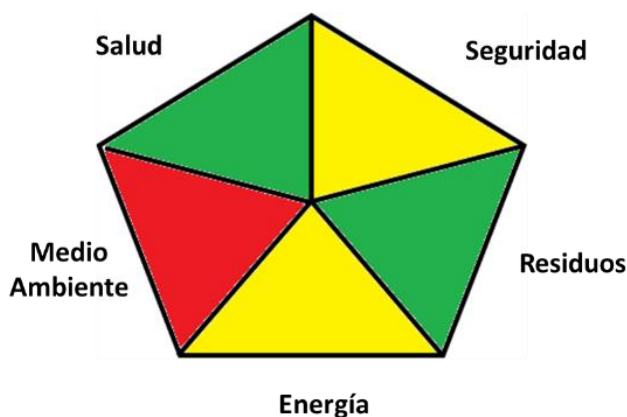


Figura 1.9. Perfil de Valoración Verde – 2009.

En 2011, Garrigues y De la Guardia [53] sugirieron que el pictograma NEMI debía ser pintado en una escala de tres colores, siendo de mayor riesgo a menor: rojo-amarillo-verde. Ésta propuesta permite evaluar el uso de reactivos y procedimiento (peligrosidad y PBT), residuos generados, riesgos del operador y la energía consumida. Es decir, mantiene la simpleza del pictograma NEMI pero incorpora una escala semicuantitativa (Figura 1.10).



Figura 1.10. Modificación del Pictograma NEMI – 2011.

Más recientemente en 2012, Galuszka y colaboradores [47], postularon la Eco-Escala Analítica, aplicando el concepto de Puntos de Penalidad y Eco-Escala, propuesto por Van Aken et al. [54] para síntesis orgánica (Figura 1.11.). Ésta escala asigna 100 puntos al análisis verde ideal y se restan a este valor los puntos de penalidad (PP) correspondientes a:

- la naturaleza del solvente y riesgos asociados al uso
- N° de pictogramas x palabra de advertencia x volumen

	PP
Volumen	
< 10 mL (g)	1
10–100 mL (g)	2
> 100 mL (g)	3
Denominación	
Advertencia	1
Peligro	2
Consumo Energético	
< 0,1 kWh por muestra	0
< 1,5 kWh por muestra	1
1,5 kWh por muestra	2
Generación de residuos	
0 mL (g)	0
< 1 mL (g)	1
1–10 mL (g)	3
> 10 mL (g)	5

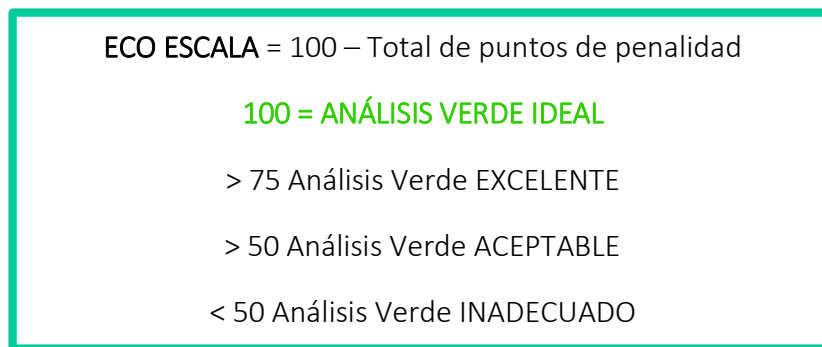


Figura 1.11. Valoración según Eco-Escala – 2012.

Sin embargo, debido a los intervalos utilizados, ésta propuesta falla en discriminar entre micro y macro escalas, ya que por ejemplo el uso de 0,8 mL de solvente tendría los mismos puntos de penalidad que el uso de 9,9 mL. Con el fin de mejorar esta inconsistencia, en 2016 Armenta y colaboradores [51] propusieron el “Certificado Verde” el cuál también se basa en puntos de penalidad y en el uso de colores asociados a letras de la A hasta la G, siendo A, el procedimiento verde ideal (Figura 1.12).

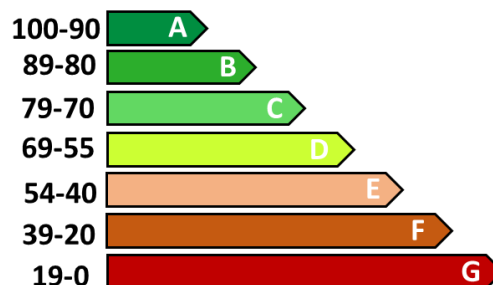


Figura 1.12. Escala de puntos asignados según el Certificado Verde- 2016.

Para una correcta evaluación del volumen empleado de reactivo y de la generación de residuos, estos autores grafican los PP vs estos parámetros, así se consigue una correcta asignación de penalidades para ambos casos. Las ecuaciones resultantes y empleadas para el cálculo de los puntos de penalidad son las siguientes:

$$PP_R = (0.61 \pm 0.05) V^{(0.31 \pm 0.02)} \quad (1)$$

$$PP_W = (0.50 \pm 0.08) W^{(0.4 \pm 0.02)} \quad (2)$$

donde, PP_R : puntos de penalidad para los reactivos, PP_W : puntos de penalidad para el residuo generado, V : volumen de solvente, W : volumen de residuo.

Es necesario desatacar que las métricas de sustentabilidad han sido específicamente diseñadas para Química Analítica, por lo que al momento de desarrollar una metodología, cada químico debe aprovechar la oportunidad y aplicarlas con el fin de evaluar la sustentabilidad de su procedimiento y realizar las correcciones necesarias.

1.2.2 Metodologías de extracción convencionales vs no convencionales

Actualmente, si bien los avances instrumentales para el desarrollo de la química analítica, son incuestionables la etapa de extracción, sigue siendo un paso limitante en el desarrollo de todo procedimiento analítico [55]. Esto se debe a que diversas variables influyen significativamente en esta etapa, entre las que se destacan la naturaleza de la muestra y analitos, como así también la amplia gama de solventes y técnicas de extracción.

En particular, para la obtención de compuestos bioactivos a partir de matrices vegetales, las técnicas convencionales de extracción incluyen maceración, decocción, soxhlet e infusión. Muchas de ellas son recomendados en farmacopeas o en métodos oficiales de análisis de la AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) [56-58]. En las últimas décadas, la Química Analítica ha contribuido con técnicas no convencionales de extracción; tales como ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos, etc. Cabe destacar que son metodologías ya consolidadas que apuntan a reducir el impacto ambiental mejorando la eficiencia (Tabla 1.1) [59, 60].

Durante la optimización de un proceso de extracción, la selección de un solvente adecuado resulta esencial para obtener rendimientos satisfactorios. El agua y los solventes orgánicos, tales como etanol, metanol, isopropanol son los más comúnmente usados.

Mientras que el agua es efectiva como solvente de extracción de metabolitos polares, los solventes orgánicos permiten extraer compuestos de distinta polaridad. Sin embargo, el uso de estos últimos está limitado debido a su alto costo, baja biodegradabilidad y toxicidad tanto para el operario como para el ambiente [61, 62].

En este contexto, la implementación de procesos libres de solvente sería ideal, sin embargo, ellos juegan un rol de suma importancia en la etapa de extracción [55]. Por lo tanto, la búsqueda de alternativas sustentables a los solventes orgánicos se ha convertido en uno de los grandes desafíos de la Química Verde [63].

Tabla 1.1. Metodologías convencionales y no convencionales de extracción de compuestos bioactivos a partir de plantas medicinales.

CONVENCIONALES	Técnica	Descripción	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Maceración	Se coloca en contacto el material vegetal con el solvente (remojar) y se deja reposar a temperatura ambiente por al menos 3 días con agitación frecuente hasta la disolución del material. Luego se somete a presión al sólido restante y los líquidos resultantes se mezclan y filtran. Se utilizan generalmente soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas.	Metodologías sencillas. No requieren de equipamiento costoso.	-Grandes cantidades de solvente. -Residuo generado (contiene solventes orgánicos) -Procedimientos largos
	Infusión	Las infusiones son preparadas macerando el material vegetal por un periodo corto de tiempo ya sea con agua hirviendo o fría. Éstas son consideradas soluciones diluidas de los constituyentes fácilmente solubles. -La farmacopea Argentina VII Ed. establece un tiempo de 20 minutos, únicamente con agua hirviendo y sugiere una concentración de 5 % p/v.		-Por su naturaleza acuosa éstas tienden a sufrir contaminación microbiana por lo que es necesario usarlas antes de las 12 horas de preparadas.
	Decocción	Se obtienen por acción del agua mantenida a ebullición sobre el material vegetal por un tiempo definido. Luego es enfriado, colado o filtrado con expresión. Este procedimiento es aplicado a compuestos solubles en agua y termoestables. -La farmacopea Argentina VII Ed. establece un tiempo de 20 minutos y sugiere una concentración de 5 % p/v.		Los metabolitos deben ser termoestables.
	Soxhlet (Extracción continua con calor)	El material vegetal finamente molido es colocado en una bolsa porosa hecha de papel de filtro o celulosa que está ubicada en la cámara del aparato de Soxhlet. El solvente de extracción es calentado en el matraz y los vapores son condensados en el condensador. Las gotas caen y extraen por contacto con el material vegetal. Cuando el líquido contenido en la cámara llega al sifón vuelve a comenzar el proceso. Se utilizan generalmente solventes orgánicos	Requiere cantidades menores de solvente que la maceración. No requiere de filtrado posterior.	Exposición a emisiones tóxicas de solventes orgánicos. Por esto, no es considerado amigable con el ambiente. Se limita a muestras secas y finamente divididas. Posibilidad de descomposición térmica de los compuestos.

NO CONVENCIONALES	Ultrasonido (UAE)	Se basa en usar ultrasonido (entre 20 kHz - 2000 kHz) para lograr un efecto mecánico de cavitación acústica que aumenta el contacto entre el solvente y la muestra. Además, al someterse la matriz vegetal a ultrasonido aumenta la permeabilidad de la pared celular facilitando la liberación de los compuestos de interés.	Reducción de tiempo y volumen de solvente.	Se debe controlar la energía de ultrasonido para evitar generar radicales libres.
	Microondas (MAE)	Esta técnica consiste en utilizar energía de microondas para facilitar la partición de los analitos desde la matriz al solvente. La radiación interactúa con dipolos de materiales polares y con materiales polarizables (solventes y muestras) causando calor cerca de la superficie de los materiales siendo el calor es transferido por conducción. La rotación de los dipolos de las moléculas inducidas por las ondas electromagnéticas rompe los enlaces puente hidrógeno aumentando el contacto solvente- matriz.	Reduce tiempos de extracción y volumen de solvente. Se ha reportado aumento en la recuperación de analitos y en la reproducibilidad.	Se limita a moléculas pequeñas. Se debe controlar temperatura y ciclos para no generar degradación de moléculas activas.
	Fluidos supercríticos	Se emplea una sustancia que en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico comparte propiedades con los líquidos y los gases, pudiendo actuar como solvente.	Permite mayor selectividad y aumentar la eficiencia de extracción.	Equipamiento costoso.

Fuente de la tabla: Azwanida [64] , Handa *et al* [65].

1.2.2.1 Solventes Verdes

1.2.2.1.1 Líquidos Iónicos

El término líquidos iónicos (ILs) se aplica principalmente a líquidos compuestos por iones que poseen un punto de fusión menor a 100 °C [66]. Éstos están constituidos comúnmente por sales (líquidas) u óxidos. La primera sal sintetizada con bajo punto de fusión (12 °C) fue el nitrato de etilamonio en 1914. En 1951 Hurley y Wier, desarrollaron sales con iones de cloroaluminato para galvanoplastia de aluminio. Luego, en la década del 70, las principales aplicaciones estudiadas de los ILs fueron en el área de la electroquímica y más tarde fueron propuestos como solventes en síntesis orgánica.

Entre sus principales componentes se encuentran derivados de imidazol, amonio, pirrol, piridina y fósforo acompañados de aniones orgánicos o inorgánicos. A diferencia de los solventes orgánicos, los ILs no son volátiles en condiciones ambientales, lo que los llevó a ser postulados como “solventes verdes”. Además, poseen otras ventajas atractivas tales como estabilidad química y térmica, no son inflamables, tienen alta conductividad y capacidad de solubilizar compuestos orgánicos. Tanto el anión como la longitud de la cadena n-alquil del catión afectan las propiedades fisicoquímicas (viscosidad, polaridad, etc), pudiendo estas ser modificadas variando la composición del solvente [67]. A pesar de que se presentaron como una prometedora alternativa a los solventes tradicionales, la sustentabilidad de los ILs es muy cuestionada actualmente. Esto se debe principalmente a que los aniones y cationes más comúnmente utilizados en su preparación presentan grandes limitaciones para sus aplicaciones debido a su toxicidad, alto costo e impacto ambiental [67].

1.2.2.1.2 Solventes Eutécticos

Los solventes eutécticos (DES, por sus siglas en inglés) fueron introducidos por Abbott y colaboradores [68] en 2004 como alternativa a los ILs. Estos autores demostraron que combinaciones de urea con sales de amonio cuaternarias sustituidas, tales como cloruro de colina, producían mezclas eutécticas líquidas a temperatura ambiente con propiedades

interesantes como solventes [69]. Un sistema eutéctico, del griego "ευ" (eu = fácil) y "Τήξις" (teksis = fusión), hace referencia a la mezcla de compuestos cuyo punto de fusión y solidificación es menor que el de los compuestos por separado. Las principales ventajas frente a los líquidos iónicos se deben principalmente a su fácil preparación, bajo costo y biodegradabilidad. Asimismo, comparten las características atractivas de los ILs ya que poseen baja volatilidad y es posible ajustar sus propiedades fisicoquímicas siendo también llamados "solventes de diseño". Las aplicaciones de los DES se han centrado principalmente en reacciones orgánicas, electroquímica, reacciones enzimáticas y más recientemente para procesos de extracción de metabolitos a partir de diferentes matrices [61].

1.2.2.1.3 Solventes Eutécticos Naturales

En 2011, Verpoorte y colaboradores [70] propusieron el término "Solventes Eutécticos Naturales" (NADES, por sus siglas en inglés), con el fin de diferenciar de los DES a aquellas mezclas eutécticas constituidas únicamente por compuestos presentes en el metabolismo celular de todos los organismos vivos. Entre los principales componentes de estos solventes verdes se encuentran azúcares, alcoholes, aminoácidos, ácidos orgánicos y derivados de colina (Figura 1.13). En este sentido, los NADES se alinean con los principios de la Química Verde, por su naturaleza, bajo costo, fácil preparación y biodegradabilidad. Cabe destacar que los componentes de los NADES se encuentran en elevadas concentraciones en la dieta humana.

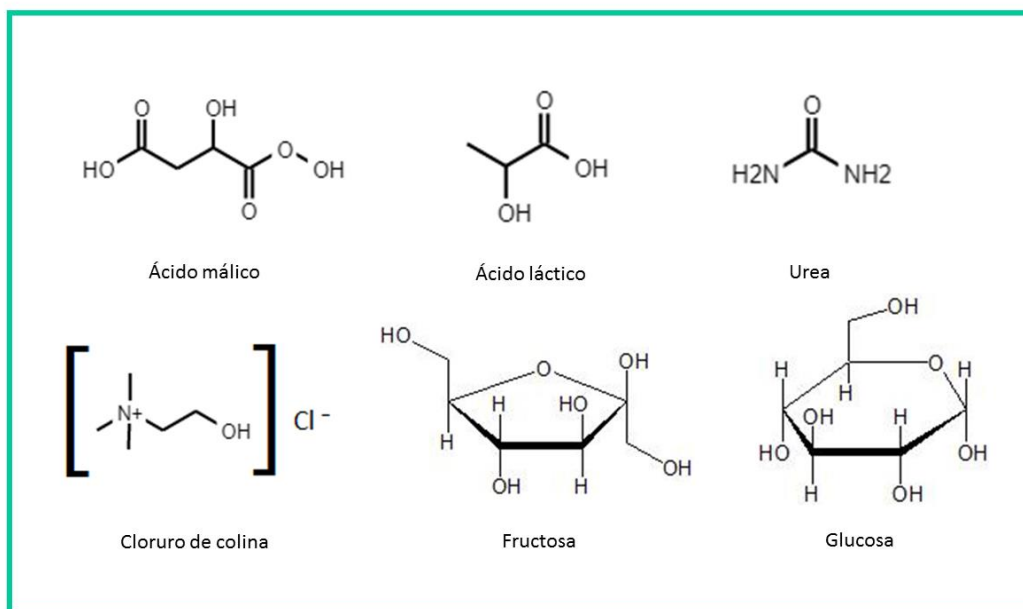


Figura 1.13. Principales componentes de NADES.

Interesantemente, considerando que las especies químicas que forman los compuestos de los eutécticos naturales son componentes mayoritarios en las células Verpoorte y colaboradores [61] postulan que los NADES se forman naturalmente en el interior de las células. Es decir, que constituirían un tercer medio celular, además del lipídico y el acuoso. Mediante este postulado, se podrían explicar reacciones de síntesis y el almacenamiento en las células de numerosos componentes de polaridad intermedia que no son posibles de disolver en un medio acuoso o lipídico.

1.2.2.1.3.1 Composición y preparación de NADES

Los NADES son conocidos como “solventes a medida” ya que, debido a la gran cantidad de combinaciones que pueden originarse (alrededor de 10^6), sus propiedades pueden ajustarse buscando la mezcla más adecuada para una determinada aplicación [62, 71]. Se han reportado diferentes combinaciones de NADES como líquidos estables (Anexo Tabla 1) y pueden ser clasificadas en cuatro grupos:

- a- derivadas de ácidos orgánicos
- b- derivadas de cloruro de colina
- c- mezclas de azúcares
- d- otras combinaciones

La mayoría de las mezclas son constituidas por cloruro de colina con diferentes metabolitos, siendo con ácido láctico la más estudiada en diferentes ratios molares (1:1;1:2;1:3;1:4;1:5;1:9;2:1 y 3:1)[72].

Existen cuatro métodos reportados para preparar NADES:

- a. Agitación-Calentamiento: los componentes de la mezcla son agitados y calentados (50-90 °C) hasta que se forma un líquido claro (30-90 min) [61].
- b. Evaporación: los componentes son disueltos en agua y evaporados a 50 °C con un rotavapor. El líquido obtenido es colocado en un desecador con sílica gel hasta peso constante [61].
- c. Secado en frío: basado en el congelamiento en seco de soluciones acuosas de los componentes por separado (2-24 horas) [73].
- d. Microondas: los componentes son sometidos a ondas electromagnéticas en microondas (200 W) por 20 segundos [74].

El método “agitación y calentamiento” ha sido ampliamente utilizado respecto a los otros, con diversas modificaciones de tiempo y temperatura según la naturaleza de los componentes del NADES.

1.2.2.1.3.2 Estructura supramolecular y efecto de la dilución

El comportamiento eutéctico de los NADES involucra interacciones puente hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, debido a la naturaleza química de los grupos funcionales predominantes en sus componentes (hidroxilo, carbonilo y carboxilo). Con el fin de explorar y conocer la estructura de los NADES, se han utilizado técnicas tales como Espectroscopía de

Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)[75].

Los reportes acerca de la estructura de los NADES han demostrado la presencia de una extensiva red de puentes hidrógeno entre los componentes de estos solventes eutécticos [61, 76]. La supraestructura molecular es específica para cada NADES dependiendo de la naturaleza química de sus componentes y de su relación molar.

El agua es un componente esencial en la estructura de los NADES, ya que tiene gran influencia sobre sus propiedades físicas (viscosidad, conductividad, densidad y polaridad) [76]. Ésta puede encontrarse formando parte de la red supramolecular, ya sea desde su preparación o por posteriores diluciones del solvente. Sin embargo, se ha comprobado que la dilución puede llevar a una progresiva ruptura de la supraestructura. El porcentaje de agua que puede ser incorporado sin que ocurra esta ruptura depende de la composición de cada NADES en particular. Dai y colaboradores [76] evaluaron por medio de RMN el efecto de la dilución con agua de la mezcla 1,2-propanediol – cloruro de colina-agua (1:1:1, PCH), encontrando que la estructura se conserva para diluciones menores a 50 %. Mayores diluciones producen la ruptura de la estructura y consecuente dilución de los compuestos individuales en agua.

1.2.2.1.3.3 Propiedades físicas y toxicidad

Una de las principales ventajas de los NADES es, como se mencionó anteriormente, la posibilidad de ajustar sus propiedades fisicoquímicas para cada aplicación. Esto sumado a su escasa volatilidad y bajo punto de solidificación (menor a 0 °C) permite que sean usados como solventes en diferentes áreas, especialmente en procesos de extracción. La adecuada selección de la naturaleza química de los componentes de los NADES permite el diseño de un solvente específico para extraer un analito en particular o un grupo de compuestos específico. Las propiedades fisicoquímicas que más afectan el proceso de extracción son pH, viscosidad y polaridad [61].

Los NADES pueden presentar un amplio rango de viscosidad; y una disminución en este parámetro implica un aumento en la difusión, lo que puede aumentar la eficiencia de extracción [77]. Si bien la viscosidad de algunos NADES puede ser elevada, ésta puede ser disminuida con el agregado de bajas proporciones de agua. La conductividad de los NADES aumenta cuando la viscosidad disminuye debido a la dilución con agua, por lo que la conductividad también puede ser ajustada con el contenido de agua.

Otro parámetro fisicoquímico que puede ajustarse es la polaridad del solvente. Es así que para el caso de las extracciones, se pueden obtener NADES que poseen mayores cantidades de agua con una mejor performance para la extracción de compuestos polares, mientras que aquellos con bajo contenido de agua son más apropiados para la extracción de compuestos poco polares [61].

Teniendo en cuenta el número de estudios y aplicaciones, los reportes acerca de la toxicidad de los NADES aún son limitados. Para evaluar esta característica de los NADES, se han utilizado tanto estudios de citotoxicidad celular como ensayos de inhibición del crecimiento de distintos microorganismos. Huang y colaboradores [77] evaluaron la toxicidad de diferentes combinaciones eutécticas frente a *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia Coli* y *Salmonella enteritidis*. Los resultados revelaron que tanto los NADES basados en cloruro de colina como los basados en glicerol no inhibieron el crecimiento de los microorganismos bajo estudio. La única combinación que sí presentó inhibición fue L-arginina y glicerol. Hayyan y colaboradores [78] indicaron que diferentes combinaciones eutécticas basadas en cloruro de colina no presentaron toxicidad cuando se evaluaron frente a microorganismos gram positivos y gram negativos. Los resultados de estos aportes indican que la toxicidad depende de las componentes que integran el solvente eutéctico, sin embargo dada la naturaleza de los mismos es posible predecir su baja toxicidad. Cabe destacar que la mayoría de los componentes de los NADES son parte de la dieta humana, tales como ácido láctico, glucosa y fructosa; así como también mucho de ellos son empleados en industrias alimenticia y farmacéutica.

1.2.2.1.3.4 Principales aplicaciones de los NADES

Las características de los NADES permiten su aplicación en numerosos campos de la Química Analítica. La compatibilidad de estos solventes verdes ha sido reportada para distintos pasos del procedimiento analítico, lo que representa una gran alternativa para el reemplazo de los solventes tradicionales empleados comúnmente.

Desde que fueron descritos los NADES, la mayoría de las aplicaciones han estado dedicadas a la extracción de biocompuestos desde fuentes naturales. Como puede verse en la Tabla 1.2, entre los metabolitos más estudiados se destacan los compuestos fenólicos. Además, cabe destacar que se han acoplado satisfactoriamente a diferentes técnicas de extracción, ya sean líquido-líquido o sólido-líquido [79].

Sumado a su atractivo potencial de extractabilidad, la capacidad de los NADES de estabilizar biocompuestos resulta un factor de suma importancia para posteriores aplicaciones de los extractos. Esta propiedad ha sido evaluada con excelentes resultados en NADES de diferente composición. La capacidad de estabilizar pigmentos naturales de *Carthamus tinctorius* fue evaluada por Dai y colaboradores [80], demostrando que los polifenoles evaluados fueron más estables en NADES que en agua o en etanol al 40 % (v/v). Cabe resaltar que la capacidad de estabilizar puede ser ajustada modificando el contenido de agua y aumentando la viscosidad. La elevada habilidad de estabilización es atribuida a la formación de fuertes enlaces puente hidrógeno entre las moléculas del NADES y los solutos [81].

Un gran número de variables afectan la eficiencia de extracción, por lo que la mayoría de los reportes emplean herramientas de optimización para la etapa de preparación de muestra. Interesantemente, los métodos multivariados son elegidos sobre los clásicos univariados, permitiendo así evaluar el efecto de la interacción entre variables. Entre las variables más comúnmente estudiadas se encuentran: la relación muestra/solvente, tiempo y temperatura de extracción, dilución y composición del NADES [82, 83]. Una desventaja que presentan los solventes naturales, como ya se ha mencionado previamente, es su viscosidad.

Ésta puede generar algunos inconvenientes prácticos en la extracción, como son menor transferencia de masa o mayores tiempos. Sin embargo la adición de agua es una estrategia ampliamente usada para disminuir la viscosidad [84].

Las aplicaciones reportadas de los NADES, han demostrado su compatibilidad con las técnicas de separación más utilizadas como Cromatografía Líquida, Electroforesis Capilar y Cromatografía Gaseosa [83, 85]. La inyección de extractos de NADES no afecta la eficiencia de separación en términos de tiempos de retención/migración, forma de pico y relación señal/ruido [79]. Por otro lado, también se han empleado como modificadores de la fase móvil o como parte de fases estacionarias con resultados satisfactorios [86].

Por otro lado, la selección de una técnica adecuada de detección depende de numerosos factores tales como: naturaleza química del analito y concentración, así como también de las características de la muestra. En este contexto, el solvente donde el analito *target* se encuentra disuelto debe ser capaz de estabilizarlo y al mismo tiempo debe ser compatible con la técnica de detección sin interferir en la misma. Los NADES han demostrado compatibilidad con la mayoría de las técnicas incluyendo detección ultravioleta, espectrometría de masas, espectrometría de infrarrojo, electroquímica y espectroscopía de absorción atómica [87, 88].

Tabla 1.2. Aplicaciones de los NADES como medio de extracción.

Biocompuestos	Matriz	NADES	Método de extracción	Ref
Compuestos fenólicos	<i>Carthamus tinctorius</i>	prolina: ácido málico (1:1), 25 % agua ácido láctico: glucosa (5:1)	muestra/NADES: 17 mg mL ⁻¹ H&S: 40 °C, 60 min centrifugación: 10968 g, 20 min	[89]
Compuestos fenólicos (antocianinas)	<i>Catharantus roseus</i>	ácido láctico: glucosa: agua (5:1:3) glucosa: fructosa: sucrosa: agua (1:1:1:11)	muestra /NADES: 33 mg mL ⁻¹ H&S: 40 °C, 30 min centrifugación: 1300 rpm, 20 min	[90]
Compuestos fenólicos	<i>Cajanus cajan</i>	cloruro de colina: maltosa (1:2), 20 % agua	muestra/NADES: 33 mg mL ⁻¹ MW: 60 °C, 12 min	[91]
Compuestos fenólicos (Flavonoides)	<i>Radix Scutellariae</i>	cloruro de colina: ácido láctico (1:2), 20 % agua	muestra/NADES: 67 mg mL ⁻¹ MW: 60 °C, 12 min, 500 W	[92]
Compuestos fenólicos	<i>Sophora japonica L.</i>	L-prolina: glicerol (2:5), 10 % agua	muestra/NADES: 50 mg mL ⁻¹ UAE: 45 min, 25°C centrifugación: 12300 g, 30 min	[93]
Ginkgolidos, ácido fenólicos y ácido ginkgolico ginsenosidos	<i>Ginkgo biloba</i> <i>Panax ginseng</i>	ácido málico: cloruro de colina (1:1), 20 % agua(w/w); Glicerol: prolina: sucrosa (1:1:1), 20 % agua (w/w) ácido málico: cloruro de colina (1:1), 20 % agua (w/w); ácido málico: glucosa (1:1), 20 % agua (w/w)	muestra/NADES: 50 mg mL ⁻¹ Baño térmico: 40 °C, 60 min UAE: 30 min, 25 °C centrifugación: 20 min, 13.000 rpm	[94]
Diterpenoides	<i>Phyllanthus flexuosus</i>	cloruro de colina: glicerol (1:2)	SPE: resina de intercambio aniónica modificada con NADES	[95]
Saponinas	<i>Agave sisalana</i>	cloruro de colina: ácido propiónico (2:1), 42 % etanol	muestra/ NADES 1:10 H&S: 50 °C, 120 rpm, 90 min	[96]
Saponinas	<i>Ziziphus joazeiro</i>	cloruro de colina: ácido acético 19 % agua	muestra/NADES 1:20 H&S: 30 °C, 120 rpm, 90 min	[96]

Alcaloides, antraquinonas, saponinas y compuestos fenólicos	<i>Berberidis Radix, Epimedii</i>			
	<i>Folium, Notoginseng Radix</i> <i>et Rhizoma, Rhei Rhizoma et</i> <i>Radix, y Salviae Miltiorrhizae</i> <i>Radix et Rhizoma</i>	cloruro de colina: ácido láctico (1:2), 35 % agua	muestra/NADES: 20 mg mL ⁻¹ UAE: 60 °C, 21 min centrifugación: 16200 g, 10 min.	[97]
Compuestos volátiles (monoterpenos)	<i>Mentha piperita L.</i>	cloruro de colina: D-(+)-glucosa (5:2)	muestra/NADES: 100 g mL ⁻¹	[98]

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Desarrollar procedimientos de extracción sustentables para la obtención de bioextractos a partir de plantas medicinales, con el fin de ser incorporados como ingredientes activos en formulaciones tópicas para tratamientos de enfermedades de la piel.

1.3.1.1 Objetivos Específicos

- Optimizar la síntesis de un solvente eutéctico natural (NADES) con características adecuadas para la extracción de compuestos bioactivos de diferente polaridad.
- Realizar estudios fisicoquímicos, espectroscópicos y de modelado molecular para la caracterización de los NADES diseñados.
- Desarrollar una metodología sustentable para la extracción de compuestos bioactivos a partir de plantas nativas, utilizando como extractante sistemas eutécticos.
- Elaborar bioextractos a partir de dos especies del género *Larrea*, *Larrea divaricata* y *Larrea cuneifolia*, autóctonas de la región de Cuyo; y *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*, ambas pertenecientes a la familia Lamiáceas y conocidas por sus propiedades medicinales.
- Caracterizar los bioextractos en términos de actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y alcaloides.
- Comparar la eficiencia de extracción de NADES con solventes tradicionales.
- Desarrollar metodologías cromatográficas para la caracterización de los bioextractos.
- Evaluar en primer lugar la actividad antimicrobiana de los bioextractos de *Larrea divaricata*, *Larrea cuneifolia*, *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* frente a *Candida albicans*.
- Desarrollar formulaciones antifúngicas incorporando como ingrediente activo a los bioextractos obtenidos y caracterizados previamente.
- Evaluar las formulaciones en términos de parámetros físicos y capacidad antimicrobiana.

1.4 Configuración instrumental

El desarrollo del presente trabajo de tesis se realizó con el equipamiento disponible en las siguientes instituciones;

- Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM-CONICET) el cual se encuentra en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCuyo; donde se procesaron las muestras y se realizaron las determinaciones mediante HPLC-DAD.
- Cátedra de Fitopatología, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCuyo, donde se llevaron a cabo los ensayos microbiológicos.
- Instituto de Química de San Luis (INQUISAL-CONICET) en la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la UNSL , donde se elaboraron las formulaciones tópicas
- Instituto de Química de Rosario IQUIR-CONICET, donde se llevaron a cabo los estudios de RMN y Modelado Molecular.

Asimismo, contó con la colaboración del Área de Dermatología del Hospital Laggomaggiore y la Cátedra de Espacios Verdes la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCuyo.

1.5 Bibliografía

- [1] C.M. Chariandy, C.E. Seaforth, R.H. Phelps, G.V. Pollard, B.P.S. Khambay, Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties, *Journal of Ethnopharmacology* 64(3) (1999) 265-270.
- [2] B.E. Abu-Irmaileh, F.U. Afifi, Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs, *J Ethnopharmacol* 89(2-3) (2003) 193-7.
- [3] S. Sarker, D.L. Nahar, Y. Kumarasamy, Sarker, S. D.*, Nahar, L. and Kumarasamy, Y. (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals, *Methods* 42, 321-324, 2007.
- [4] M.J. Christenhusz, J.W. Byng, The number of known plants species in the world and its annual increase, *Phytotaxa* 261(3) (2016) 201-217.
- [5] N. Kalidindi, N.V. Thimmaiah, N.V. Jagadeesh, R. Nandeeep, S. Swetha, B. Kalidindi, Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves, *Journal of Food and Drug Analysis* 23(4) (2015) 795-802.
- [6] M.P.A. Carabajal, M.I. Isla, I.C. Zampini, Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of herbal teas from native plants used in traditional medicine in Argentina, *South African Journal of Botany* 110 (2017) 258-265.
- [7] J. Alonso, C. Desmarchelier, Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de salud., Buenos Aires, Argentina, 2015.
- [8] M.I. Mercado, M.A. Moreno, A.I. Ruiz, I.F. Rodríguez, I.C. Zampini, M.I. Isla, G.I. Ponessa, Morphoanatomical and histochemical characterization of *Larrea* species from Northwestern of Argentina, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 28(4) (2018) 393-401.
- [9] F.A. Roig, Flora medicinal mendocina. Las plantas medicinales y aromáticas de la provincia de Mendoza (Argentina). EDIUNC, 2002.
- [10] B. Joana, V.C. Soto, P. Pablo, L. Gabriela, S.M. Fernanda, Phenolic characterization and antimicrobial activity of folk medicinal plant extracts for their applications in olive production, *ELECTROPHORESIS* 35(11) (2014) 1709-1718.
- [11] A.G. Valesi, E. Rodriguez, G. Vander Velde, T.J. Mabry, Methylated flavonols in *Larrea cuneifolia*, *Phytochemistry* 11(9) (1972) 2821-2826.
- [12] V. Vogt, J.A. Andrés, M. Rovera, L. Sabini, S.B. Rosas, Biocontrol activity of medicinal plants from Argentina, *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*, Springer2015, pp. 413-430.
- [13] M.R. Alonso, C. Anesini, Clinical Evidence of Increase in Hair Growth and Decrease in Hair Loss without Adverse Reactions Promoted by the Commercial Lotion ECOHAIR®, *Skin Pharmacology and Physiology* 30(1) (2017) 46-54.
- [14] P.M. Dewick, *Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons Ltd (2002).
- [15] A. de Marcano, N. Vargas, A. Pire, Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial in vitro de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*, *Revista de la Facultad de Agronomía* 22(4) (2005) 315-324.

- [16] B.D.Á. Oliveira, A.C. Rodrigues, B.M.I. Cardoso, A.L.C.C. Ramos, M.C. Bertoldi, J.G. Taylor, L.R. da Cunha, U.M. Pinto, Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract, *Industrial Crops and Products* 84 (2016) 59-66.
- [17] A.C.N. Sobrinho, E.B. de Souza, M.F.G. Rocha, M.R.J.R. Albuquerque, P.N. Bandeira, H.S. dos Santos, C.S. de Paula Cavalcante, S.S. Oliveira, P.R. Aragão, S.M. de Moraes, Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers.(Asteraceae), *Industrial Crops and Products* 84 (2016) 108-115.
- [18] F. Chen, X. Long, M. Yu, Z. Liu, L. Liu, H. Shao, Phenolics and antifungal activities analysis in industrial crop Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) leaves, *Industrial crops and products* 47 (2013) 339-345.
- [19] C. Piccirillo, S. Demiray, A.S. Ferreira, M. Pintado, P.M. Castro, Chemical composition and antibacterial properties of stem and leaf extracts from *Ginja cherry* plant, *Industrial crops and products* 43 (2013) 562-569.
- [20] I. Ignat, I. Volf, V.I. Popa, A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food chemistry* 126(4) (2011) 1821-1835.
- [21] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry* 99(1) (2006) 191-203.
- [22] A. Ghasemzadeh, N. Ghasemzadeh, Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human, *Journal of medicinal plants research* 5(31) (2011) 6697-6703.
- [23] M.M. Cowan, Plant products as antimicrobial agents, *Clinical microbiology reviews* 12(4) (1999) 564-82.
- [24] T. Aniszewski, *Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications*, Elsevier 2015.
- [25] A. Navid, D.M. Ng, S.E. Wong, F.C. Lightstone, Application of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Study Theophylline Metabolism and Its Interactions With Ciprofloxacin and Caffeine, *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 5(2) (2016) 74-81.
- [26] A. Rodriguez, A. Costa-Bauza, C. Saez-Torres, D. Rodrigo, F. Grases, HPLC method for urinary theobromine determination: Effect of consumption of cocoa products on theobromine urinary excretion in children, *Clinical biochemistry* 48(16-17) (2015) 1138-43.
- [27] D. Panka, D. Piesik, M. Jeske, A. Baturo-Ciesniewska, Production of phenolics and the emission of volatile organic compounds by perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)/Neotyphodium lolii association as a response to infection by *Fusarium poae*, *Journal of plant physiology* 170(11) (2013) 1010-9.
- [28] V.C. Soto, I.B. Maldonado, V.P. Jofré, C.R. Galmarini, M.F. Silva, Direct analysis of nectar and floral volatile organic compounds in hybrid onions by HS-SPME/GC–MS: Relationship with pollination and seed production, *Microchemical Journal* 122 (2015) 110-118.
- [29] B. Bertrand, R. Boulanger, S. Dussert, F. Ribeyre, L. Berthiot, F. Descroix, T. Joet, Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality, *Food Chem* 135(4) (2012) 2575-83.
- [30] H. Noreen, M. Farman, Comparative Gas Chromatography-Mass Spectrometric Analysis of Biologically Active Volatile Phytochemical Constituents of Aerial Parts and Roots of *Coronopus didymus*, 2016.

- [31] J.C. Marín-Loaiza, C.L. Céspedes, Volatile compounds from plants. Origin, emission, effects, analysis and agro applications, *Revista Fitotecnia Mexicana* (2007) 327-351.
- [32] M. Gilles, J. Zhao, M. An, S. Agboola, Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species, *Food Chemistry* 119(2) (2010) 731-737.
- [33] D. Kalembe, D. Kusewicz, K. Świąder, Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai, *Phytotherapy Research* 16(3) (2002) 288-291.
- [34] P.W. Stege, R.C. Davicino, A.E. Vega, Y.A. Casali, S. Correa, B. Micalizzi, Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*, *Phytomedicine* 13(9) (2006) 724-727.
- [35] I.C. Zampini, N. Cudmani, M.I. Isla, Antimicrobial activity of Argentine medicinal plants on antibiotic-resistant bacteria, *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 41(3) (2007) 385-393.
- [36] R.F. Martino, R.C. Davicino, M.A. Mattar, Y.A. Casali, S.G. Correa, B. Micalizzi, In vivo effect of three fractions of *Larrea divaricata* Cav. (jarilla) on the innate immune system: macrophage response against *Candida albicans*, *Mycoses* 54(6) (2011) e718-25.
- [37] M.A. Moreno, S. Córdoba, I.C. Zampini, M.I. Mercado, G. Ponessa, J.E. Sayago, L.L.P. Ramos, G. Schmeda-Hirschmann, M.I. Isla, Argentinean *larrea* dry extracts with potential use in vaginal candidiasis, *Natural Product Communications* 13(2) (2018) 171-174.
- [38] M.J. McCullough, B.C. Ross, P.C. Reade, *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation, *International journal of oral and maxillofacial surgery* 25(2) (1996) 136-44.
- [39] A. Zida, S. Bamba, A. Yacouba, R. Ouedraogo-Traore, R.T. Guiguemdé, Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review, *Journal de Mycologie Médicale* 27(1) (2017) 1-19.
- [40] J.R. Naglik, A. König, B. Hube, S.L. Gaffen, *Candida albicans*–epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity, *Current Opinion in Microbiology* 40 (2017) 104-112.
- [41] S. Cretton, A. Oyarzún, D. Righi, L. Sahib, M. Kaiser, P. Christen, V. Fajardo, A new antifungal and antiprotozoal bibenzyl derivative from *Gavilea lutea*, *Natural Product Research* 32(6) (2018) 695-701.
- [42] B. Sawant, T. Khan, Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96 (2017) 1478-1490.
- [43] A. Piras, M.J. Gonçalves, J. Alves, D. Falconieri, S. Porcedda, A. Maxia, L. Salgueiro, *Ocimum tenuiflorum* L. and *Ocimum basilicum* L., two spices of Lamiaceae family with bioactive essential oils, *Industrial Crops and Products* 113 (2018) 89-97.
- [44] H. Kaur, R. Goyal, A. Bhattacharya, R. Gupta, N. Lal, B. Arora, A. Barua, R. Yadav, M. Balha, B. Ranammay, Antifungal activity of Phyto-extracts of *Piper longum*, *Aloe vera*, and *Withania somnifera* against human fungal opportunistic pathogen *Candida albicans*, *DU Journal of Undergraduate Research and Innovation* 1 (2015) 107-115.
- [45] P.T. Anastas, Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 29(3) (1999) 167-175.
- [46] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green chemistry: theory and practice*, Oxford university press Oxford 2000.
- [47] A. Gałuszka, Z.M. Migaszewski, P. Konieczka, J. Namieśnik, Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 37 (2012) 61-72.

- [48] M. de la Guardia, J. Ruzicka, Guest editorial. Towards environmentally conscientious analytical chemistry through miniaturization, containment and reagent replacement, *Analyst* 120(2) (1995) 17N-17N.
- [49] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 50 (2013) 78-84.
- [50] M. Tobiszewski, M. Marć, A. Gałuszka, J. Namieśnik, Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry, *Molecules* 20(6) (2015) 10928.
- [51] S. Armenta, F.A. Esteve-Turrillas, S. Garrigues, M.d.l. Guardia, Chapter One - Green Analytical Chemistry: The Role of Green Extraction Techniques, in: E. Ibáñez, A. Cifuentes (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier 2017, pp. 1-25.
- [52] D. Raynie, J. Driver, *Green Assessment of Chemical Methods*, 2009.
- [53] S. Garrigues, S. Armenta, M. de la Guardia, Challenges in green analytical chemistry, *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* (2011) 1-9.
- [54] K. Van Aken, L. Streckowski, L. Patiny, EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters, *Beilstein journal of organic chemistry* 2(1) (2006) 3.
- [55] M. Vian, C. Breil, L. Vernes, E. Chaabani, F. Chemat, Green solvents for sample preparation in analytical chemistry, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 5 (2017) 44-48.
- [56] T. Belwal, S.M. Ezzat, L. Rastrelli, I.D. Bhatt, M. Daglia, A. Baldi, H.P. Devkota, I.E. Orhan, J.K. Patra, G. Das, A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: trends, priorities, industrial uses and optimization strategies, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2018).
- [57] S. Uysal, A. Aktumsek, C.M.N. Picot, A. Sahan, A. Mollica, G. Zengin, M. Fawzi Mahomoodally, A comparative in vitro and in silico study of the biological potential and chemical fingerprints of *Dorcycinum pentaplyllum* subsp. *haussknechtii* using three extraction procedures, *New Journal of Chemistry* 41(22) (2017) 13952-13960.
- [58] W. Luo, C.Y. Ang, T.A. Gehring, T.M. Heinze, L.J. Lin, A. Mattia, Determination of phenolic compounds in dietary supplements and tea blends containing Echinacea by liquid chromatography with coulometric electrochemical detection, *Journal of AOAC International* 86(2) (2003) 202-8.
- [59] A. Ali, X.Y. Lim, C.H. Chong, S.H. Mah, B.L. Chua, Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from *Piper betle* using response surface methodology, *LWT* 89 (2018) 681-688.
- [60] M. Martins, I.M. Aroso, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, R. Craveiro, A. Paiva, Enhanced performance of supercritical fluid foaming of natural-based polymers by deep eutectic solvents, *AIChE Journal* 60(11) (2014) 3701-3706.
- [61] Y. Dai, J. van Spronsen, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Analytica Chimica Acta* 766 (2013) 61-68.
- [62] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2(5) (2014) 1063-1071.
- [63] F. Pena-Pereira, A. Kloskowski, J. Namiesnik, Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives, *Green Chemistry* 17(7) (2015) 3687-3705.

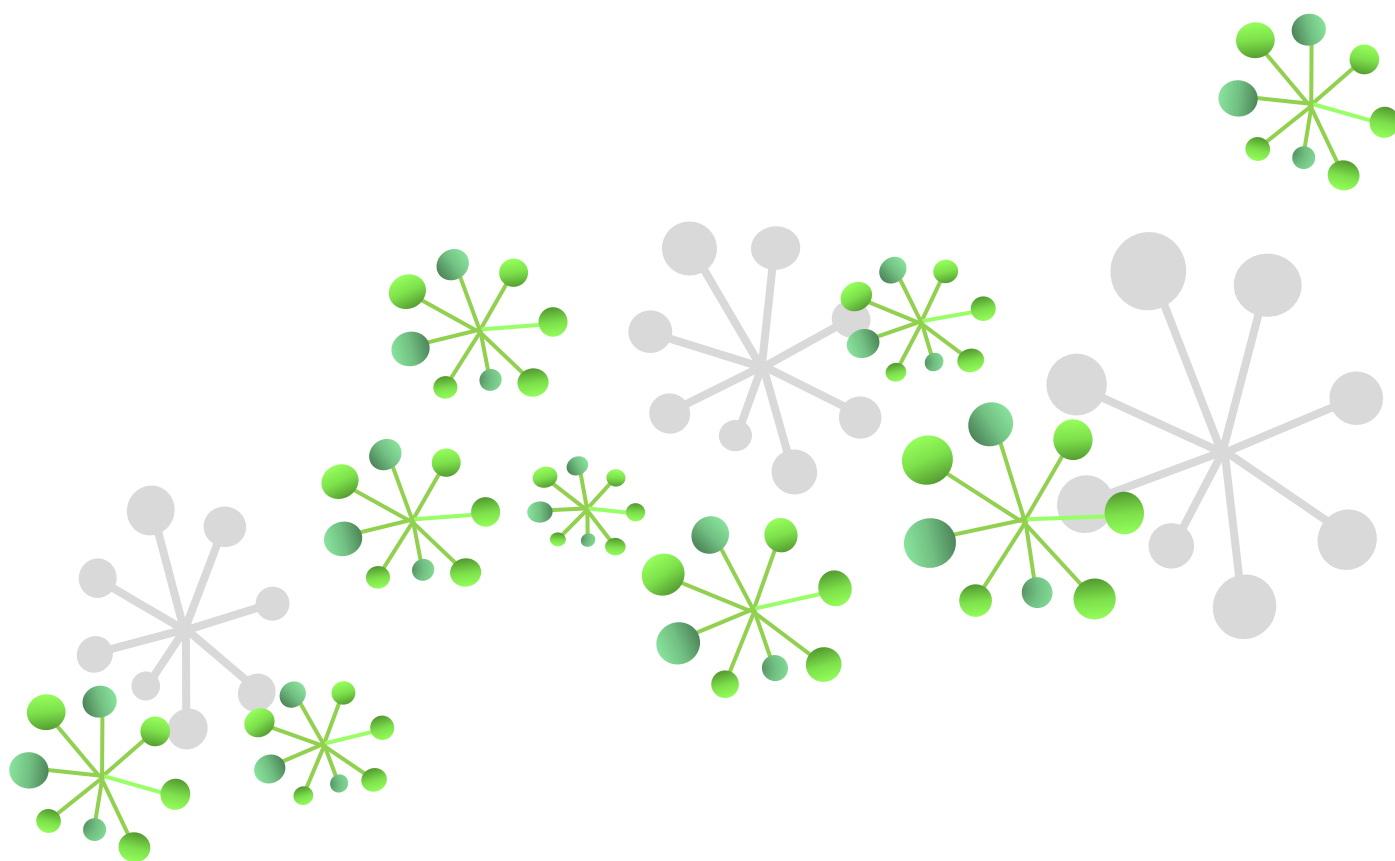
- [64] N. Azwanida, A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation, *Med. Aromat. Plants* 4(3) (2015) 3-8.
- [65] S.S. Handa, S.P.S. Khanuja, G. Longo, D.D. Rakesh, *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, INTERNATIONAL CENTRE FOR SCIENCE AND HIGH TECHNOLOGY 2008.
- [66] A.A. Elgharbawy, F.A. Riyadi, M.Z. Alam, M. Moniruzzaman, Ionic liquids as a potential solvent for lipase-catalysed reactions: A review, *Journal of Molecular Liquids* 251 (2018) 150-166.
- [67] Y. Dai, J. van Spronsen, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents, *Journal of Natural Products* 76(11) (2013) 2162-2173.
- [68] A.P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids, *Journal of the American Chemical Society* 126(29) (2004) 9142-9147.
- [69] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, *Chemical Communications* (1) (2003) 70-71.
- [70] Y.H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I.W.C.E. Arends, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?, *Plant Physiology* 156(4) (2011) 1701-1705.
- [71] M. Francisco, A.v.d. Bruinhorst, M.C. Kroon, Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): A New Generation of Designer Solvents, *Angewandte Chemie International Edition* 52(11) (2013) 3074-3085.
- [72] M. Espino, M. de los Ángeles Fernández, F.J.V. Gomez, M.F. Silva, Natural designer solvents for greening analytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016) 126-136.
- [73] M.C. Gutiérrez, M.L. Ferrer, C.R. Mateo, F. del Monte, Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures, *Langmuir* 25(10) (2009) 5509-5515.
- [74] F.J. Gomez, M. Espino, M.A. Fernández, M.F. Silva, A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents, *ChemistrySelect* 3(22) (2018) 6122-6125.
- [75] Y. Liu, J.B. Friesen, J.B. McAlpine, D.C. Lankin, S.-N. Chen, G.F. Pauli, Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives, *Journal of Natural Products* 81(3) (2018) 679-690.
- [76] Y. Dai, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications, *Food Chemistry* 187 (2015) 14-19.
- [77] Y. Huang, F. Feng, J. Jiang, Y. Qiao, T. Wu, J. Voglmeir, Z.-G. Chen, Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents, *Food chemistry* 221 (2017) 1400-1405.
- [78] M. Hayyan, M.A. Hashim, A. Hayyan, M.A. Al-Saadi, I.M. AlNashef, M.E. Mirghani, O.K. Saheed, Are deep eutectic solvents benign or toxic?, *Chemosphere* 90(7) (2013) 2193-2195.
- [79] M.d.l.Á. Fernández, M. Espino, F.J.V. Gomez, M.F. Silva, Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products, *Food Chemistry* 239 (2018) 671-678.
- [80] Y. Dai, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*), *Food Chemistry* 159 (2014) 116-121.

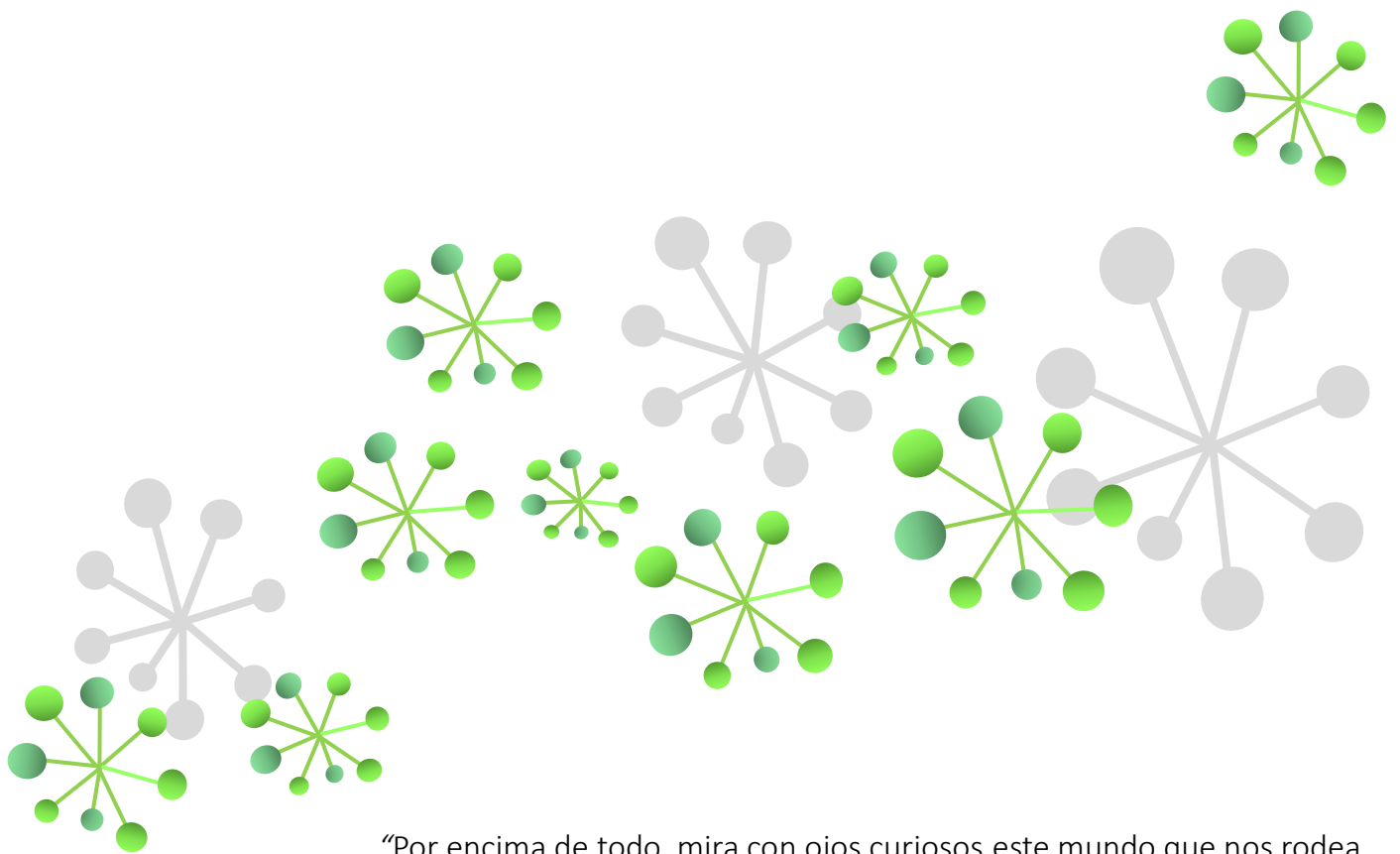
- [81] M.d.l.Á. Fernández, J. Boiteux, M. Espino, F.J.V. Gomez, M.F. Silva, Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments, *Analytica Chimica Acta* 1038 (2018) 1-10.
- [82] T. Bosiljkov, F. Dujmić, M. Cvjetko Bubalo, J. Hribar, R. Vidrih, M. Brnčić, E. Zlatic, I. Radojčić Redovniković, S. Jokić, Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins, *Food and Bioproducts Processing* 102 (2017) 195-203.
- [83] S. Bajkacz, J. Adamek, Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products, *Talanta* 168 (2017) 329-335.
- [84] M. Hamdi, M. Hayyan, A. Hayyan, J. Natesan, New Horizons in the Extraction of Bioactive Compounds using Deep Eutectic Solvents: A Review, 2017.
- [85] T. Křížek, M. Bursová, R. Horsley, M. Kuchař, P. Tůma, R. Čabala, T. Hložek, Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids, *Journal of Cleaner Production* 193 (2018) 391-396.
- [86] A.T. Sutton, K. Fraige, G.M. Leme, V. da Silva Bolzani, E.F. Hilder, A.J. Cavaleiro, R.D. Arrua, C.S. Funari, Natural deep eutectic solvents as the major mobile phase components in high-performance liquid chromatography-searching for alternatives to organic solvents, *Analytical and bioanalytical chemistry* 410(16) (2018) 3705-3713.
- [87] M. Karimi, S. Dadfarnia, A.M. Haji Shabani, Hollow fibre-supported graphene oxide nanosheets modified with a deep eutectic solvent to be used for the solid-phase microextraction of silver ions, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 98(2) (2018) 124-137.
- [88] F.J. Gomez, M. Espino, M. de Los Angeles Fernandez, J. Raba, M.F. Silva, Enhanced electrochemical detection of quercetin by Natural Deep Eutectic Solvents, *Anal Chim Acta* 936 (2016) 91-6.
- [89] Y. Dai, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *carthamus tinctorius* L, *Analytical Chemistry* 85(13) (2013) 6272-6278.
- [90] Y. Dai, E. Rozema, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents, *Journal of Chromatography A* 1434 (2016) 50-56.
- [91] Z. Wei, X. Qi, T. Li, M. Luo, W. Wang, Y. Zu, Y. Fu, Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography, *Separation and Purification Technology* 149 (2015) 237-244.
- [92] Z.-F. Wei, X.-Q. Wang, X. Peng, W. Wang, C.-J. Zhao, Y.-G. Zu, Y.-J. Fu, Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae*, *Industrial Crops and Products* 63 (2015) 175-181.
- [93] M.W. Nam, J. Zhao, M.S. Lee, J.H. Jeong, J. Lee, Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*, *Green Chemistry* 17(3) (2015) 1718-1727.
- [94] X. Liu, S. Ahlgren, H. Korthout, L.F. Salome-Abarca, L.M. Bayona, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Broad range chemical profiling of natural deep eutectic solvent extracts using a high performance thin layer chromatography-based method, *Journal of chromatography. A* 1532 (2018) 198-207.

- [95] K. Gan, W. Tang, T. Zhu, W. Li, H. Wang, X. Liu, Enhanced extraction of cleistanthol from *Phyllanthus flexuosus* by deep eutectic solvent-modified anion-exchange resin, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 39(19-20) (2016) 882-888.
- [96] B.D. Ribeiro, M.A.Z. Coelho, I.M. Marrucho, Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents, *European Food Research and Technology* 237(6) (2013) 965-975.
- [97] L. Duan, L.-L. Dou, L. Guo, P. Li, E.-H. Liu, Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4(4) (2016) 2405-2411.
- [98] K.M. Jeong, Y. Jin, D.E. Yoo, S.Y. Han, E.M. Kim, J. Lee, One-step sample preparation for convenient examination of volatile monoterpenes and phenolic compounds in peppermint leaves using deep eutectic solvents, *Food Chem* 251 (2018) 69-76.

CAPÍTULO 2

SOLVENTES EUTÉCTICOS NATURALES





“Por encima de todo, mira con ojos curiosos este mundo que nos rodea,
porque los más grandes secretos están siempre en los lugares más pequeños.
Aquellos que no creen en la magia, jamás la encontrarán”

Roald Dahl

CAPÍTULO 2

*Solventes Eutécticos Naturales***2.1 Introducción**

Los solventes eutécticos naturales (NADES) forman parte de la nueva generación de solventes sustentables. Estos constituyen una alternativa verde frente a los solventes orgánicos para la extracción de compuestos bioactivos a partir de matrices vegetales. Entre las mezclas más ampliamente estudiadas para ésta aplicación, se encuentran las combinaciones de ácidos orgánicos y azúcares o cloruro de colina (Anexo Tabla 1) [1-3]. Asimismo, la incorporación de agua al sistema eutéctico es un factor que afecta no solo a las propiedades fisicoquímicas sino también influye en el rendimiento de extracción [4]. En este sentido, resulta necesario optimizar el contenido de agua para cada combinación de solvente teniendo en cuenta la estructura química de los analitos que se busque extraer. En general, se ha reportado que bajos contenidos de agua son más adecuados para compuestos de baja polaridad; mientras que para compuestos polares se obtienen resultados satisfactorios con mayores contenidos de agua [5].

Si bien se conoce que en la red supramolecular de los NADES intervienen enlaces puente hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, aún existen escasos reportes que evalúen estas interacciones y su comportamiento en presencia de agua o de otros analitos. Entre las técnicas que se han utilizado con este fin, se encuentra la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). En particular, el estudio del “Efecto Nuclear de Overhauser” (NOE) evalúa la proximidad espacial a la que se encuentran dos moléculas, lo que permite confirmar la existencia de enlaces puente hidrógeno y fuerzas de Van der Waals [6]. Esto resulta de especial interés en el análisis estructural del sistema eutéctico para comprender su comportamiento como solventes.

Teniendo en cuenta lo expuesto, en esta primera etapa se propuso optimizar la síntesis de un solvente natural con características adecuadas para la extracción de compuestos fenólicos polares y de baja polaridad. Para ello, se evaluaron tres combinaciones de NADES

constituidos por ácidos orgánicos y azúcares (ácido láctico, ácido cítrico, fructosa, glucosa). Una vez obtenidas las combinaciones óptimas, se realizaron estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y modelado molecular, con el fin de conocer las interacciones que ocurren en estos sistemas y así poder comprender su comportamiento como solventes. Finalmente, se estudió la capacidad del NADES óptimo para estabilizar compuestos fenólicos por un periodo de 60 días a diferentes temperaturas.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Reactivos y soluciones

Para la obtención de agua ultrapura (conductividad 18.3 MΩcm) se utilizó un sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA). El metanol (MeOH) y el acetonitrilo (ACN) de grado cromatográfico se obtuvieron de J. T. Baker (USA), mientras que el ácido fórmico se obtuvo de Sintorgan (Bs. As., Argentina).

Para la preparación de los NADES se utilizó: glucosa anhidra, ácido cítrico anhidro, D (-) fructosa, L (+) ácido láctico obtenidos de Biopack (Bs.As., Argentina). Se empleó un agitador magnético con control de temperatura Fisatom (model 752A, Brasil).

Estándares analíticos: 3-hidroxitirosol, p-ácido cumárico, apigenina, oleuropeína, ácido cinámico y ácido cafeico fueron obtenidos de Sigma Aldrich. Quercetina dihidrato y ácido trans-ferúlico se obtuvieron de Alfa Aesar y Flukaand SAFC, respectivamente.

Las soluciones madres de los estándares se prepararon disolviendo cada fenol en metanol grado HPLC para obtener una concentración final de 1000 mg L⁻¹. Las soluciones resultantes se almacenaron a 4 °C en frascos de vidrios color caramelo. Las soluciones de trabajo de diferentes concentraciones se prepararon diariamente por dilución de las cantidades apropiadas de soluciones madre en agua, metanol o NADES. Antes de su uso, todas las soluciones se filtraron a través de filtros de nylon 0,22 µm.

Para los análisis por RMN se utilizó: óxido de deuterio (99,9 %) y 3-sal sódica del ácido trimetilsililpropanoico 2,2,3,3-d₄ (TMSP, 98 % grado deuterio) obtenidos de Sigma-Aldrich.

2.2.2 Optimización de la preparación de NADES

Las combinaciones de NADES seleccionadas para la optimización fueron: ácido láctico-glucosa, (5:1, LGH); ácido cítrico-glucosa (1:1, CGH) y fructosa-ácido cítrico (1:1, FCH). Se prepararon siguiendo el método de agitación y calentamiento propuesto por Dai *et al.* [7]; la mezcla de componentes se colocó en un vial color caramelo de 20 mL y posteriormente fue agitada y calentada en un agitador magnético con control de temperatura por 60 minutos (Figura 2.1).

La preparación de los NADES se optimizó utilizando herramientas quimiométricas con el fin de determinar tanto la combinación más apropiada (LGH, FCH, CGH); como también los valores óptimos de: temperatura de síntesis, porcentaje de agua y concentración de buffer. Para determinar cómo influyen estos parámetros, el efecto de ellos sobre los NADES se evaluó en términos de estabilidad y densidad en tres niveles (-1, 0 y +1). La densidad ($q_s = m_s/V_s$) se calculó pesando un volumen conocido de cada NADES (1 mL). Finalmente, la estabilidad del sistema eutéctico se evaluó observando que no se forme precipitado y que no presenten separación de fases. Esta fue monitoreada cada 24 horas, y los solventes se consideraron estables cuando la mezcla permaneció en fase líquida por un periodo de 5 días.



Figura 2.1. Los Solventes eutécticos naturales se prepararon siguiendo la metodología de agitación y calentamiento [7].

2.2.2.1 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para optimizar la preparación de los NADES, se aplicó un Diseño Central Compuesto y Metodología de Superficie Respuesta (RSM), utilizando el software Design Expert, v 7.1 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Los resultados se validaron estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $p = 0,05$. La adecuación del modelo se evaluó por medio del coeficiente de determinación (R^2) y el p valor del modelo. Asimismo, se establecieron modelos matemáticos que permitieran describir la influencia de los parámetros individualmente y/o de las interacciones entre los parámetros en cada respuesta investigada. Los gráficos de superficie-respuesta se realizaron con el mismo software, y se representaron seleccionando la función de dos factores, dejando el tercero constante. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas Statgraphics Centurion XV v15.2.06 y GraphPad Prism v5.01. Todos los datos se reportaron como la media \pm SD para tres réplicas.

2.2.3 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

2.2.3.1 Efecto Nuclear de Overhauser (NOE)

Con el propósito de evaluar la proximidad espacial entre los componentes de los NADES y el efecto que la dilución genera en las interacciones intermoleculares se estudió el Efecto Nuclear de Overhauser (NOE). Para ello, se prepararon soluciones acuosas de LGH, CGH y FCH a distintas concentraciones (10, 20, 30, 40 y 50 % v/v de NADES en agua) agregando la cantidad correspondiente de agua D_2O y H_2O . Además, con el fin de estudiar el comportamiento de los enlaces de un sistema eutéctico en presencia de compuestos fenólicos, se seleccionó el solvente optimizado en la Sección 2.2.2 y quercetina. Se prepararon soluciones del analito a 10 mg mL^{-1} para cada dilución de LGH.

Se utilizó un espectrómetro Bruker Avance 300 MHz, con una frecuencia y una resolución de fase de 0,005 Hz y 0,006 ° respectivamente. El espectrómetro está compuesto por un autosampler con una sonda inteligente de 5mm de diámetro interno con ATMA (*Automatic*

Tuning Matching) y la temperatura se mantuvo estable a 300 K. Los ensayos se realizaron en triplicado. El D₂O se utilizó como campo de frecuencia para bloquear la señal, TMSP se empleó como referencia interna de los corrimientos químicos de ¹H. Para realizar las supresiones de las señales del agua se usó noesygppr-1d (*Bruker standard pulse sequence*). Cada espectro se registró con 128 *scans* y 48 mil datos. La ventana espectral se ajustó a 15,0084 ppm (4504,504 Hz) con un tiempo de adquisición de 4,0 s por *scan*. Los espectros del NOE se llevaron a cabo irradiando la señal de un protón particular bajo estudio, con un ancho espectral entre 25 y 45 Hz (0,08 and 0,15 ppm, respectivamente), dependiendo de la señal. Posteriormente, la diferencia espectral NOE se calculó restando el espectro original de ¹H RMN de los correspondientes NADES a los espectros irradiados de ¹H RMN.

2.2.3.2 Métodos computacionales

Inicialmente, el modelado molecular de los sistemas comenzó con búsquedas conformacionales que resultaron en un gran número de geometrías (hasta 100) de los constituyentes de los NADES (glucosa, fructosa y los ácidos láctico y cítrico); aplicando el método de mecanismo molecular MM+ usando el módulo de búsqueda conformacional de HyperChem. Posteriormente, las conformaciones más estables se optimizaron con función de correlación M06-2X [8] acoplado con 6-31+G (d,p) set de bases usando el programa Gaussian 09W [9].

En este trabajo, las relaciones estequiométricas entre ácidos orgánicos y carbohidratos utilizadas fueron 5:1. Cuando se modelan sistemas de estos tamaños (más de 25 átomos pesados), el tiempo de cálculo se vuelve excesivamente largo para un diseño lógico. Es por esto, que el modelo elegido para cada sistema bajo estudio consistió en un dímero formado por una molécula de azúcar y una molécula de ácido orgánico.

Si bien un modelo dímero no puede describir completamente todas las posibles interacciones intermoleculares de estabilización entre los componentes de los NADES, se seleccionó este modelo simplificado con el fin de obtener un rápido *screening* de los sistemas para conocer las interacciones entre los constituyentes. Para modelar las interacciones

intermoleculares en los NADES se ubicaron las conformaciones más estables de los constituyentes a una distancia aproximada de 3,5 Å y se reoptimizó la geometría del sistema en agua ($\epsilon=78,3553$) mediante el método M06-2X/6-31+G (d, p). Para esta optimización de solventes, se utilizó el modelo *Solvation Model based on Density* (SMD) [10] del método *Self-Consistent Reaction Field* (SCRF) [11]. Finalmente, se realizaron cálculos de frecuencia para verificar la naturaleza de los puntos estacionarios (energía mínima global) por la ausencia de frecuencias imaginarias en todas las estructuras optimizadas. Con el objetivo de evaluar las interacciones más importantes en los sistemas modelados, se evaluaron los cálculos de enlace orbital natural (NBO) así como también se analizaron los índices Wiberg [12].

2.2.4 Monitoreo de la estabilidad por cromatografía líquida de alta performance

Con el fin de conocer la capacidad de los NADES para estabilizar compuestos bioactivos, se evaluó el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la estabilidad de ocho compuestos fenólicos en el NADES optimizado en la Sección 2.2.2, y sus estabilidades se compararon con las correspondientes a los solventes tradicionales H₂O y MeOH. Los compuestos seleccionados fueron: oleuropeína, 3-hidroxitirosol, los ácidos: cumárico, cinámico, cafeico y ferúlico, quercetina y apigenina.

Se prepararon 9 soluciones para cada solvente (NADES, MeOH y H₂O) conteniendo los 8 estándares a una concentración de 10 mg mL⁻¹. Se almacenaron tres a temperatura ambiente (25 °C), tres se almacenaron en heladera a 4 °C y otras tres en freezer (-18 °C). La estabilidad se evaluó monitoreando el área cromatográfica al inicio del ensayo y luego de 7,14, 30 y 60 días de almacenamiento.

La determinación de compuestos fenólicos mediante HPLC-MWD, se realizó utilizando un cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 (Dionex Softron GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc., Germering, Germany). Éste consiste de una unidad desgasificadora de vacío, inyección automática vía autosampler, bomba cuaternaria, horno termostatzado para controlar la temperatura de la columna cromatográfica y sistema de detección Dionex-MWD 3000 (RS).

El software Chromeleon 7.1 se utilizó tanto para el control de los parámetros cromatográficos, como para el procesamiento de los datos obtenidos.

Para la separación se utilizó una columna Zorbax SB-Aq (4,6 x 150 mm, 5 μm ; Agilent Technologies). La fase móvil utilizada fue H_2O acidificada con 0,1 % ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B). El flujo de fase móvil fue de 1 mL min^{-1} , la temperatura de la columna de 30°C y el volumen de inyección de $5 \mu\text{L}$. En la Tabla 2.1 se muestra el gradiente utilizado para la separación de los compuestos fenólicos.

Tabla 2.1. Gradiente utilizado para la separación de fenoles por HPLC-MWD.

Tiempo (min)	Acetonitrilo (% v/v)
0-2,7	5
2,7-10,7	30
10,7-11	32
11-15	40
15-15,5	50
15,5-16	50
16-16,5	30
16,5-17	15
17-17,5	5
17,5-18	5

La identificación de los compuestos fenólicos en los distintos solventes estudiados se basó en la comparación de los tiempos de retención (t_R) con los obtenidos para soluciones patrones de cada analito evaluado. La cuantificación se realizó utilizando los valores de absorbancias de los picos detectados (área bajo la curva), calculando la concentración mediante la curva de calibración de cada uno de estándares. Los cromatogramas se registraron a 254 (Ole), 280 (Tyr, Cin), 320 (Cou, Caf, Fer, Api) y 370 nm (Quer).

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Optimización de la preparación de NADES

Para la optimización de variables, la Metodología de Superficie Respuesta (MSR) presenta numerosas ventajas frente a la clásica optimización *one-at-a-time*. Principalmente, permite evaluar la interacción entre las variables bajo estudio, disminuyendo el número de experimentos [13]. MSR, ha sido ampliamente estudiada y es ya una metodología consolidada en la optimización de procedimientos analíticos. En este contexto, para determinar las condiciones experimentales más adecuadas en la preparación de NADES se utilizó un Diseño Central Compuesto (DCC) y MSR. El propósito de esta optimización fue obtener los valores óptimos de temperatura de síntesis y porcentaje de agua y concentración de buffer; así como también la combinación más apropiada de NADES para la extracción de compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales. Teniendo en cuenta la naturaleza química de los compuestos bajo estudio así como también las matrices involucradas; los parámetros estabilidad y densidad fueron seleccionados para evaluar los parámetros optimizados.

Para este diseño se evaluaron combinaciones de azúcares - ácidos orgánicos- agua (LGH, CGH y FCH). Las combinaciones se seleccionaron teniendo en cuenta que, en el comportamiento eutéctico, la naturaleza de las interacciones que ocurren depende del tipo de componentes, interviniendo principalmente interacciones por puente hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. La presencia de grupos hidroxilos y carboxilos permite una mayor formación de interacciones puente hidrógeno, aumentando la estabilidad de éstos líquidos. Además, esta elección se basó en resultados obtenidos previamente por otros autores (Anexo Tabla 1), priorizando metabolitos que tuvieran bajo costo, amplia disponibilidad y principalmente que sean usados como aditivos e ingredientes en las industrias alimenticia y farmacéutica [3, 14].

Los intervalos de temperatura y el contenido de agua evaluados, se seleccionaron en base a reportes previos. Las temperaturas más ampliamente usadas son 50 y 80 °C, por lo cual en

este trabajo se evaluó el intervalo entre 40 y 80 °C. El contenido de agua se estudió entre 0 y 15 %; los valores óptimos de este parámetro son variables y dependen específicamente de cada combinación y de la aplicación [2, 7, 15, 16]. La adición de buffer se incluyó en el diseño debido a que los compuestos fenólicos muestran mayor estabilidad en condiciones ácidas [17].

En la Tabla 2.2 se muestra el diseño que consistió en sesenta y seis experimentos divididos en tres bloques (tres días consecutivos). Se incluyeron ocho réplicas de punto central, ocho puntos factoriales y seis puntos axiales para los NADES testeados. Las variables respuestas observadas fueron estabilidad (hs) y densidad (g mL^{-1}).

Tabla 2.2. Datos experimentales de las respuestas evaluadas en la síntesis de NADES utilizando Diseño Central Compuesto (DCC).

Corrida	Bloque	NADES	Factores			Respuestas		
			agua (%)	ácido fórmico (%)	T (°C)	estabilidad (hs)	pH	densidad (g mL^{-1})
1	1	LGH	7,5	0,05	60	120	2	1,248
2	1	LGH	0	0,10	80	120	1	1,257
3	1	FCH	0	0,00	40	0	3	1,600
4	1	FCH	15	0,10	40	72	2	1,418
5	1	FCH	0	0,10	80	120	2	1,580
6	1	CGH	7,5	0,05	60	72	2	1,488
7	1	LGH	7,5	0,05	60	120	2	1,241
8	1	CGH	0	0,10	80	24	2	1,498
9	1	FCH	15	0,00	80	120	3	1,398

10	1	CGH	0	0,00	40	0	3	1,550
11	1	LGH	7,5	0,05	60	120	2	1,240
12	1	CGH	7,5	0,05	60	72	2	1,485
13	1	LGH	15	0,00	80	120	3	1,221
14	1	FCH	7,5	0,05	60	120	3	1,486
15	1	CGH	15	0,10	40	0	2	1,430
16	1	CGH	7,5	0,05	60	72	2	1,491
17	1	LGH	15	0,10	40	120	1	1,218
18	1	LGH	0	0,00	40	96	3	1,250
19	1	FCH	7,5	0,05	60	120	3	1,483
20	1	FCH	7,5	0,05	60	120	3	1,487
21	1	CGH	15	0,05	80	120	3	1,400
22	2	CGH	15	0,00	40	0	3	1,410
23	2	CGH	7,5	0,05	60	72	2	1,490
24	2	LGH	7,5	0,05	60	120	2	1,242
25	2	LGH	7,5	0,05	60	120	2	1,243
26	2	LGH	15	0,00	40	120	3	1,215
27	2	LGH	0	0,10	40	96	1	1,253
28	2	CGH	0	0,10	40	0	2	1,515
29	2	FCH	7,5	0,05	60	120	3	1,488
30	2	CGH	7,5	0,05	60	72	2	1,489

31	2	FCH	15	0,10	80	120	2	1,379
32	2	LGH	0	0,00	80	120	3	1,251
33	2	CGH	0	0,00	80	24	3	1,503
34	2	LGH	7,5	0,05	60	120	2	1,244
35	2	FCH	7,5	0,05	60	120	3	1,478
36	2	FCH	0	0,00	80	120	3	1,590
37	2	CGH	15	0,10	80	120	2	1,365
38	2	FCH	15	0,00	40	72	3	1,420
39	2	LGH	15	0,10	80	120	1	1,225
40	2	FCH	7,5	0,05	60	120	3	1,480
41	2	CGH	7,5	0,05	60	72	3	1,487
42	2	FCH	0	0,10	40	0	2	1,630
43	3	FCH	7,5	0,00	60	120	3	1,482
44	3	LGH	7,5	0,05	60	120	2	1,240
45	3	LGH	7,5	0,13	60	120	1	1,235
46	3	CGH	20,1	0,05	60	120	2	1,362
47	3	FCH	0	0,05	60	24	3	1,600
48	3	FCH	7,5	0,05	60	120	3	1,478
49	3	CGH	7,5	0,05	26	0	2	1,530
50	3	LGH	7,5	0,05	94	120	2	1,230
51	3	CGH	7,5	0,05	60	72	2	1,491

52	3	LGH	20,1	0,05	60	120	2	1,210
53	3	FCH	7,5	0,05	94	120	2	1,410
54	3	CGH	0	0,05	60	0	2	1,510
55	3	LGH	7,5	0,05	26	120	2	1,251
56	3	LGH	7,5	0,05	60	120	2	1,247
57	3	FCH	7,5	0,05	60	120	3	1,489
58	3	CGH	7,5	0,05	94	120	2	1,435
59	3	FCH	7,5	0,13	60	120	2	1,471
60	3	LGH	0	0,05	60	120	2	1,252
61	3	FCH	7,5	0,05	26	0	3	1,530
62	3	LGH	7,5	0,00	60	120	3	1,239
63	3	CGH	7,5	0,05	60	72	2	1,488
64	3	CGH	7,5	0,00	60	24	3	1,482
65	3	FCH	20,1	0,05	60	120	2	1,260
66	3	CGH	7,5	0,13	60	72	1	1,478

T: temperatura

Analizando los resultados obtenidos, CGH y FCH presentaron mayores valores de densidad ($1,4 - 1,6 \text{ g mL}^{-1}$) que los determinados para LGH ($1,2 - 1,25 \text{ g mL}^{-1}$). Elevados valores de este parámetro pueden causar errores severos durante el paso de inyección en HPLC, así como también pueden disminuir la eficiencia de extracción dificultando la transferencia de analitos desde la matriz. Por otro lado, se pudo observar que LGH fue el único solvente que logró ser preparado a menores temperaturas (40°C), implicando un

menor costo energético. Por lo expuesto, la combinación LGH se seleccionó para las optimizaciones posteriores.

Los modelos que mejor explicaron el comportamiento de las respuestas de estabilidad, pH y densidad fueron el 2FI, cuadrático y lineal respectivamente (Tabla 2.3). Los R² obtenidos indican que el modelo es satisfactorio para fines predictivos. El p-valor para la falta de ajuste del modelo lineal fue no significativo (p 0,1070), indicando que este modelo se ajusta a los datos experimentales.

Tabla 2.3. Resultado del análisis de la varianza para los modelos seleccionados.

Respuesta	Modelo	p-valor*	p-valor*	R ² adj.
		Modelo	Falta de ajuste	
estabilidad	2FI	0,0005	._**	0,597
pH	Cuadrático	<0,0001	._**	0,999
densidad	Linear	<0,0001	0,1070	0,825

*Considerado significativo cuando p-valor < 0,05

**No calculado: el tipo de variable no permite el cálculo del error puro.

Los modelos fueron expresados mediante las siguientes ecuaciones (Eqs. 1-3):

$$\text{Estabilidad} = 84,98 + 2,94A + 0,47T - 0,04AT \quad (1)$$

$$(pH + 0,03)^{1,78} = 7,19 - 84,97B + 234,95B \quad (2)$$

$$\text{Densidad} = 1,25 - 2,19e^{-3} A \quad (3)$$

donde A: agua, T: temperatura y B: concentración de buffer.

Analizando las ecuaciones, se concluye que el contenido de agua afectó tanto a la estabilidad como a la densidad (Eq. 1 y 3). El contenido de ácido fórmico influyó en el pH de LGH (Eq. 2), mientras que la temperatura afectó la estabilidad del solvente (Eq. 1).

Para la optimización simultánea de las respuestas analizadas (densidad y estabilidad) se utilizó la función de deseabilidad (Figura 2.2). El criterio elegido para LGH, fue minimizar

densidad y pH y maximizar la estabilidad. Como se muestra en la Figura 2.2, la función deseabilidad aumenta cuando aumenta el contenido de agua y de ácido fórmico. Las condiciones experimentales óptimas ($D = 0,854$) para la síntesis de LGH (ácido láctico: glucosa, 5:1) fueron 40 °C, 15 % de agua y 0,1 % (v/v) de ácido fórmico.

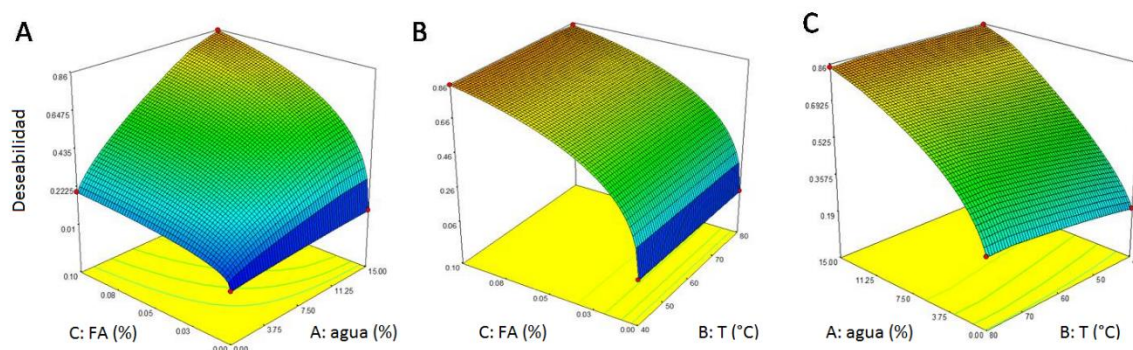


Figura 2.2. Gráficos de superficie respuesta (función deseabilidad) para la síntesis de LGH cuando se optimizó: acidificación vs. porcentaje de agua (A), acidificación vs. temperatura (B) y temperatura vs. porcentaje de agua (C); en todos los casos la tercera variable se mantuvo constante en el valor óptimo.

Con el fin de validar los resultados se realizaron tres experimentos adicionales empleando las condiciones óptimas. Los resultados de esta validación confirmaron las condiciones óptimas de síntesis.

Posteriormente, se prepararon las combinaciones óptimas LGH, CGH y FCH sin el agregado de ácido fórmico. Se compararon los parámetros fisicoquímicos, no observándose diferencias significativas entre ellos. Por lo tanto, se decidió trabajar con LGH sin el agregado de ácido fórmico para estudios futuros.

2.3.2 Efecto Nuclear Overhauser

Se evaluó el Efecto nuclear Overhauser (NOE) con el propósito de determinar la proximidad espacial entre los componentes de los NADES optimizados (LGH, CGH y FCH). Si

bien LGH resultó ser el solvente con características más adecuadas como medio de extracción, se decidió estudiar la estructura de las tres combinaciones con el objetivo de realizar estudios estructurales comparativos.

Con este fin, se realizó en primer lugar un análisis por ^1H RMN de modo de seleccionar los átomos de hidrógeno adecuados para los experimentos de NOE. Se buscaron los protones con desplazamientos químicos que se diferenciaron lo suficiente (al menos en 0,3 ppm) de los protones remanentes en las otras moléculas que conforman la mezcla. Este requerimiento se debe a que el hidrógeno seleccionado para la irradiación debe responder en una región aislada del espectro, para evitar que otros protones alcancen la magnetización, que llevaría a errores en el análisis.

Como se puede observar en la Figura 2.3, ambas señales del ácido láctico (H-2 y H-3) aparecen claramente separadas de las señales de glucosa en LGH. En el caso de FCH y CGH, el doblete-doblete del ácido cítrico (H- 2a, b y H-4a, b) aparece separado de las señales de los azúcares. Entonces, la señal seleccionada para los experimentos de NOE en los NADES FCH y CGH que contienen ácido cítrico fue el doblete a $\delta=2.7$ ppm (primer doblete del doblete-doblete); mientras que para LGH, las dos señales seleccionadas para la irradiación fueron el cuarteto a $\delta= 4.10$ ppm y el doblete a $\delta= 1.20$ ppm del ácido láctico (H-2 y H-3, respectivamente). Además, todos los espectros de ^1H RMN fueron irradiados en la región central de las fracciones de azúcares, correspondientes a los corrimientos químicos de los protones más carbinólicos (por ejemplo, $\delta= 3.30$ ppm para glucosa y $\delta= 3,60$ ppm para fructosa).

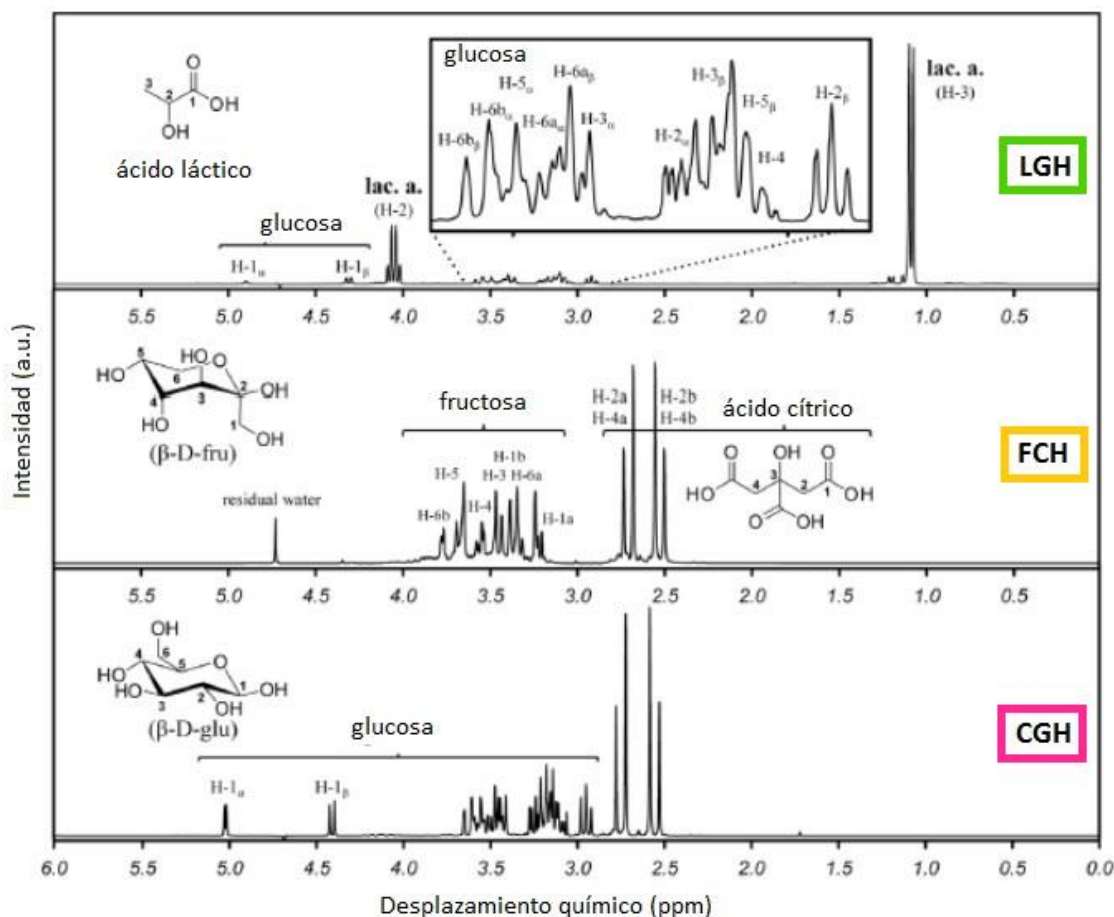


Figura 2.3. Espectro de ^1H RMN para cada NADES bajo estudio. LGH: ácido láctico-glucosa, FCH: fructosa-ácido cítrico, CGH: ácido cítrico-glucosa. Lac. a.: ácido láctico, β -D-fru: β -D-fructopiranos, β -D-glu: β -D-glucopiranos.

Las estructuras de los principales isómeros de D-fructosa y D-glucosa también se muestran en la Figura 2.3. En el equilibrio en agua β -D-fructopiranos (Figura 2.3, β -D-fru) es el tautómero predominante de D-fructosa, seguido por β -D-fructofuranosa y luego α -D-fructofuranosa (69,6 %, 21,1 % y 5,7 % respectivamente) [18, 19].

En el caso de D-glucosa, las formas piranósicas de D-glucosa fueron las predominantes (c.a. 99 % en una relación 36:63 para α : β anómeros respectivamente) [20]. Si bien el mayor isómero de D-glucosa en agua es β -D-glucopiranos (Fig. 1, β -D-glu), la integración de las señales anoméricas de H-1 (H-1 $_{\alpha}$ and H-1 $_{\beta}$) alcanzaron una relación cercana a 1:1 entre los

anómeros de glucopiranososa para la mezcla de CGH. En éste último caso, la formación del NADES indica la alteración el equilibrio original.

En la Figura 2.4 se muestran los NOE más satisfactorios encontrados para los tres NADES bajo estudio. En LGH, cuando ambas señales del ácido láctico fueron irradiadas, el NOE más intenso se obtuvo para el H-3 del ácido láctico. Como puede observarse en la Figura 2.4 A, la existencia de NOE se confirmó por la presencia de señales correspondientes a la mayoría de los hidrógenos carbinólicos de la glucosa en el espectro de RMN de ^1H (H-2, H-3, H-5 and H-6). Además, la irradiación en la región central de los protones de glucosa (H-3, H-5, and H-6) condujo a la aparición de ambas señales H-2 y H-3 del ácido láctico.

En el caso de FCH, cuando se irradió la señal seleccionada ($\delta = 2,7$ ppm), se observó la existencia del efecto NOE en el espectro de RMN de ^1H , por la presencia de señales correspondientes a la mayoría de los hidrógenos carbinólicos de la fructosa (Figura 2.4 B; H-1, H-3, H-4, H-5, y H-6).

Finalmente, en la Figura 2.4 C se muestra el NOE generado cuando se irradiaron los protones seleccionados de CGH. Para la señal a $\delta = 2,7$ ppm, la mayoría de los hidrógenos carbinólicos de glucosa (H-2, H-3, H-5 and H-6) aparecen en el espectro de RMN de ^1H . Además, como en este caso la región del espectro de NMR de ^1H para los protones unidos a carbonos anoméricos (H-1 β) es claro, también fue posible observar el efecto NOE en éstas señales. Asimismo, un NOE recíproco fue detectado cuando se irradió la región central de los protones de glucosa.

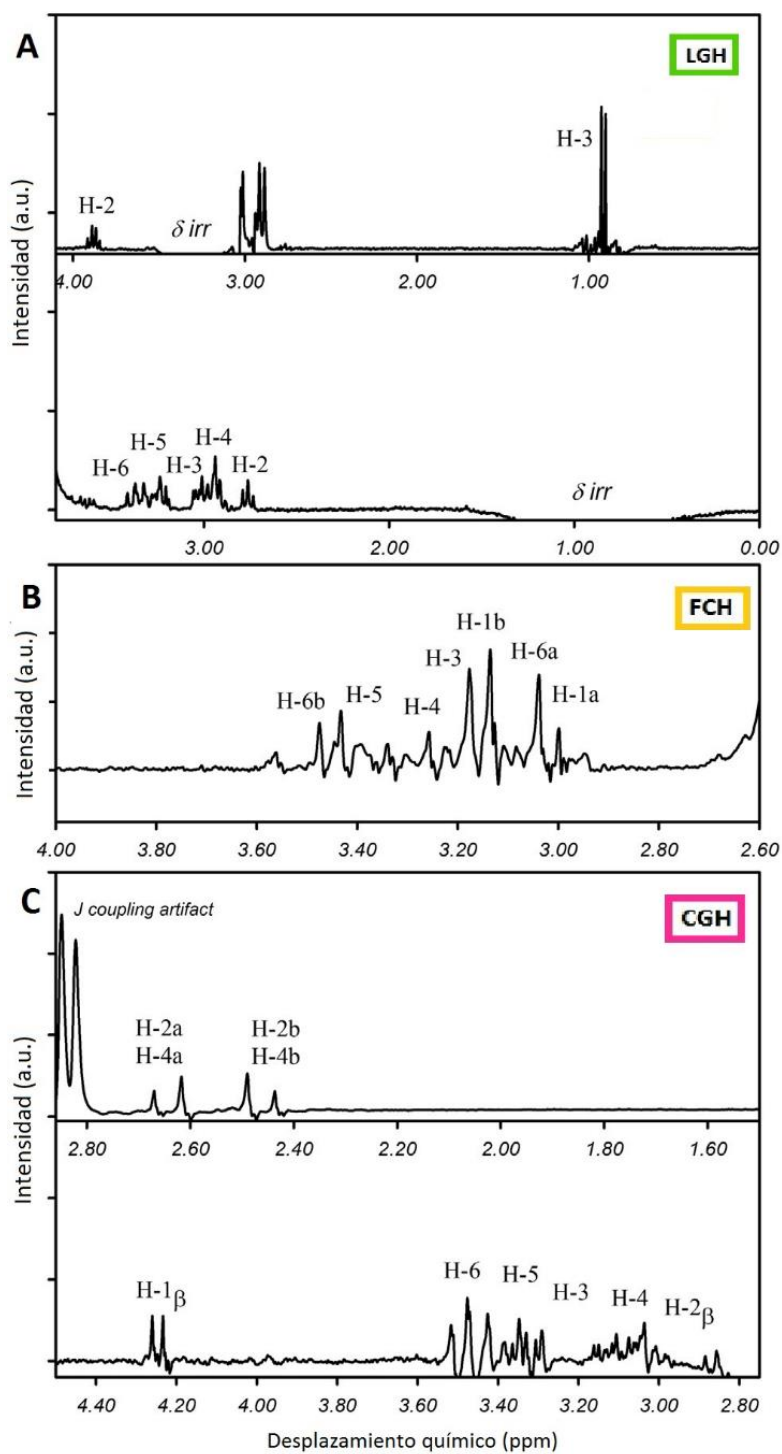


Figura 2.4. NOE registrados de los espectros de ^1H RMN de los NADES bajo estudio; a) señales a $\delta=1.2$ ppm y $\delta=3.6$ ppm en LGH; b) señales a $\delta=2.7$ ppm en FCH y c) señales a $\delta=2.7$ ppm y $\delta=3.3$ ppm en CGH.

Sin embargo, se debe considerar que las intensidades de NOE compiten con el proceso de relajación que devuelve a todos los protones a su estado de equilibrio. El índice del proceso de relajación se determina monitoreando la velocidad de rotación completa de una molécula en solución. Debido a que moléculas pequeñas relajan más lentamente que las más grandes, requieren mayores tiempos de mezcla para capturar el NOE más intenso. Para moléculas pequeñas en solventes no viscosos, el tiempo óptimo de mezcla en un ensayo de NOE puede ser hasta 1,5 s, y para moléculas grandes en solventes más viscosos el mejor tiempo puede ser de 0,15 s. Una vez obtenidos los resultados preliminares de la existencia de NOE en los NADES, se estudió dicho efecto a tres tiempos de mezcla 0,15; 0,7 y 1,5 s; con el fin de estudiar la influencia de éste parámetro en la sensibilidad del fenómeno de NOE.

De acuerdo a la viscosidad de los NADES, sus constituyentes en agua están más cercanos al segundo sistema descrito previamente, aunque cuando el parámetro fue optimizado, el mejor efecto NOE se observó en el tiempo de mezcla intermedio de 0,7 s. Por lo tanto, para el resto de los estudios realizados se seleccionó este tiempo de mezcla.

2.3.2.1. Efecto de la dilución

Una vez confirmada la proximidad espacial entre los componentes de los NADES y con el fin de estudiar cómo afecta el agregado de agua en las interacciones intermoleculares, se analizaron diferentes diluciones de LGH, CGH y FCH usando los espectros de NOE de ^1H de RMN.

El espectro de ^1H de RMN registrado para las diluciones de LGH se presenta en la Figura 2.5. Cuando la señal de H-3 ($\delta = 1,30$ ppm) del ácido láctico fue irradiado (Figura 2.5 A), 10 % LGH fue la única dilución que no presentó NOE, indicando la existencia de un valor límite entre 10 % y 20 % en el cuál las interacciones intermoleculares entre glucosa y ácido láctico se rompen. Además, un comportamiento similar se observó cuando la región central de la glucosa fue irradiada ($\delta = 3,30$ ppm, Figura 2.5 B); el efecto NOE se observó desde la dilución 20 % LGH.

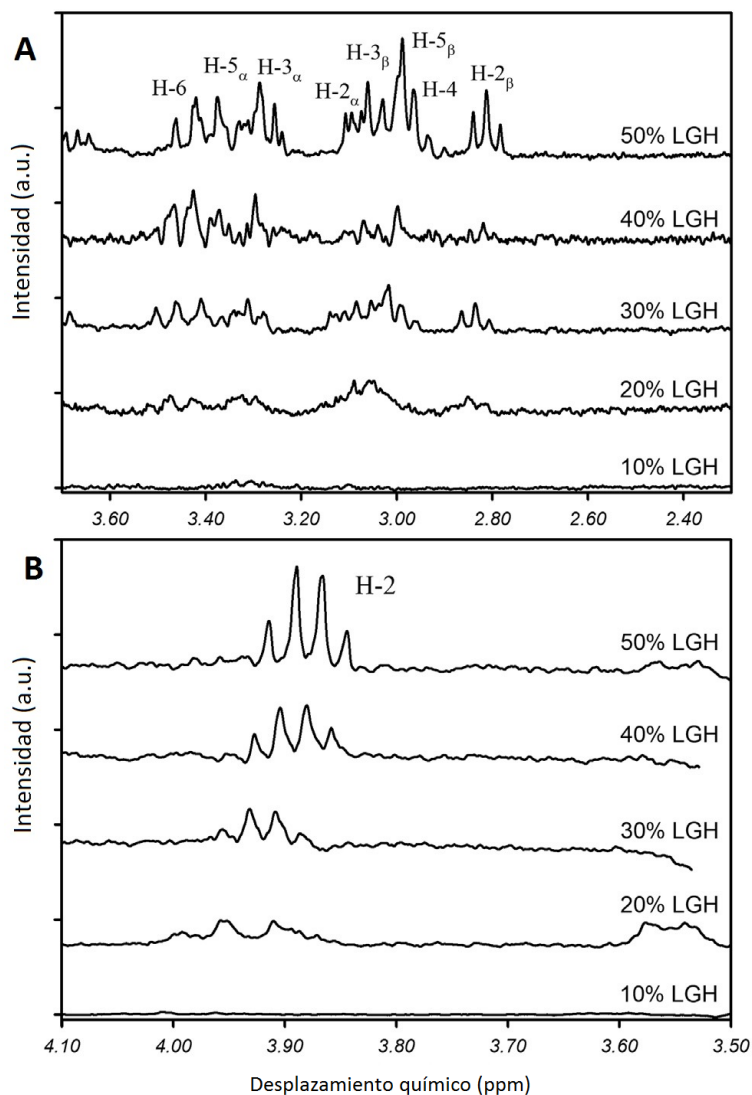


Figura 2.5. Efectos NOE registrados para diluciones de LGH. A: Señales a $\delta = 1,3$ ppm; B: Señales a $\delta = 3,6$ ppm.

El efecto NOE registrado para las diluciones de FCH se muestra en el espectro de ^1H de RMN en la Figura 2.6. En este caso, cuando la señal a $\delta = 2,7$ ppm (H-2 y H-4) del ácido cítrico fue irradiada, 30 %, 40 % y 50 % FCH presentaron efecto NOE. Por lo que esto indica que el valor límite en el que las interacciones moleculares disminuyen está entre las diluciones 20 % y 30 %.

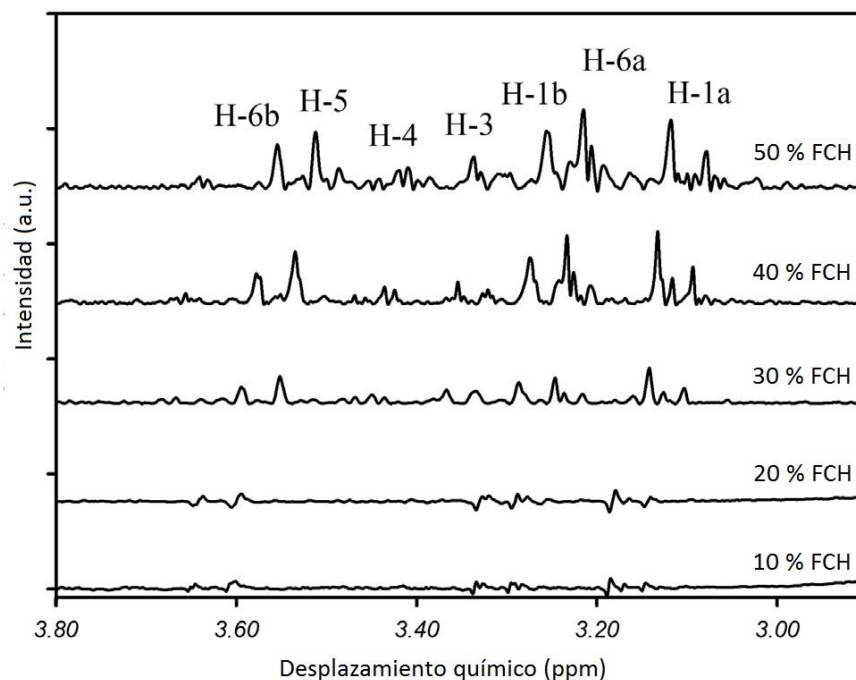


Figura 2.6. Efectos NOE registrados para las diluciones de FCH cuando se irradia el protón a $\delta = 2,7$ ppm.

Finalmente, los espectros de las diluciones de CGH se muestran en la Figura 2.7. Al irradiar la señal a $\delta = 2,7$ ppm del ácido cítrico (Figura 2.7 A) las diluciones a partir de 40 % CGH presentaron efecto NOE, siendo la mayoría de las señales de los hidrógenos carbinólicos de la glucosa (H-1, H-2, H-3, H-4 and H-5). Además, cuando la región de los protones de glucosa fueron irradiados a $\delta = 3,3$ ppm (Figura 2.7 B), se observó un efecto NOE para 40 % y 50 % CGH debido a la presencia de la señal doblete-doblete del ácido cítrico.

Como puede esperarse en ^1H RMN, cuando variamos la concentración, el efecto de la dilución produce también corrimientos químicos con mayores valores de δ . Por esto, en las Figuras 2.4, 2.5 y 2.6, puede observarse una pequeña diferencia en la posición para la misma señal entre los espectros.

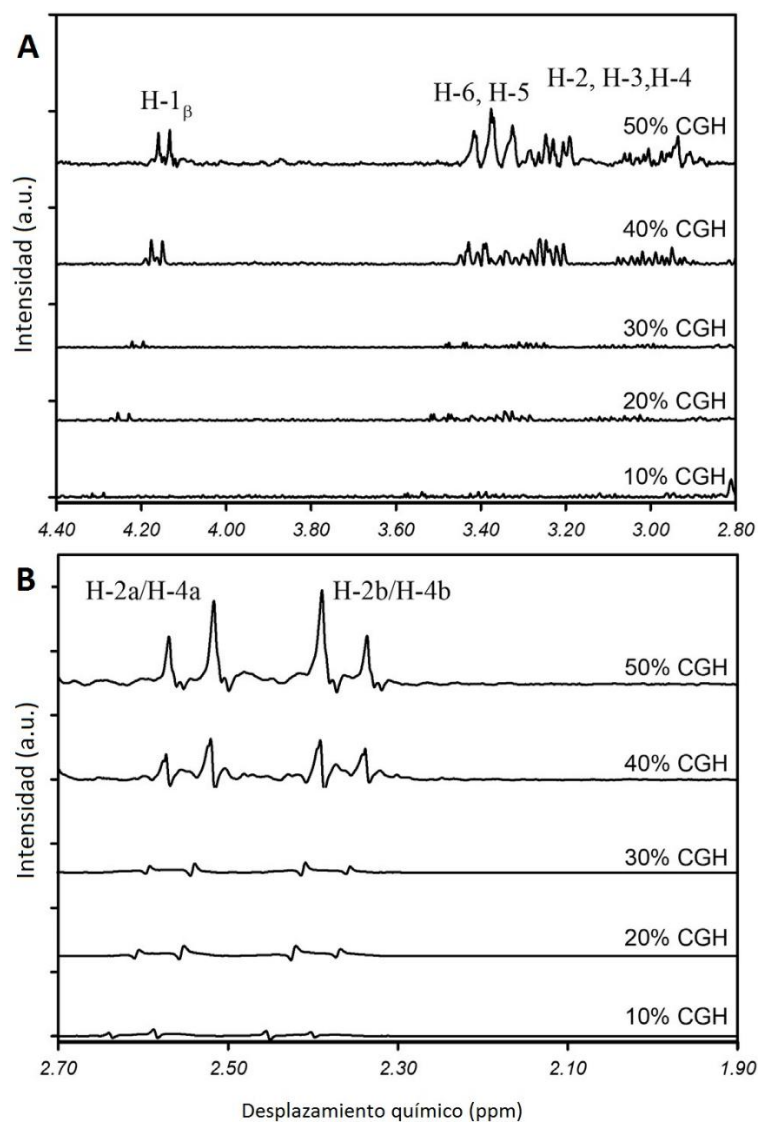


Figura 2.7. Efectos NOE registrados para las diluciones de CGH; A: señal del protón irradiado a $\delta = 2,7$ ppm; B: señal a $\delta = 3,3$ ppm.

En conclusión, las diluciones de LGH, FCH y CGH analizadas por ¹H RMN confirman una proximidad espacial entre los átomos de hidrógeno de los diferentes constituyentes de los NADES. El efecto NOE se observó en la mayoría de las diluciones, siendo LGH el solvente que presentó dicho efecto a mayores diluciones. De acuerdo a los efectos de dilución encontrados, se puede establecer un umbral para cada solvente eutéctico, en el cual la estructura supramolecular se rompe. Los límites de dilución para LGH son de hasta un 80 y

90 %, para FCH entre 70-80 % y, finalmente CGH admite hasta un 60-70 % de agregado de agua.

Existen escasos reportes que determinen los valores máximos de dilución de los NADES. Dai y colaboradores [4] evaluaron el efecto de sucesivas diluciones sobre la mezcla 1,2-propanediol : cloruro de colina : agua (1:1:1) . Estos autores observaron que la estructura del solvente eutéctico se preservó a diluciones menores al 50 %. Mayores diluciones generaron una solución de los componentes individuales en agua. Olivares y colaboradores [21] reportaron un comportamiento similar para una mezcla de betaína: urea; los resultados de ^1H RMN y ^{13}C RMN sugirieron una ruptura de la supraestructura con el aumento del contenido de agua [21].

2.3.2.2. Interacción de los NADES con biocompuestos

Como se mencionó anteriormente, de las mezclas de solventes optimizadas, LGH resultó la más adecuada como medio de extracción. Asimismo, fue la combinación que mantuvo su estructura supramolecular a mayores diluciones. Es por esto que se decidió estudiar el comportamiento de sus enlaces en presencia de quercetina (Quer), un compuesto fenólico ampliamente distribuido en plantas y que ha sido previamente reportado por presentar interacciones fuertes con otros sistemas eutécticos [7]. Para esto, se prepararon soluciones de Quer (10 mg L^{-1}), en diluciones de LGH entre 10 y 50 %. En la Figura 2.8 se muestra el espectro de ^1H de RMN obtenido al irradiar cada una de estas diluciones en la señal del mismo protón previamente estudiado.

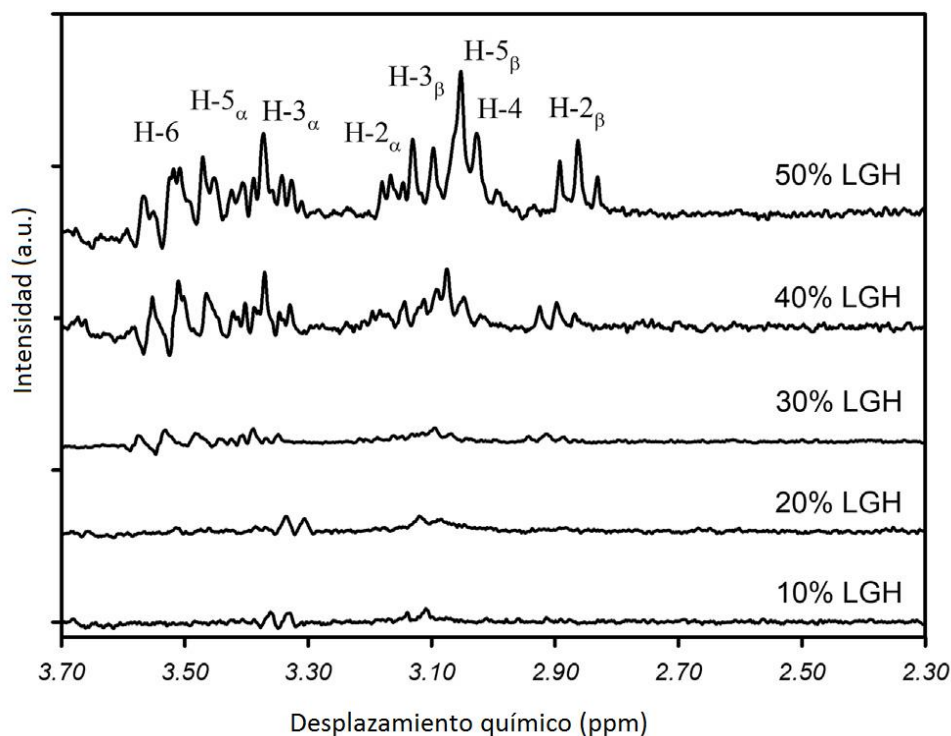


Figura 2.8. Efecto NOE observado para el espectro de ^1H RMN de soluciones de Quer a 10 mg L^{-1} en LGH cuando el ácido láctico es irradiado ($\delta = 1,20 \text{ ppm}$).

Los resultados obtenidos en la Sección 2.3.2.2 mostraron que todas las diluciones de LGH evaluadas presentaron NOE excepto 10 % LGH. Sin embargo, en las soluciones de Quer estudiadas, el efecto NOE se registró únicamente cuando se irradió las señales de ácido láctico de 40 % y 50 % LGH. Ésto indicaría que la solvatación de Quer con LGH involucra interacciones entre solvente – analito que afectan la interacción intermolecular en las soluciones más diluidas de LGH. Esto se encuentra de acuerdo a lo reportado previamente por Dai *et al* [7] para la interacción entre el sistema xilitol: cloruro de colina : agua y quercetina.

2.3.2.3 Estudio teórico

Simultáneamente a los estudios experimentales de NADES por ^1H RMN, se realizó un modelado molecular en solución de los sistemas LGH, FCH y CGH. Este estudio se llevó a cabo con el fin de racionalizar la presencia de las interacciones intermoleculares encontradas

entre los componentes de los solvente eutécticos bajo estudio. En la Figura 2.9 se puede observar la geometría para los tres sistemas optimizados en agua en M06-2X/6-31+G (d,p) nivel de teoría.

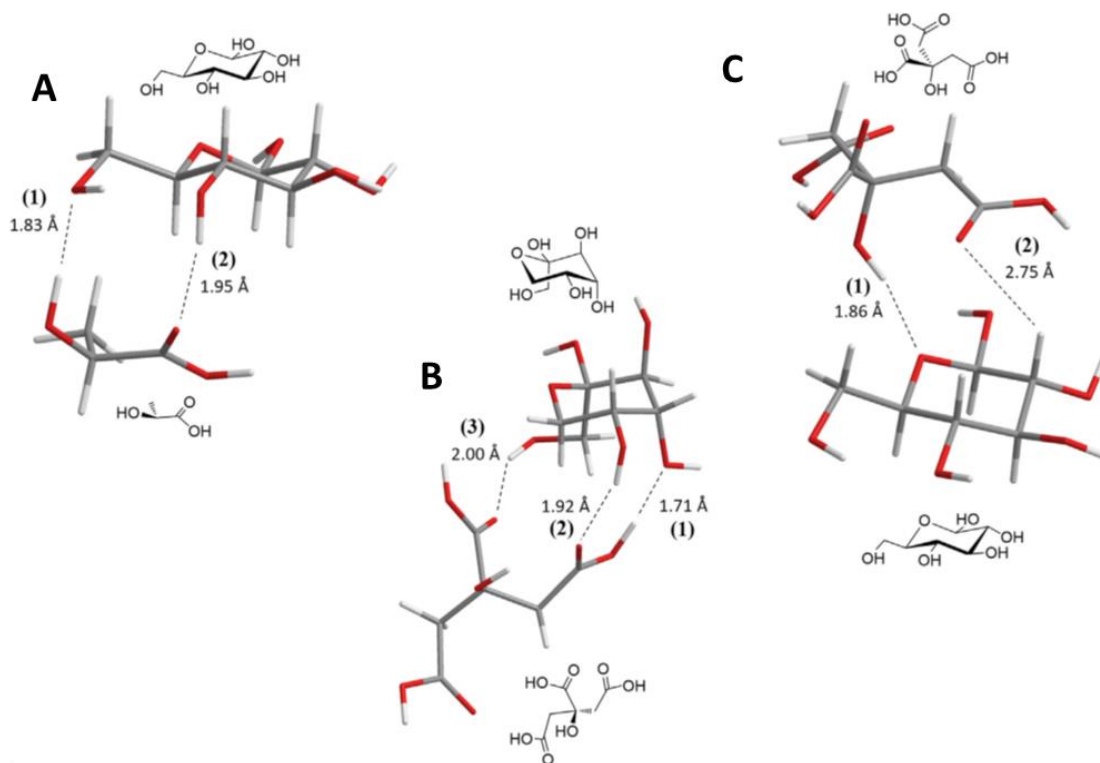


Figura 2.9. Geometrías optimizadas de los sistemas eutécticos en agua, A: LGH, B: FCH y C: CGH.

En el caso de LGH, la conformación obtenida después de la optimización geométrica presentó dos interacciones del tipo puente hidrógeno (Figura 2.9 A), principalmente, una interacción entre el oxígeno unido a C-6 de la glucosa y el hidrógeno del grupo hidroxilo del ácido láctico (1,83 Å, Figura 2.9 A-1), y otra interacción entre el hidrógeno del grupo hidroxilo del C-4 de la glucosa y el átomo de oxígeno del grupo carbonílico del ácido láctico (1,95 Å, Figura 2.9 A-2).

Por otro lado, la geometría de FCH optimizada presentó tres interacciones tipo puente hidrógeno (Figura 2.9-B). La mínima distancia encontrada fue entre el átomo de hidrógeno

del hidroxilo del grupo carboxilo del ácido cítrico y el oxígeno unido a C-4 de la fructosa (1,71 Å, Figura 2.9 B-1). La segunda interacción encontrada fue entre el hidrógeno del grupo hidroxilo de C-5 de la fructosa y el oxígeno del grupo carbonilo del ácido cítrico (1,92 Å, Figura 2.8 B-2). Finalmente, la tercera interacción en FCH se observó para el hidrógeno del grupo hidroxilo del C-1 de la fructosa y el átomo de oxígeno de otro grupo carbonilo en el ácido cítrico (2,00 Å, Figura 2.9 B-3).

La conformación obtenida para CGH después de optimizar la geometría se muestra en la Figura 2.9 C. En este caso, se presentan dos interacciones de tipo puente hidrógeno, una entre el hidrógeno del grupo hidroxilo del ácido cítrico y el oxígeno del anillo glucopiranosido de la glucosa (1,86 Å, Figura 2.9 C-1), y una segunda no convencional puente hidrógeno entre H-2 y el oxígeno del grupo carbonilo del ácido cítrico (2,75 Å, Figura 2.9 C-2).

Por otro lado, para las principales interacciones puente hidrógeno de cada NADES se evaluó el índice Wiberg y la energía específica de enlace asociadas a las deslocalización de electrones (según el segundo orden de la teoría de perturbación de análisis de la matriz de Fock). Ambos parámetros, permiten obtener una aproximación de la fuerza en uniones no covalentes (Tabla 2.4). Asimismo, se determinó también la energía de estabilización de la formación del puente hidrógeno (en Kcal mol⁻¹), la cual se relaciona con la estabilidad de los NADES según sus interacciones intermoleculares.

Tabla 2.4. Índice Wiberg y análisis de teoría de perturbaciones de segundo orden de la matriz de Fock en uniones de orbitales naturales (NBO).

	Distancia (Å)	Índice Wiberg	Donor NBO	Aceptor NBO	Energía (Kcal/mol)
LGH	1,83	0,0540	O(LP) ^{glu}	H-O (BD*) ^{lac}	17,48
	1,95	0,0243	O(LP) ^{lac}	H-O (BD*) ^{glu}	6,81
FCH	1,71	0,0677	O(LP) ^{fru}	H-O (BD*) ^{cit}	25,53
	1,92	0,0351	O(LP) ^{cit}	H-O (BD*) ^{fru}	6,63
	2,00	0,0218	O(LP) ^{cit}	H-O (BD*) ^{fru}	5,42
CGH	1,86	0,0424	O(LP) ^{glu}	H-O (BD*) ^{cit}	14,11
	2,75	0,0024	H-O (BD*) ^{cit}	H-O (BD*) ^{glu}	1,04

LP: par solitario, BD: orbital de enlace, BD*: orbital de antienlace. Glu: glucosa, Cit: ácido cítrico, Fru: fructosa, Lac: ácido láctico.

Como puede observarse en la Tabla 2.4, la mayoría de interacciones puente hidrógeno surgen de la interacción entre pares de electrones solitarios (LP) de átomos de oxígeno y orbitales antienlazantes (BD*) de la unión H-O de los grupos hidroxilos. Para FCH, se observaron tres interacciones puente hidrógeno, mientras que LGH y CGH presentaron dos interacciones. En los tres sistemas estudiados, se registraron interacciones intermoleculares fuertes de tipo puente hidrógeno con distancias 1.71 y 2.75 Å. Además, estas interacciones presentaron enlaces complementarios, dado que cada constituyente de los NADES tiene un donador y un aceptor de hidrógeno. Los valores negativos de energía obtenidos por el sistema dimérico modelado confirmaron la estabilización alcanzada por las interacciones intermoleculares. De acuerdo con el número de enlaces puente hidrógeno encontrados para cada sistema, el mayor valor de estabilización (mayor ΔE en valor absoluto) fue alcanzado por FCH, mientras que CGH presentó los menores valores de estabilización.

En resumen, las estructuras modeladas de los NADES confirmaron la proximidad espacial de sus componentes, la cual da lugar a interacciones entre los mismos. En concordancia con el estudio experimental, el modelado molecular confirmó la existencia de interacciones

punto de hidrógeno para LGH, CGH y FCH. Teniendo en cuenta el número de interacciones y las energías de estabilización predichas para cada solvente eutéctico evaluado, FCH sería en principio el que mantendría la estructura supramolecular con el efecto de la dilución. Sin embargo, la evidencia experimental demostró en el espectro de ^1H de RMN que el LGH es el NADES que más sostuvo su estructura supramolecular cuando se diluyó. Si bien el modelo propuesto fue capaz de encontrar interacciones intermoleculares entre los NADES, falló en predecir cuál de los tres tenía una estructura supramolecular más fuerte.

Esto probablemente se deba a que el sistema real puede contener una red de ácidos orgánicos y monosacáridos interaccionando simultáneamente, lo que sería imposible para el modelo debido a los tiempos computacionales asociados con el nivel de teoría aplicado.

2.3.3 Estabilidad de compuestos fenólicos

Entre las propiedades atribuidas a los NADES, se destaca su capacidad de estabilizar compuestos bioactivos. Previos reportes indican que esto se debe a la formación de interacciones puente hidrógeno o formación de quelatos que permitiría estabilizar compuestos que son inestables en otros medios. Para los NADES que poseen carbohidratos entre sus constituyentes, las interacciones puente hidrógeno entre el soluto y los solventes eutécticos explicarían su gran habilidad de estabilización [22].

Como se mencionó anteriormente, LGH resultó la combinación más adecuada como medio de extracción y asimismo, fue el solvente que mantuvo su estructura supramolecular a mayores diluciones. Es por esto que este sistema eutéctico se seleccionó para estudiar su capacidad de estabilización de ocho compuestos fenólicos. Los fenoles se seleccionaron por su ya conocida presencia en el reino vegetal y teniendo en cuenta su diferente naturaleza química (Figura 1.2, Capítulo 1), polaridad y tamaño: oleuropeína (secoiridoide), 3-hidroxitirosol (fenol simple), los ácidos: cumárico, cinámico, cafeico y ferúlico (ácidos hidroxicinámicos), quercetina (favonol) y apigenina (flavona).

Analizando los resultados obtenidos, a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, todos los compuestos fenólicos permanecieron estables en LGH y metanol por al menos dos meses (Figura 2.10). Mientras que en agua, durante el mismo periodo y a estas temperaturas, se observó una degradación para la mayoría de los fenoles siendo de hasta el 90 % para Api y Quer. Si bien luego de dos meses de almacenamiento a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, Ole, Hty, Api y Quer presentaron degradaciones en LGH entre 30-50 %, mientras que el resto de los compuestos fenólicos se mantuvieron estables en el solvente natural.

Los resultados para fenoles poco solubles se corresponden con lo estudiado por otros autores acerca del importante aumento de la estabilidad por parte de los NADES de compuestos poco solubles en soluciones acuosas. Dai y colaboradores [22] reportaron la estabilidad de Cartamina, un colorante natural. Este compuesto fue preservado en un solvente eutéctico (sacarosa: cloruro de colina) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por al menos 30 días, y a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por al menos 90 días [22].

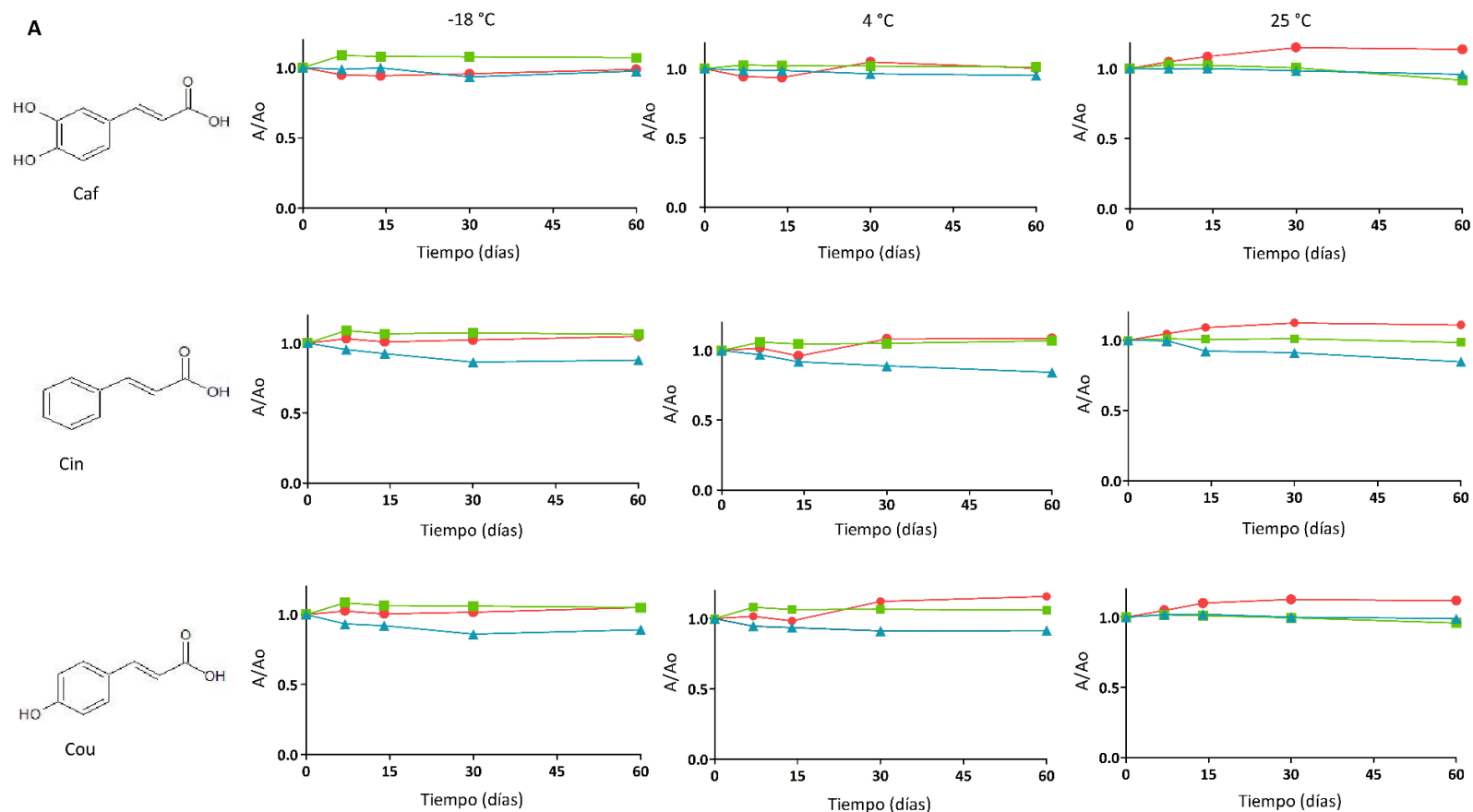


Figura 2.10. A: Estabilidad de Caf, Cin y Cou en LGH (■), MeOH (●) y H_2O (▲) a -18, 4 y 25 °C por un periodo de 60 días. A_o es el área cromatográfica inicial y A es el área cromatográfica después de un periodo de almacenamiento a la temperatura indicada. Los estudios se realizaron por triplicado (n=3).

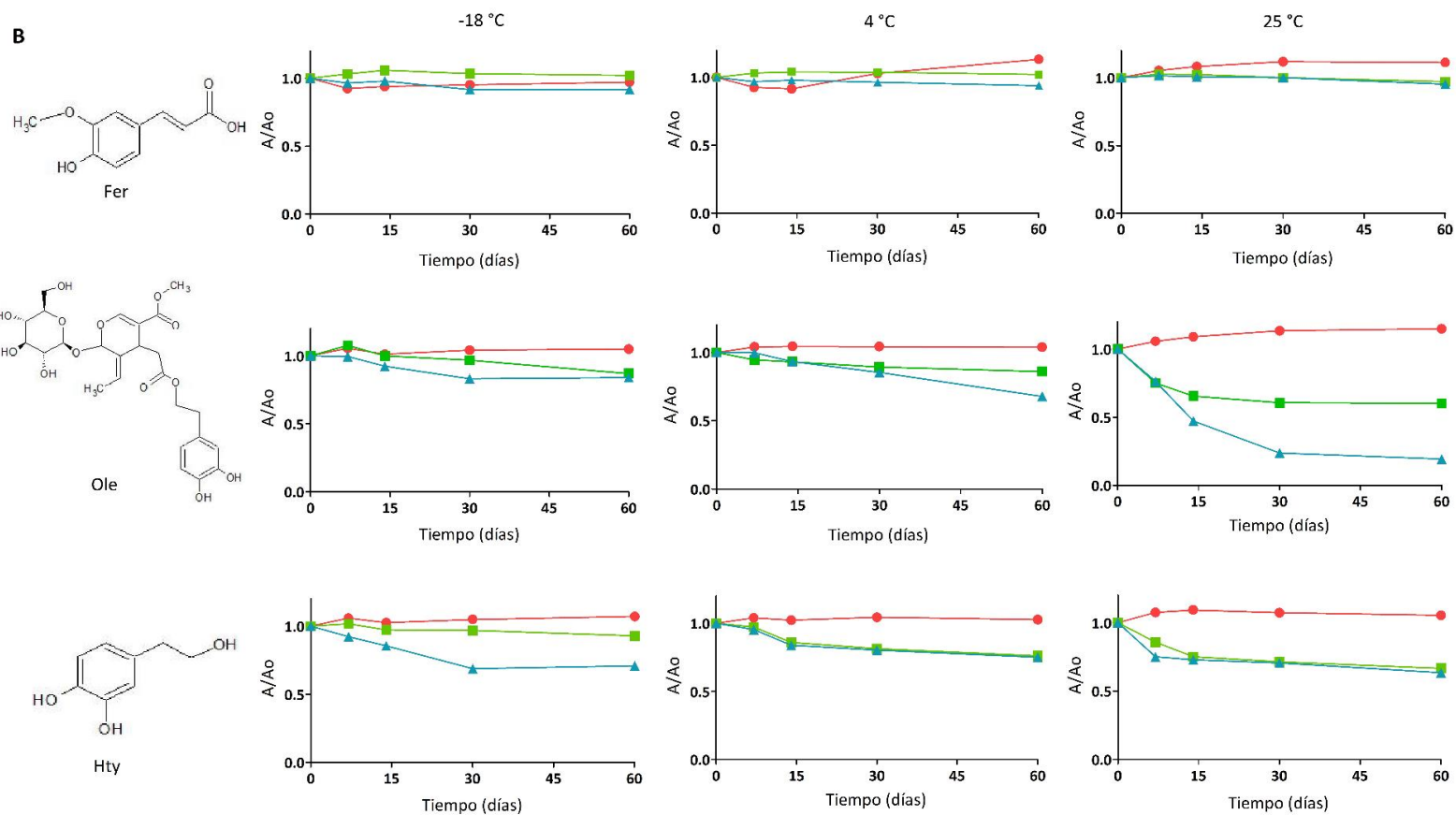


Figura 2.10. B: Estabilidad de Fer, Ole y Hty en LGH (■), MeOH (●) y H₂O (▲) a -18, 4 y 25 °C por un periodo de 60 días. A₀ es el área cromatográfica inicial y A es el área cromatográfica después de un periodo de almacenamiento a la temperatura indicada. Los estudios se realizaron por triplicado (n=3).

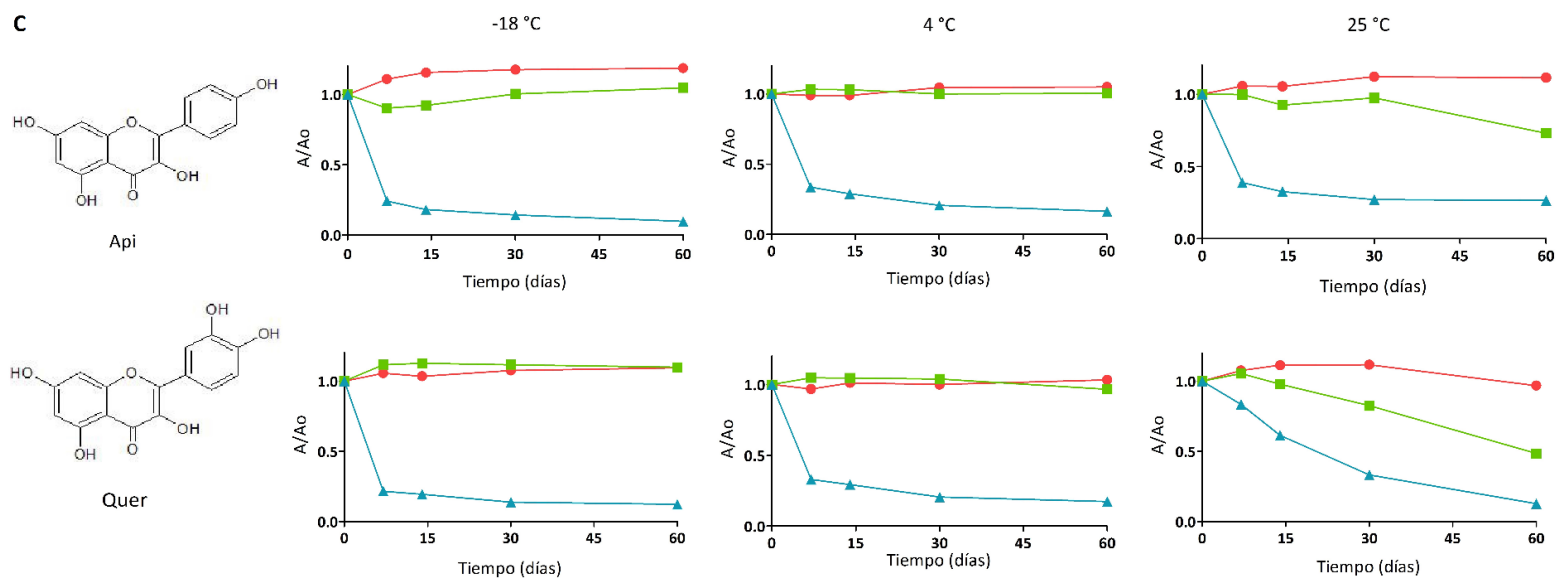


Figura 2.10. C: Estabilidad de Api y Quer en LGH (■), MeOH (●) y H₂O (▲) a -18, 4 y 25 °C por un periodo de 60 días. A_o es el área cromatográfica inicial y A es el área cromatográfica después de un periodo de almacenamiento a la temperatura indicada. Los estudios se realizaron por triplicado (n=3).

2.4 Conclusiones parciales

En este capítulo, se seleccionaron LGH, FCH y CGH y se optimizó su preparación con el propósito de obtener un solvente eutéctico adecuado para la extracción de compuestos fenólicos. Los resultados demostraron la importancia de optimizar la selección de los NADES para cada aplicación, siendo el agua un factor esencial.

Los estudios de NOE y modelado molecular permitieron caracterizar la estructura de los tres NADES evaluados. Se demostró la proximidad espacial de sus componentes; confirmando la presencia de interacciones intermoleculares. Asimismo, las variaciones del efecto NOE observadas en las diluciones de los NADES demostraron que el valor umbral en el cual la estructura supramolecular se rompe depende de cada mezcla eutéctica; siendo LGH el que mantuvo la interacción entre sus componentes a mayores diluciones.

En base a los resultados del diseño experimental, LGH presentó características adecuadas para la extracción de compuestos fenólicos en términos de densidad y temperatura de síntesis comparada con las mezclas CGH y FCH. Los estudios de estabilidad, demostraron su capacidad para estabilizar compuestos fenólicos de diferente polaridad y estructura química. Esta característica abre interesantes posibilidades para uso como vehículo de compuestos bioactivos en diversas industrias tales como farmacéutica y alimenticia. Por lo expuesto, LGH fue el solvente seleccionado para la obtención de bioextractos a partir de matrices vegetales.

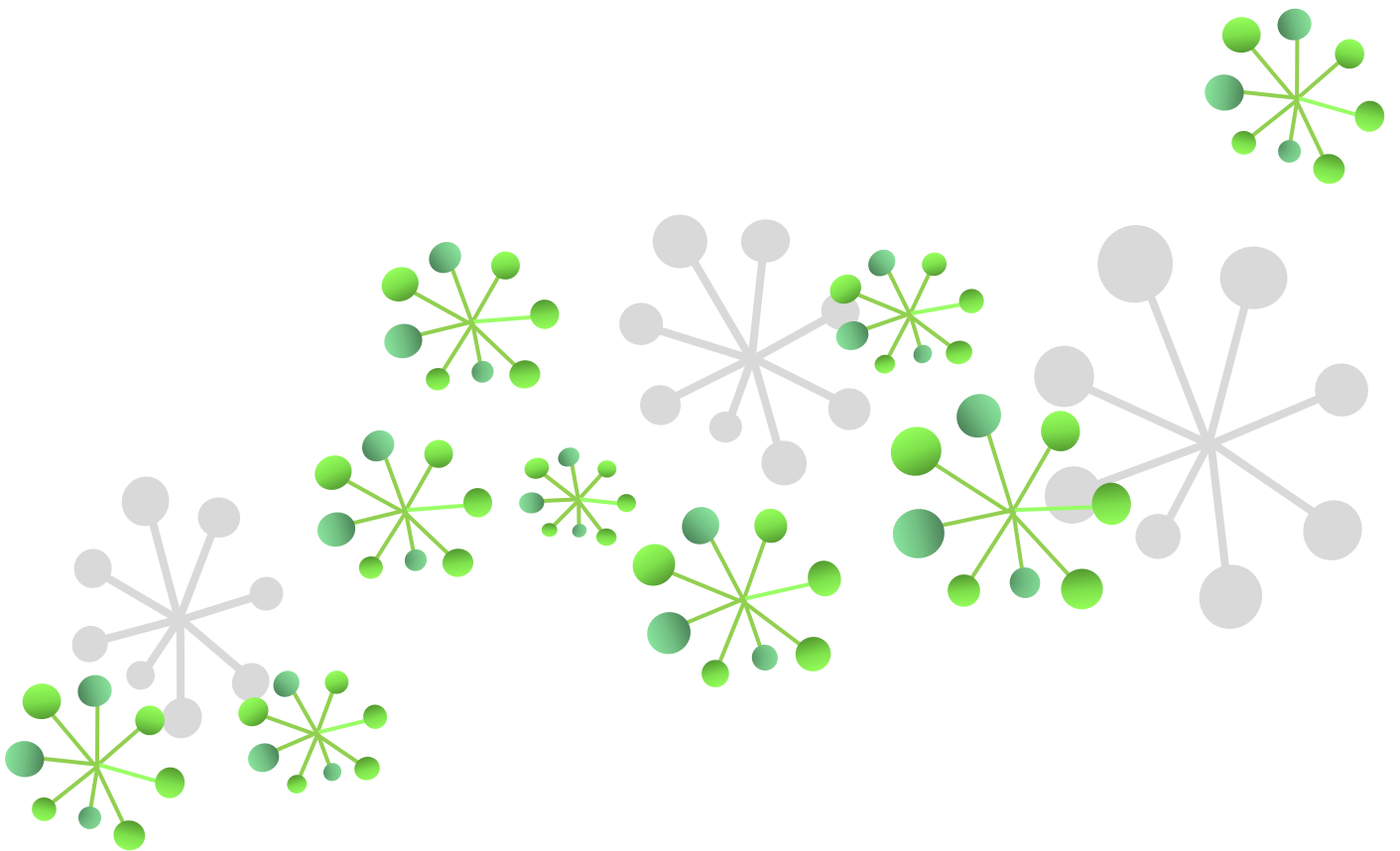
2.5 Bibliografía

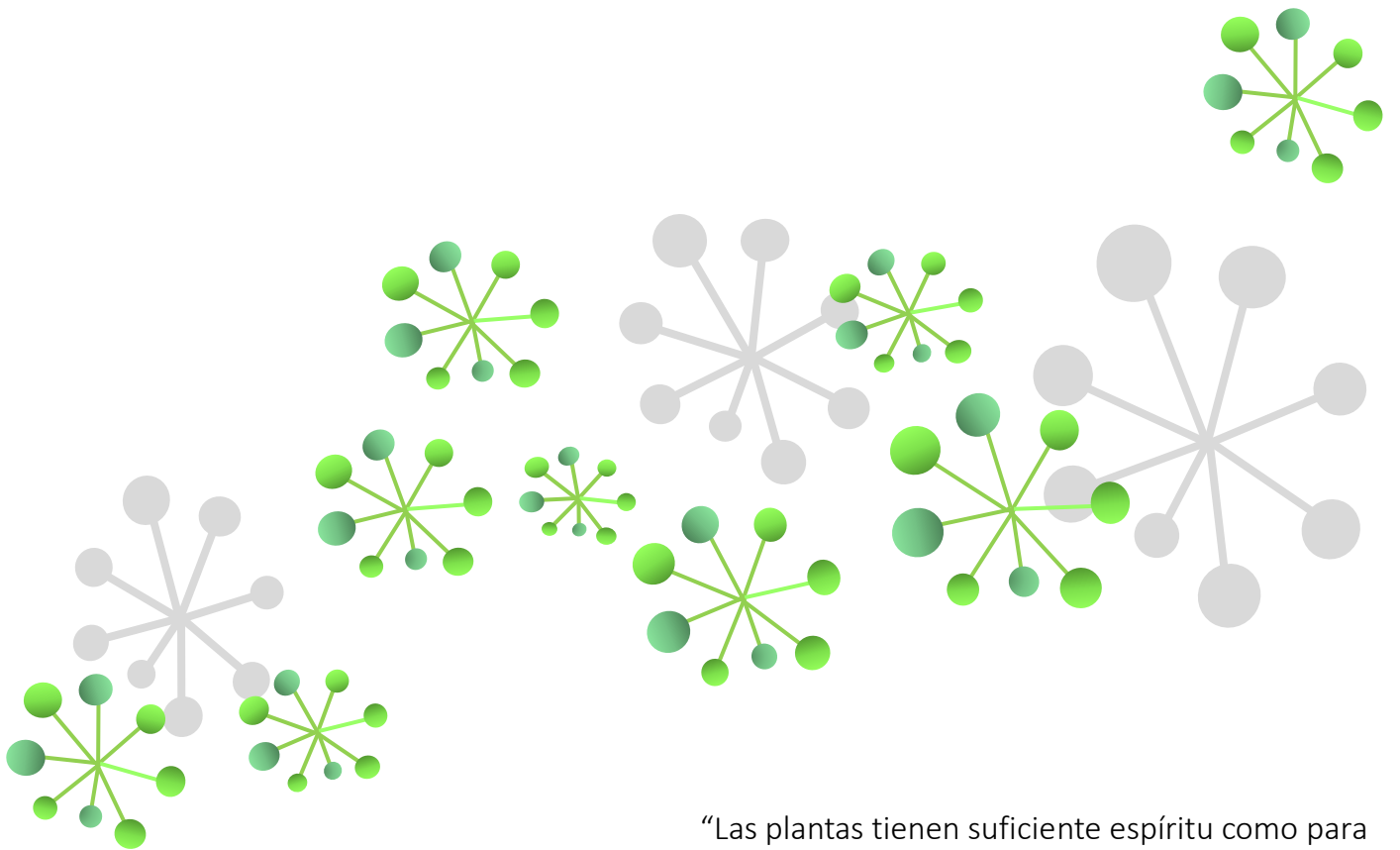
- [1] M. Espino, M. de los Ángeles Fernández, F.J.V. Gomez, M.F. Silva, Natural designer solvents for greening analytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016) 126-136.
- [2] Z. Wei, X. Qi, T. Li, M. Luo, W. Wang, Y. Zu, Y. Fu, Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography, *Separation and Purification Technology* 149 (2015) 237-244.
- [3] Y. Dai, E. Rozema, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents, *Journal of Chromatography A* 1434 (2016) 50-56.
- [4] Y. Dai, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications, *Food Chemistry* 187 (2015) 14-19.

- [5] T. Bosiljkov, F. Dujmić, M. Cvjetko Bubalo, J. Hribar, R. Vidrih, M. Brnčić, E. Zlatic, I. Radojčić Redovniković, S. Jokić, Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins, *Food and Bioproducts Processing* 102 (2017) 195-203.
- [6] V. Arunachalam, S. Vasudevan, Probing Graphene–Surfactant Interactions in Aqueous Dispersions with Nuclear Overhauser Effect NMR Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations, *The Journal of Physical Chemistry C* 121(30) (2017) 16637-16643.
- [7] Y. Dai, J. van Spronsen, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Analytica Chimica Acta* 766 (2013) 61-68.
- [8] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, *Theoretical Chemistry Accounts* 120(1) (2008) 215-241.
- [9] A. Frisch, gaussian 09W Reference, Wallingford, USA, 25p (2009).
- [10] A.V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions, *The Journal of Physical Chemistry B* 113(18) (2009) 6378-6396.
- [11] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, Quantum Mechanical Continuum Solvation Models, *Chemical Reviews* 105(8) (2005) 2999-3094.
- [12] E.D. Glendening, C.R. Landis, F. Weinhold, Natural bond orbital methods, *Wiley interdisciplinary reviews: computational molecular science* 2(1) (2012) 1-42.
- [13] M.W. Nam, J. Zhao, M.S. Lee, J.H. Jeong, J. Lee, Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*, *Green Chemistry* 17(3) (2015) 1718-1727.
- [14] Y. Dai, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *carthamus tinctorius* L, *Analytical Chemistry* 85(13) (2013) 6272-6278.
- [15] M. Martins, I.M. Aroso, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, R. Craveiro, A. Paiva, Enhanced performance of supercritical fluid foaming of natural-based polymers by deep eutectic solvents, *AIChE Journal* 60(11) (2014) 3701-3706.
- [16] Z.-F. Wei, X.-Q. Wang, X. Peng, W. Wang, C.-J. Zhao, Y.-G. Zu, Y.-J. Fu, Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae*, *Industrial Crops and Products* 63 (2015) 175-181.
- [17] E.N. Bridgers, M.S. Chinn, V.-D. Truong, Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars, *Industrial Crops and Products* 32(3) (2010) 613-620.
- [18] T.L. Mega, S. Cortes, R.L. Van Etten, The oxygen-18 isotope shift in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. 13. Oxygen exchange at the anomeric carbon of D-glucose, D-mannose, and D-fructose, *The Journal of Organic Chemistry* 55(2) (1990) 522-528.
- [19] A. de Bruyn, M. Anteunis, G. Verhegge, A 1H-n.m.r. study of D-fructose in D2O, *Carbohydrate research* 41 (1975) 295-7.
- [20] S.J. Angyal, The Composition and Conformation of Sugars in Solution, *Angewandte Chemie International Edition in English* 8(3) (1969) 157-166.
- [21] B. Olivares, F. Martínez, L. Rivas, C. Calderón, J. M. Munita, P. R. Campodonico, A Natural Deep Eutectic Solvent Formulated to Stabilize β -Lactam Antibiotics, *Scientific Reports* 8(1) (2018) 14900.
- [22] Y. Dai, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*), *Food Chemistry* 159 (2014) 116-121.

CAPÍTULO 3

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS





“Las plantas tienen suficiente espíritu como para
transformar nuestra limitada visión”
Rosemary Gladstar

CAPÍTULO 3

Obtención y caracterización de extractos

3.1 Introducción

En medicina popular, las plantas se han utilizado por sus propiedades benéficas tales como antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante. Estas actividades se atribuyen principalmente a sus metabolitos secundarios, entre los que se destacan los compuestos fenólicos, alcaloides y compuestos volátiles. La extracción, determinación y cuantificación de estos biocompuestos resulta de especial interés para poder brindar bases científicas y alcanzar un uso seguro y eficaz de los preparados fitoterápicos [1].

En las últimas décadas, los avances instrumentales realizados en el campo de la química analítica son incuestionables. Sin embargo, la etapa de extracción sigue siendo un paso limitante en el desarrollo de todo procedimiento analítico. En el caso de la extracción de compuestos bioactivos de plantas, las técnicas tradicionalmente empleadas presentan serias desventajas. En su mayoría son procedimientos largos, que involucran grandes volúmenes de solventes tóxicos así como también requieren de un alto costo energético [2]. En los últimos años, se han consolidado técnicas no convencionales de extracción debido a que logran reducir estos parámetros [3]. A pesar de esto, una de las principales preocupaciones en el área de la Química Analítica Verde, es que los solventes tóxicos siguen siendo utilizados en la mayoría de los procedimientos [4]. En este contexto, surgen los Solventes Eutécticos Naturales (NADES) como una potencial alternativa verde para la extracción de compuestos a partir de matrices vegetales [5].

En este sentido, con el fin de poder determinar el impacto de una metodología analítica, se han desarrollado diferentes métricas que permiten cuantificar la sustentabilidad de los procedimientos. Recientemente en 2016, De la Guardia y colaboradores [6] propusieron el “Certificado Verde”, el cual consiste en asignar puntos de penalidad a diferentes parámetros tales como volumen de solvente empleado, toxicidad, consumo energético y generación de

residuos. Luego, los puntos de penalidad determinados se restan al valor de 100, que corresponden a un procedimiento verde ideal.

En el presente capítulo, se propuso desarrollar una metodología sustentable para la extracción de fenoles a partir de plantas nativas, utilizando como extractante el NADES presentado en el Capítulo 2. En primer lugar, para la selección del procedimiento de extracción, se realizó un estudio comparativo con el fin de evaluar la sustentabilidad de las técnicas más recientemente utilizadas. A partir de los resultados obtenidos, se decidió optimizar una metodología mediada por ultrasonido utilizando LGH como solvente.

Una vez optimizada la extracción, se prepararon extractos a partir de dos especies del género *Larrea*, *Larrea divaricata* y *Larrea cuneifolia*, autóctonas de la región de Cuyo; y *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*, ambas pertenecientes a la familia Lamiáceas y conocidas por sus propiedades medicinales. Luego, los extractos obtenidos se caracterizaron en términos de actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos. Teniendo en cuenta que existen escasos reportes acerca de la capacidad de los NADES para extraer alcaloides, se propuso evaluar la habilidad de LGH para extraer estos biocompuestos. Asimismo, con el fin de complementar el estudio del Capítulo 2 sobre el comportamiento de LGH, se comparó su comportamiento como extractante con los solventes tradicionales agua y metanol.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Reactivos y equipamiento

En este capítulo, se emplearon algunos de los reactivos y equipamiento detallados en el Capítulo 2, Sección 2.2.1; así como también se utilizó el mismo procedimiento para la preparación de soluciones de estándares.

Para las determinaciones de fenoles totales y capacidad antioxidante se utilizaron: el reactivo de Folin-Ciocalteu obtenido de Biopack (Bs. As., Argentina); el ácido 2,2'-azinobis 3-

etillbenzotiazolin-6- sulfónico (ABTS) y 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) ambos obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Estándares analíticos: tirosol (Tyr), luteolina (Lut) y rutina (Rut) se obtuvieron de Fluka Analytical (St. Louis, MO, USA), mientras que (\pm) catequina (Cat), naringenina (Nar), y los ácido nordihidroguaiarético (NDGA) y rosmarínico (Ros) de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los alcaloides: teofilina (Teof), teobromina (Teob), cafeína (Cafe), harmalina (Harm), y piperina (Pip) se obtuvieron también de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Para la extracción se utilizó: baño ultrasónico (Cleanson-Buenos Aires; 200 W, 20 kHz), centrífuga (Eppendorf 5804-R).

3.2.2 Material Vegetal

Larrea cuneifolia, *Larrea divaricata*, *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* fueron cultivadas en invernáculo bajo radiación natural a una temperatura de $20-25 \pm 5$ °C (invierno y verano respectivamente). Las mismas fueron identificadas en términos de morfología y anatomía por la Cátedra de Botánica de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Las hojas fueron colectadas al azar a partir de 4-5 plantas, en la época de floración correspondiente a cada especie vegetal (Figura 3.1). Una vez separadas de la planta, las hojas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para detener todos los procesos enzimáticos. Posteriormente, fueron liofilizadas para su conservación en freezer (-18 °C). Antes de la extracción, se procedió a homogeneizar las hojas moliéndolas con nitrógeno líquido.

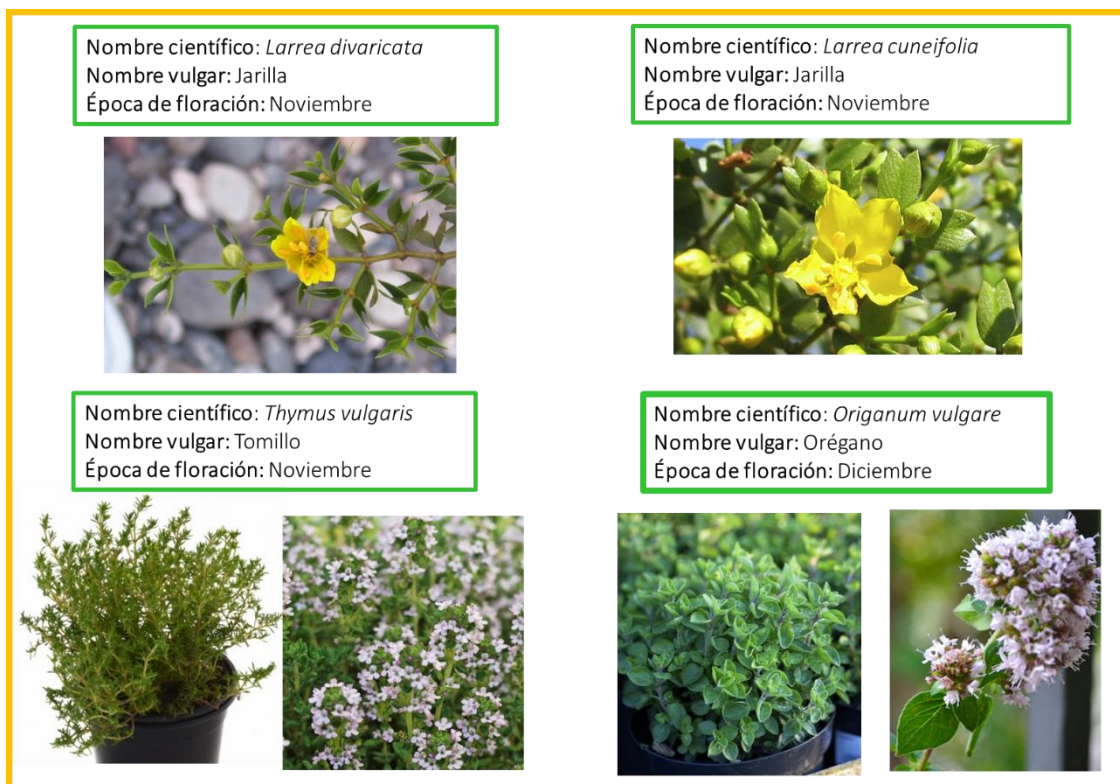


Figura 3.1. Material vegetal utilizado.

3.2.3 Obtención de extractos

3.2.3.1 Métricas Sustentables

Los puntos de penalidad (PPs) se calcularon de acuerdo al “Certificado Verde” propuesto por de la Guardia y colaboradores [6]. Los parámetros evaluados fueron: solvente (tipo y volumen), consumo energético y generación de residuos. Los puntos de penalidad para el solvente (PPR) y para el volumen de residuo (PPw) se calcularon según las siguientes ecuaciones (Eq. 1 y 2):

$$PP_R = (0,61 \pm 0,05)V^{(0,31 \pm 0,02)} \quad (1)$$

$$PP_w = (0,5 \pm 0,08)W^{(0,4 \pm 0,02)} \quad (2)$$

donde, V: volumen de solvente y W: volumen de residuo

Los PP para el consumo de energía se calcularon de acuerdo a los valores propuestos por Raynie y Driver [7], teniendo en cuenta la cantidad de energía requerida para cada muestra (Figura 3.2).

Energía (kWh)	PP _E
≤ 0,1	1
0,1 - 1,5	2
≥ 1,5	3

Figura 3.2. Puntos de penalidad según el consumo de energía utilizado.

3.2.3.2 Optimización de la extracción

El Solvente Eutético Natural diseñado en el Capítulo 2 compuesto por ácido láctico-glucosa-agua (LGH), se utilizó para optimizar la extracción de compuestos fenólicos mediada por ultrasonido. Como material vegetal, se seleccionó *L. cuneifolia*. Con este propósito, se llevó a cabo un análisis multivariado para evaluar los siguientes parámetros: tiempo de ultrasonido, relación muestra/solvente y dilución del LGH previamente sintetizado. La temperatura de extracción se estableció en 40 °C para evitar la degradación de compuestos. Los extractos obtenidos se analizaron por HPLC-DAD y se utilizó el área cromatográfica para evaluar la performance de extracción. Los resultados se expresan como eficiencia porcentual relativa.

Como resultado de la optimización, el material liofilizado y el LGH se colocaron en un tubo de centrífuga de 15 mL (75 mg mL⁻¹) y se homogeneizaron en un vórtex por 15 segundos. Las suspensiones se colocaron en ultrasonido durante 42 minutos a 40 °C (± 2 °C). Luego, fueron centrifugados a 1000 rpm por 30 minutos y el sobrenadante se filtró (0,45 µm) antes del análisis por HPLC-DAD. Cada extracción se realizó por triplicado.

Los valores óptimos se utilizaron para la obtención de extractos a partir de las cuatro plantas medicinales seleccionadas. Para llevar a cabo la comparación de LGH con solventes

tradicionales, se realizaron extracciones con H₂O y MeOH utilizando los parámetros óptimos de relación solvente/material vegetal y tiempo de ultrasonido.

3.2.3.2.1 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

La optimización de la extracción mediada por ultrasonido (UAE) se llevó a cabo aplicando un Diseño Box-Behnken y Metodología de Superficie Respuesta (MSR), utilizando el software Design Expert, v 7.1 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Los resultados se validaron estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $p = 0,05$. La adecuación del modelo se evaluó por medio del coeficiente de determinación (R^2) y el p valor del modelo. Asimismo, se establecieron modelos matemáticos que permitieran describir la influencia de los parámetros individualmente y/o de las interacciones entre los parámetros en cada respuesta investigada. Los gráficos de superficie-respuesta se realizaron con el mismo software, y se representaron seleccionando la función de dos factores, dejando el tercero constante. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas Statgraphics Centurion XV v15.2.06 y GraphPad Prism v5.01. Todos los datos se reportaron como la media \pm SD para tres réplicas.

3.2.4 Caracterización de los extractos

3.2.4.1 Compuestos fenólicos totales

El contenido de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC) descrito por Singleton y Rossi [8], con modificaciones. Para esta determinación se usaron diluciones de los extractos al 5 % en el mismo solvente que fueron obtenidos (LGH, MeOH o H₂O). En un tubo de ensayo se colocaron 50 μ L de extracto al 5 % y se mezclaron con 200 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de cinco minutos, se agregó la solución de Na₂CO₃ (1250 μ L, 5 % w/v) y se llevó a un volumen final de 5000 μ L utilizando H₂O mili-Q. La mezcla se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 60 minutos. Posteriormente, se determinó el contenido de compuestos fenólicos colorimétricamente a 750 nm. El contenido de fenoles totales se expresó en μ g de ácido gálico por mL de extracto; para lo

cual se realizó una curva de calibrado utilizando un estándar de este fenol (rango de concentración: 0-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $R^2 = 0,9904$). Cada determinación se realizó por triplicado.

3.2.4.2 Capacidad antioxidante

3.2.4.2.1 DPPH

La capacidad de los extractos para secuestrar radicales libres se determinó siguiendo la metodología descrita por Nuutila *et al.* [9], utilizando la curva de decoloración del radical estable 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH*). Para esto se mezclaron 3,5 mL de una solución metanólica de DPPH* (45 mg mL^{-1}) con 250 μL del extracto diluido al 2,5 % (con el mismo solvente que fue obtenido, LGH, MeOH o H_2O). Luego de 5 minutos, la absorbancia se midió a 515 nm. La solución de DPPH* tuvo una absorbancia inicial de 1,375 (A_{DPPH^*}). Como referencia (A_{REF}) se utilizó una solución de un estándar de ácido gálico (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Cada determinación se realizó por triplicado. La disminución en la concentración del radical indica la actividad secuestradora de radicales de la muestra. Se calculó el porcentaje de inhibición del radical DPPH* (%), por medio de la siguiente fórmula (3):

$$\% I_{\text{DPPH}^*} = \frac{A_{\text{DPPH}^*} - A_E}{A_{\text{DPPH}^*} - A_{\text{REF}}} \quad (3)$$

donde; A_{DPPH^*} : absorbancia inicial del DPPH*, A_E : absorbancia de la muestra, A_{REF} : absorbancia de referencia.

3.2.4.2.2 ABTS

La actividad antioxidante de los extractos se determinó también mediante el método propuesto por Re *et al.* [10], usando la sal de diamonio 2, 2'-azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS). En primer lugar, este reactivo se disolvió en etanol a una concentración de 2 mM. Luego, con el fin de generar el catión radical de ABTS*, se mezcló con una solución de persulfato de potasio (2,45 mM) y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 12-16 horas. Para esta determinación, se prepararon diluciones al 2,5 % de los

extractos en el mismo solvente que fueron obtenidos (LGH, MeOH o H₂O). La solución obtenida de ABTS* fue diluida con etanol hasta una absorbancia de 0,7 (\pm 0,02) a 734 nm (A_{REF}). Luego, se agregaron 80 μ L de extracto diluido a 3920 μ L de la solución de ABTS* y la absorbancia se midió a 734 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado. Como referencia (A_{REF}) se utilizó una solución de ácido gálico (1000 μ g mL⁻¹) y los resultados fueron calculados según la siguiente fórmula (4):

$$\% I_{ABTS^*} = \frac{A_{ABTS^*} - A_E}{A_{ABTS^*} - A_{REF}} \quad (4)$$

donde; A_{ABTS^*} : absorbancia inicial del ABTS*, A_E : absorbancia de la muestra, A_{REF} : absorbancia de referencia.

3.2.4.3 Determinación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD

La determinación de compuestos fenólicos se realizó utilizando el mismo equipamiento y software descriptos en el Capítulo 2, Sección 2.2.4; empleando un sistema de detección Dionex-DAD 3000.

Se empleó la columna previamente descripta, y se empleó la misma fase móvil (A: H₂O acidificada con 0,1 % ácido fórmico y como fase móvil B: ACN). Los compuestos fenólicos fueron separados según el siguiente gradiente descrito en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Gradiente utilizado para la separación de fenoles por HPLC-DAD.

Tiempo (min)	Acetonitrilo (v/v %)
0-3	5
3-11	15
11-15	32
15-15,5	40
15,5-16	50
16-16,5	50
16,5-17	30
17-17,5	15
17,5-18	5
18,5-20	5

El flujo de fase móvil fue de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, la temperatura de la columna se mantuvo en 30°C y el volumen de inyección fue $5 \mu\text{L}$. La identificación de los compuestos fenólicos en los distintos solventes estudiados se basó en la comparación de los tiempos de retención (t_R) con los obtenidos para soluciones patrones de cada analito evaluado. La cuantificación se realizó utilizando los valores de absorbancias de los picos detectados (área bajo la curva), calculando la concentración mediante la curva de calibración de cada uno de estándares. Los cromatogramas se registraron a 280 (Tyr, Cat, Cin, Nar, NDGA), 320 (Caf, Fer, Ros, Api) y 370 nm (Rut, Quer, Lut).

3.2.4.4 Determinación de alcaloides por HPLC-DAD

La determinación de alcaloides se realizó utilizando el equipamiento descrito en el punto anterior (HPLC-DAD Dionex Ultimate 3000), empleando el mismo software. La separación se llevó a cabo utilizando una columna Accucore Polar Premium C18 ($3 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $2,6 \mu\text{m}$) Agilent Technologies. Se empleó como fase móvil A, agua acidificada con $0,1 \%$ ácido fórmico y como fase móvil B, acetonitrilo. El gradiente empleado se describe en la Tabla 3.2, el flujo de fase móvil fue de 1 mL min^{-1} .

Tabla 3.2. Gradiente utilizado para la separación de fenoles por HPLC-DAD.

Tiempo (min)	Acetonitrilo (v/v %)
0-1,5	25
1,5-3,75	42
3,75-6,5	50
6,5-9	50
9-9,75	25
9,75-10	10
10-12,5	10

La identificación y cuantificación de los alcaloides en los distintos solventes estudiados se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito para fenoles en el punto anterior. Los cromatogramas fueron registrados a 280 (Teob, Cafe, Teof), 320 (Pip) y 370 nm (Har).

3.3 Resultados

3.3.1 Métricas de Sustentabilidad

En primer lugar, con el fin de diseñar un procedimiento de extracción que se encuentre alineado con los principios de la química analítica verde, se realizó un estudio bibliográfico comparativo de la sustentabilidad de las metodologías más recientemente utilizadas. Para esto se seleccionaron trabajos que emplearan técnicas tanto convencionales como no convencionales para la extracción de compuestos fenólicos a partir de plantas medicinales (Tabla 3.3). La sustentabilidad se evaluó mediante el “Certificado Verde” y los puntos de penalidad (PPs) se calcularon como se describe en la Sección 3.2.3.1. Este estudio comparativo, permitió detectar factores clave para disminuir los puntos de penalidad en un procedimiento de extracción.

Analizando los resultados obtenidos, los PPs para las técnicas convencionales se encontraron entre 9,53 y 25,11; mientras que las no convencionales demostraron una marcada reducción siendo los PPs calculados entre 3,5 y 13,46. Como puede observarse, los valores elevados de PPs obtenidos por las técnicas convencionales están relacionados principalmente a los elevados volúmenes de extractante como así también a el tipo de solvente orgánico utilizado. Además, éstas técnicas implican un mayor gasto energético y generan mayores cantidades de residuos. Otro aspecto crítico a tener en cuenta, es que para obtener extracciones satisfactorias, las técnicas convencionales requieren de mayores tiempos. El factor tiempo, si bien no se encuentra penalizado, representa una gran desventaja para los fines prácticos. Notablemente, las no convencionales como microondas y ultrasonido, mostraron resultados satisfactorios desde una perspectiva verde.

Tabla 3.3. Certificado Verde para métodos de extracción de compuestos fenólicos a partir de plantas medicinales.

	EXTRACCIÓN							Certificado Verde**	Referencia
	Técnica de extracción	Solvente			Energía (kW h ⁻¹)	Residuo (PP _w)	Total PPs		
		Volumen de solvente (mL)- PP _R	Peligrosidad (PP _{RH})	Subtotal PP*					
TÉCNICAS CONVENCIONALES	Calentamiento	1,005 (5 mL MeOH)	6	6,028	2	1,5	9,53	90,47	[11]
	Maceración (con agitación)	1,42 (15 mL MeOH)	6	8,474	2	0,653	11,13	88,87	[12]
	Decocción	- (200 mL H ₂ O)	-	-	8	4,972	12,97	87,03	[13]
	Maceración	1,427 (15,5 mL MeOH)	6	8,560					
		0,654 (1,25 mL ácido acético)	4	2,617	1	1,500	13,68	86,32	[14]
	Maceración (con agitación)	1,634 (24 mL MeOH)	6	9,803	4	1,137	14,94	85,06	[15]
	Maceración (con agitación)	2,082 (52,5 mL EtOH)	4	8,329	-	2,855	15,19	84,19	[16]
	Maceración (24horas)	2,543 (100 mL MeOH)	6	15,257	2	2,855	20,11	79,89	[17]
	Maceración	2,543 (100 mL MeOH)	6	15,257	4	2,855	22,11	77,89	[18]
	Soxhlet	2,543 (100 mL MeOH)	6	15,257	7	2,855	25,11	74,89	[18]

TÉCNICAS NO CONVENCIONALES	Ultrasonido	- (100 mL H ₂ O)	-	-	2	1,5	3,50	96,5	[19]
	Ultrasonido	- (10 mL H ₂ O)	-	-	3	0,788	3,79	96,21	[20]
	Ultrasonido	- (1mL NADES) 0,94 (4 mL ACN)	- 6	- 5,62	3	0,34	7,97	92,03	[21]
	Microondas	1,005 (5 mL de MeOH)	6	6,028	1	1,5	8,53	91,47	[11]
	Ultrasonido	1,473 (17,200 mL EtOH)	4	5,894	3	1,5	10,39	89,61	[3]
	Ultrasonido	- (1 mL NADES) 1,54 (20 mL MeOH)	- 6	- 9,26	3	1,20	13,46	86,54	[22]
	Ultrasonido	- (5 mL LGH)	-	-	3	1,01	4.01	95,99	Extracción propuesta

Con la necesidad de reducir los PP_R , el agua se presenta como una alternativa sustentable en la extracción de compuestos fenólicos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para optimizar racionalmente una técnica de extracción no solo hay que disminuir el impacto ambiental sino también maximizar la eficiencia de extracción. En este sentido, numerosos reportes comparan los rendimientos de extracción para fenoles demostrando que el agua es menos eficiente que los solventes orgánicos debido a que esta es solo efectiva para extraer compuestos bioactivos polares e hidrofílicos [18, 23].

Un gran número de solventes alternativos han demostrado tanto su sustentabilidad como eficiencia. Entre ellos, se destacan los NADES que presentan características satisfactorias como extractantes [24, 25]. Si bien es notable el creciente interés de la comunidad científica por la aplicación de éstos solventes verdes en el procedimiento de extracción; los solventes orgánicos siguen siendo elegidos ya sea para el procedimiento en sí, o para posteriores diluciones. Esto impide que una metodología se alinee completamente con los principios de la Química Verde [21, 22].

Finalmente, considerando el estudio comparativo llevado a cabo, se decidió optimizar un método de extracción (no convencional) mediado por ultrasonido (UAE). Esta metodología se eligió por presentar bajos valores de PP, como así también por su simplicidad de uso, reducción de tiempos de extracción y aumento de la eficiencia. Como extractante se seleccionó LGH; el solvente eutéctico optimizado en el Capítulo 2, con el fin de reducir los PPs y maximizar la eficiencia de extracción.

3.3.2 Optimización de la extracción mediada por LGH-UAE.

Teniendo en cuenta que un gran número de variables afectan la eficiencia de extracción, se llevó a cabo la optimización de este paso mediante un análisis multivariado como se describe en la Sección 3.2.3.2.1. Se utilizó un diseño experimental Box- Behnken (CCD) con metodología de superficie respuesta (MSR) para determinar las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos a partir de *L. cuneifolia*. Los parámetros evaluados fueron: tiempo de ultrasonido (15-60 min), relación muestra/solvente (15- 75 mg mL⁻¹) y la

dilución del LGH previamente sintetizado (0- 75 %). Para la selección de los mismos se basó en reportes previos, y para la dilución de LGH también se consideraron los resultados obtenidos en el Capítulo 2 [26-28]. Como puede observarse en la Tabla 3.4, el diseño consistió en 18 experimentos con seis réplicas del punto central. Se consideró como variables respuesta el área de los ácidos ferúlico y cafeico y de quercetina. Estos fenoles fueron seleccionados según su naturaleza química y polaridad como así también por ensayos previos que determinaron su presencia en los extractos de *L. cuneifolia*.

Tabla 3.4. Datos experimentales de las respuestas evaluadas en extracción de compuestos fenólicos para *L. cuneifolia* utilizando el diseño de Box-Behnken (BB).

Corrida	Factores			Respuestas		
	Relación planta/solvente (mg mL ⁻¹)	Dilución de NADES	Tiempo de extracción	Caf	Fer	Quer
1	15	38	15	0,074	0,498	2,822
2	75	75	38	0,464	2,341	7,529
3	45	38	38	0,320	15,081	7,354
4	75	38	60	0,431	28,461	1,467
5	45	38	38	0,356	16,356	9,208
6	75	0	38	0,362	17,965	14,093
7	45	38	38	0,395	17,698	1,056
8	15	38	60	0,087	0,608	0,367
9	45	0	15	0,248	11,305	10,463

10	75	38	15	0,453	25,909	15,527
11	45	75	60	0,315	15,347	0,582
12	45	38	38	0,317	16,016	8,035
13	45	38	38	0,289	15,107	7,921
14	15	0	38	0,081	0,383	3,495
15	45	38	38	0,346	1,618	10,357
16	15	75	38	0,044	0,434	1,340
17	45	75	15	0,258	13,159	3,676
18	45	0	60	0,212	10,363	8,647

Los modelos que mejor explicaron el comportamiento de las respuestas fueron el modelo cuadrático para los ácidos ferúlico y cafeico y lineal para quercetina (Tabla 3.5). Los R^2 indican que los datos experimentales estuvieron en concordancia con las respuestas predichas para cada modelo. El *F-value* para la falta de ajuste de los modelos fue no significativo, indicando que representan adecuadamente los datos experimentales.

Tabla 3.5. Análisis de la varianza para los modelos seleccionados.

Respuesta	Modelo	p-valor*	p-valor*	R^2 adj.
		Modelo	Falta de ajuste	
Fer	Cuadrático	<0,0001	0,2784	0,9857
Caf	Cuadrático	<0,0001	0,5183	0,9227
Quer	Linear	<0,0001	0,2272	0,8235

Los modelos fueron representados por las siguientes ecuaciones (Eq. 5-7):

$$Caf = -0,13 + 0,01R + 3,46e^{-5} R^2 - 3,83e^{-5} D^2 \quad (5)$$

$$Fer = -0,76 + 0,02 R + 7,66e^{-3} D - 1,38e^{-4} R^2 - 8,41e^{-5} D^2 \quad (6)$$

$$Quer = 2,76 + 0,17R - 0,06D \quad (7)$$

donde, R: relación material vegetal/solvente y D: dilución de LGH

El *p*-valor muestra, con un nivel de confianza de 95 %, que la relación material vegetal/solvente fue significativa para las tres respuestas evaluadas mientras que el tiempo de ultrasonido no fue significativo para ellas (Eq. 3-5).

La función deseabilidad (D) se usó para la optimización simultánea de las condiciones de extracciones. El criterio para el análisis de las tres respuestas seleccionadas (Caf, Fer, Quer) fue maximizar el área cromatográfica de acuerdo a la composición fenólica de *L. cuneifolia*. Como puede verse en la Figura 3.3 la función deseabilidad aumenta cuando aumenta la relación material vegetal/solvente mientras que disminuye con la dilución de LGH.

Las condiciones experimentales óptimas (D=0,89) para la extracción fueron; relación material vegetal/solvente 75 mg mL⁻¹, LGH sin diluir y tiempo de ultrasonido 42 minutos. Con el fin de validar los resultados, se llevaron a cabo tres experimentos adicionales utilizando las condiciones óptimas. De ésta manera se confirmaron las condiciones óptimas de extracción. Es necesario resaltar que, el uso de herramientas quimiométricas contribuye a enverdecir el desarrollo de un método, debido a que reduce el número de experimentos (disminuyendo la cantidad de solvente utilizado y residuo generado, tiempo y consumo energético).

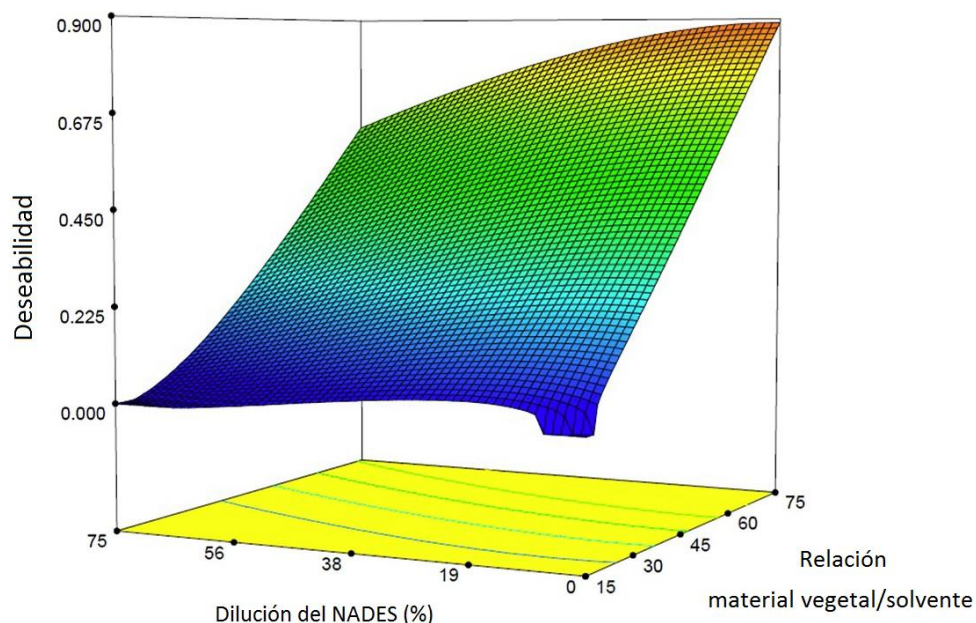


Figura 3.3. Gráfico de superficie-respuesta correspondiente a la función deseabilidad al optimizar la dilución de LGH y la relación material vegetal/solvente, manteniendo constante el tiempo de extracción en su valor óptimo (42 min).

Finalmente, se calcularon los PPs para el procedimiento propuesto alcanzando un total de 4,01 (Tabla 3.3) encontrándose entre los valores más bajos calculados. Por lo tanto, la metodología optimizada se aplicó para obtener los bioextractos (a partir de *L. divaricata*, *L. cuneifolia*, *T. vulgaris* y *O. vulgare*) caracterizados posteriormente en éste capítulo, así como también los extractos acuosos y metanólicos que se utilizaron para comparar la eficiencia de LGH como solvente.

3.3.3 Caracterización de los extractos

3.3.3.1 Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante

La técnica de Folin-Ciocalteu es ampliamente usada para estimar el contenido de polifenoles totales (TPC) en extractos de plantas. Por esto, se utilizó para comparar el TPC de los extractos obtenidos en los tres solventes seleccionados (agua, metanol y LGH), a partir de las cuatro plantas medicinales.

Los resultados revelaron diferencias significativas entre los diferentes solventes utilizados. Como puede verse en la Figura 3.4, los extractos acuosos mostraron los valores más bajos de TPC para todas las plantas bajo estudio. Interesantemente, los bioextractos en LGH, presentaron una mejor o similar performance cuando se compararon con los extractos metanólicos. Al comparar entre los bioextractos de las plantas estudiadas, es posible observar que el de *T. vulgaris* presentó los valores más bajos de TPC.

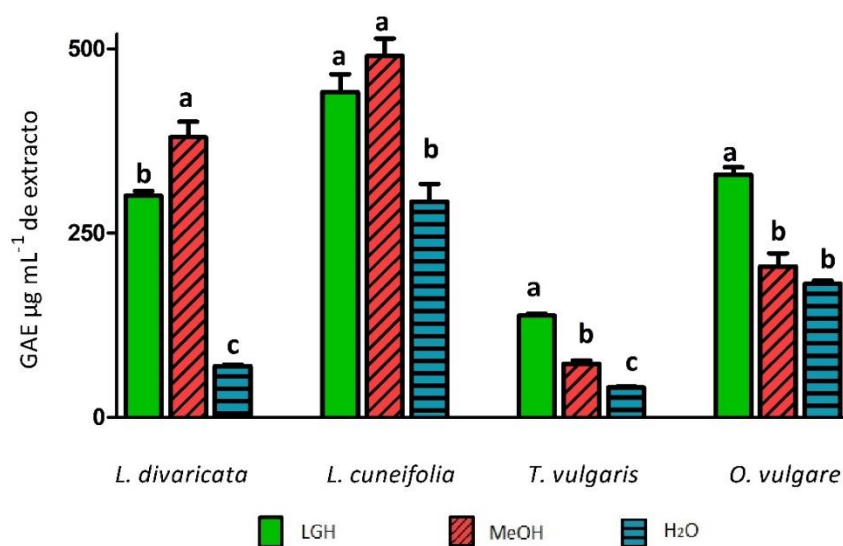


Figura 3.4. Contenido de polifenoles totales (GAE $\mu\text{g mL}^{-1}$) de los extractos al 5 % de plantas obtenidos con diferentes solventes (MeOH, H₂O y LGH). Letras distintas indican diferencias significativas para test de Tukey ($\alpha \leq 0,05$).

Numerosos reportes han demostrado que aquellas plantas que presentan un elevado contenido de fenoles también poseen una alta capacidad antioxidante [29, 30]. Esta propiedad hace referencia a la capacidad de secuestrar radicales libres impidiendo que estos ocasionen daños celulares. En los seres humanos existen procesos fisiológicos que generan radicales libres, los cuales pueden causar daños oxidativos afectando a proteínas, lípidos entre otros. Es por esto que la actividad antioxidante se asocia directa o indirectamente a las propiedades que poseen algunos extractos de plantas de reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, envejecimiento celular, cáncer, entre otros [31-33].

En general, los métodos para determinar la capacidad antioxidante de los extractos de plantas pueden desactivar los radicales libres por dos mecanismos: basados en la reacción de transferencia simple de electrón (SET) y basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) [34]. Por lo tanto, para evaluar la capacidad antioxidante se seleccionaron dos técnicas que involucran mecanismos distintos, DPPH* basado en SET y el test de ABTS que es basado en ambos mecanismos, SET y HAT (Figura 3.5).

Los resultados demostraron que para los dos métodos estudiados, los bioextractos en LGH presentaron mejor o similar actividad antioxidante que los extractos metanólicos mientras que los extractos acuosos presentaron los valores menores. Notablemente, los extractos de plantas que presentaron mayores TPC (*L. divaricata*, *L. cuneifolia* y *O. vulgare*), mostraron los porcentajes más elevados de capacidad antioxidante, siendo el extracto de *T. vulgaris*, el que mostró los valores menores. Esto se encuentra en concordancia con estudios previos que reportan correlación positiva significativa entre el TPC y la capacidad antioxidante [4, 35, 36].

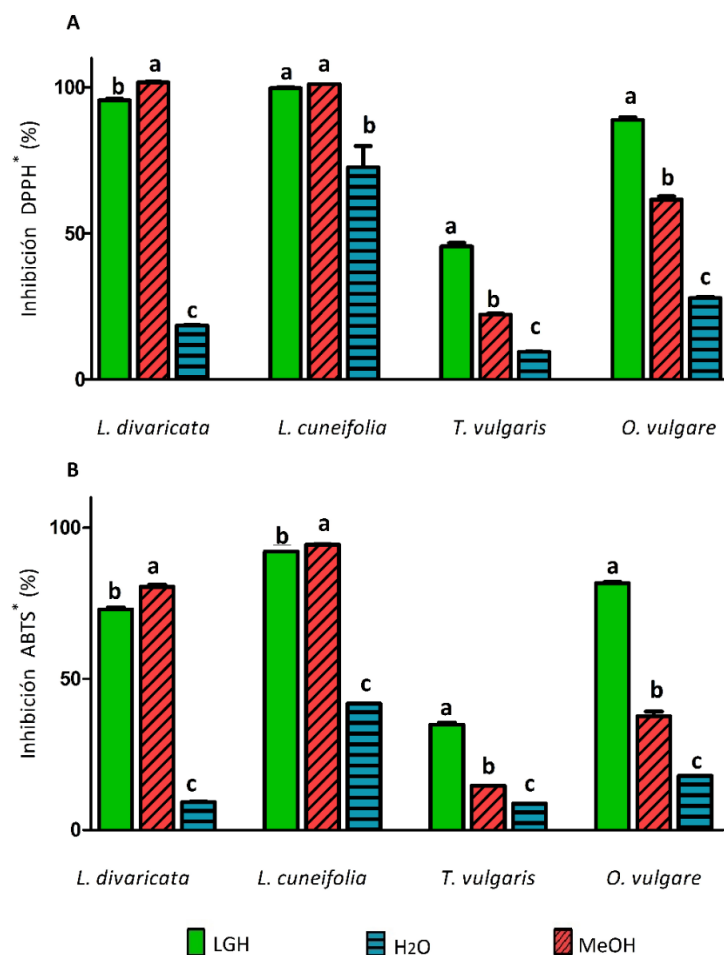


Figura 3.5. Capacidad antioxidante de diluciones de los extractos (2,5 %) de plantas obtenidos en diferentes solventes, determinada por los métodos DPPH* (A) y ABTS (B). Letras distintas indican diferencias significativas para test de Tukey ($\alpha \leq 0,05$).

3.3.3.2 Determinación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD

Luego de determinar la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales de los extractos, se procedió a la determinación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD. Los fenoles Caf, Fer, Ros, Cat, Cin, Tyr, Nar, Api, Quer, Lut, NDGA y Rut fueron seleccionados por su conocida presencia en el reino vegetal y teniendo en cuenta su diferente naturaleza química, polaridad y tamaño (Figura 1.2, Capítulo 1) [15, 37, 38]. Para su determinación, se desarrolló un procedimiento cromatográfico mediante una optimización *one-at-a-time*. Se

evaluaron las siguientes variables: composición de fase móvil y gradiente, temperatura y longitudes de onda de detección. Las condiciones óptimas se describen en la Sección 3.2.3.3, las cuales permitieron separar a los fenoles en 20 minutos.

En una primera etapa, al tratarse de un solvente nuevo, se trabajó no solo en el desarrollo del procedimiento cromatográfico; sino que también se evaluó el comportamiento del solvente eutéctico bajo este sistema de separación y detección. En este sentido, se analizaron los parámetros analíticos de los estándares y los tiempos de retención.

Las figuras de mérito de los estándares en LGH se muestran en la Tabla 3.6. Para todos los analitos bajo estudio, los coeficientes de correlación fueron $> 0,987$ y presentaron un intervalo de linealidad desde el valor de LOQ hasta al menos $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) se evaluaron en función de la relación señal/ruido (S/N) 3 o 10 respectivamente.

Tabla 3.6. Figuras de mérito para compuestos fenólicos en LGH.

Compuestos fenólicos	Tiempo de retención (min)	Curva de calibrado	R ²	LOD*	LOQ*
Tyr	5,323	$y = 0,0381x - 0,0211$	0,999	0,071	0,236
Cat	5,947	$y = 0,0253x + 0,0053$	0,994	0,079	0,263
Cin	12,390	$y = 0,4627x - 0,389$	0,999	0,003	0,011
Nar	15,307	$y = 0,2191x - 0,1884$	0,999	0,002	0,008
Caf	6,857	$y = 0,2437x + 0,0043$	0,998	0,011	0,038
Fer	9,273	$y = 0,5662x - 0,8642$	0,997	0,004	0,013
Ros	10,837	$y = 0,1122x - 0,1914$	0,990	0,016	0,053
Api	15,850	$y = 0,1445x - 0,1242$	0,989	0,002	0,005
Rut	8,463	$y = 0,0822x - 0,0573$	0,991	0,011	0,037
Quer	13,447	$y = 0,0132x + 0,0067$	0,987	0,098	0,328
Lut	13,793	$y = 0,1428x - 0,2661$	0,994	0,009	0,032
NDGA	17,327	$y = 0,0316x - 0,0374$	0,996	0,041	0,137

*LOD y LOQ expresados en $\mu\text{g mL}^{-1}$

La compatibilidad cromatográfica del solvente eutéctico se evaluó analizando los tiempos de retención de los compuestos fenólicos. La Figura 3.6 demuestra que al comparar el cromatograma de estándares en LGH, con los obtenidos en MeOH y H₂O, no se observaron desplazamientos.

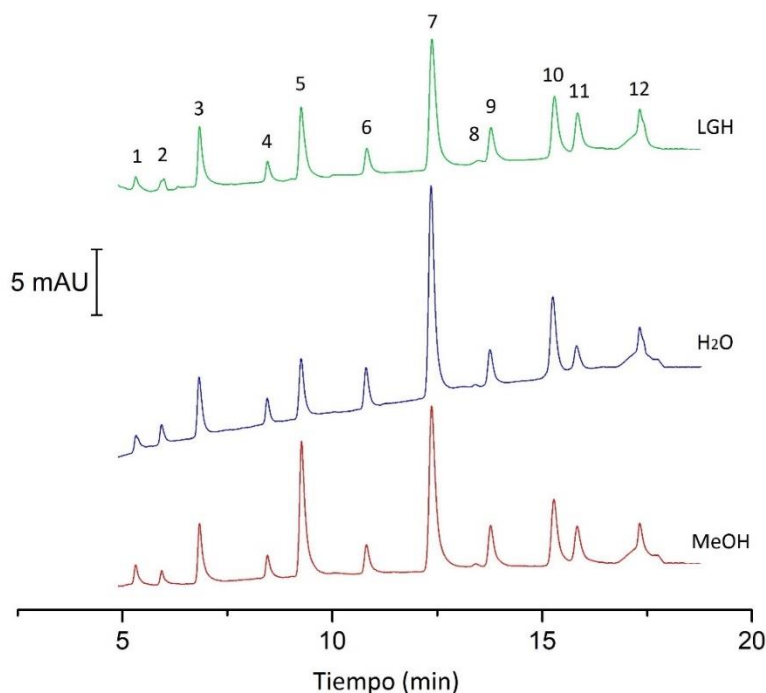


Figura 3.6. Cromatogramas de estándares de compuestos fenólicos ($5 \mu\text{g g}^{-1}$) en LGH, H₂O y MeOH a 280 nm. Tyr (1), cat (2), caf (3), rut (4), fer (5), ros (6), cin (7), quer (8), lut (9), nar (10), api (11), NDGA (12).

Posteriormente, se llevó a cabo una segunda etapa con el propósito de evidenciar el potencial de LGH como extractante de compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales. Para ello se evaluó su eficiencia de extracción frente a los solventes tradicionales H₂O y MeOH. LGH mostró una performance satisfactoria permitiendo extraer compuestos polares como así también de baja polaridad partir de *L. cuneifolia*, *L. divaricata*, *T. vulgaris* y *O. vulgare* (Figura 3.7).

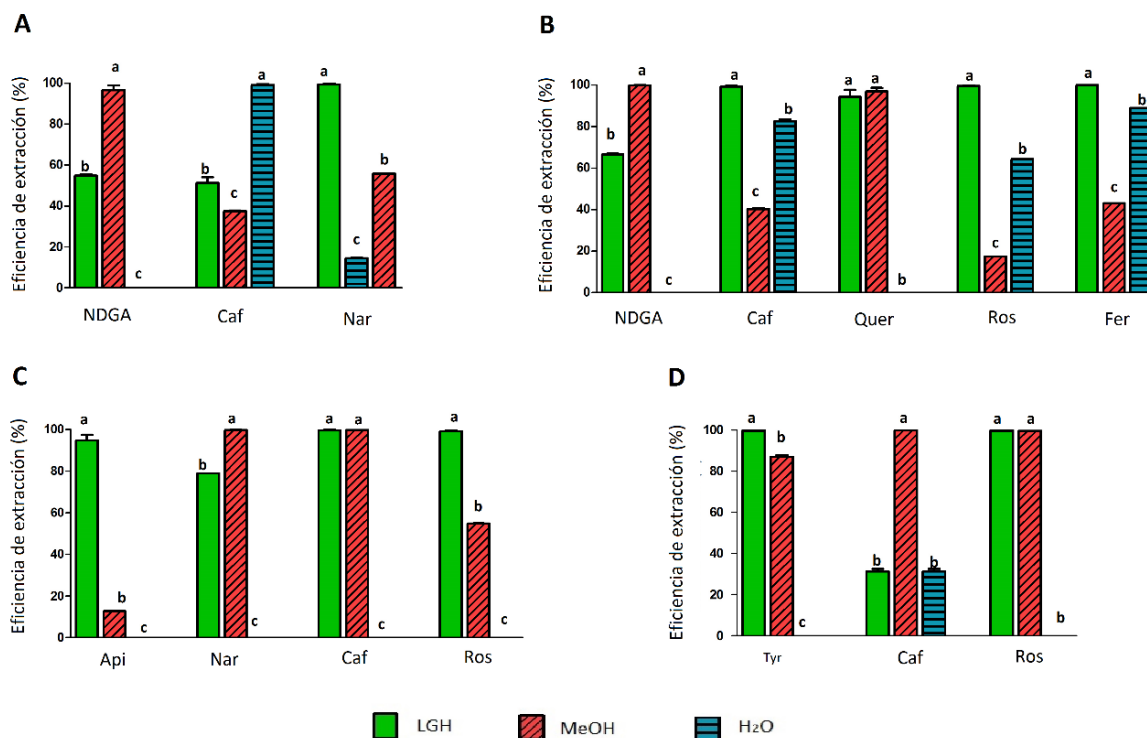


Figura 3.7. Eficiencia de extracción (%) de los diferentes solventes (H₂O, MeOH y LGH) para A: *L. divaricata*, B: *L. cuneifolia*, C: *T. vulgaris* y D: *O. vulgare*.

Analizando los resultados obtenidos, se pudo observar que para las especies de *Larrea* los solventes LGH y MeOH permitieron obtener extractos con mayor número de compuestos fenólicos al compararlos con los respectivos extractos acuosos. Además, para aquellos compuestos polares como Caf y Fer, LGH demostró rendimientos comparables a H₂O.

El extracto acuoso de *T. vulgaris* no presentó ninguno de los compuestos bajo estudio, mientras que para *O. vulgare*, H₂O permitió extraer únicamente Caf. Para ambas plantas LGH y MeOH demostraron eficiencias similares.

Reportes previos han destacado la habilidad de los NADES para la extracción de compuestos de distinta polaridad. Wang y colaboradores [39] diseñaron un NADES compuesto por xilitol:glicerol:D (-) fructosa, que permitió extraer cinco biocompuestos de diferente naturaleza a partir de *Ficus carica* L. con rendimientos mayores a metanol. Dai y colaboradores [5] evaluaron la estabilidad de moléculas poco solubles en agua entre ellas

rutina, cartamina, quercetina y DNA demostrando un gran aumento en la solubilidad para las distintas combinaciones de NADES estudiadas.

3.3.3.2.1 Parámetros analíticos

3.3.3.2.1.1 Efecto matriz

Una vez obtenidas las condiciones cromatográficas óptimas, comprobada la compatibilidad de LGH con el sistema de separación y detección; y demostrada la eficiencia de extracción del eutéctico, se realizaron estudios de efecto matriz de las muestras. La determinación de este parámetro es importante para una correcta cuantificación, debido a que la respuesta obtenida a partir de una solución estándar puede diferir significativamente cuando se introduce en matrices complejas [40].

Para evaluar el efecto matriz se comparó la señal de los analitos en soluciones estándares (solvente puro) con la señal de los mismos en las matrices bajo estudio. Con este fin, se prepararon curvas de calibrado en LGH y en los 4 bioextractos en un rango de concentración de 5 – 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para realizar las curvas en matriz, el material vegetal fue fortificado previo a la extracción. El efecto matriz puede calcularse como el porcentaje del cociente de las pendientes de las curvas de calibrado entre las muestras fortificadas y el solvente puro (Eq. 8), indicando de esta forma si existe un efecto supresor o de exaltación en la señal.

$$\text{Efecto Matriz (\%)} = 100 - \left[\left(\frac{b_{mf}}{b_s} \right) \times 100 \right] \quad (8)$$

donde; b_{mf} es la pendiente de la curva de las muestras fortificadas, b_s es la pendiente de la curva en solvente puro.

Analizando los resultados obtenidos, se observó que las diferentes matrices causan cambios en las pendientes y ordenadas al origen de las curvas de calibrado. Este comportamiento es atribuido a errores causados por los componentes de la propia matriz [40]. Para los cuatro bioextractos bajo estudio se pudieron observar efectos en el intervalo de 24-100 %. En la Figura 3.8 se muestran los calibrados para ácido cafeico en el bioextracto

de *L. divaricata* (efecto matriz de 5 %) y para ácido ferúlico en *L. cuneifolia* (efecto matriz de 52 %). De acuerdo a lo anteriormente mencionado, la cuantificación se llevó a cabo siguiendo el método del agregado patrón. Por otro lado, se pudo comprobar que la matriz no generó diferencias en los tiempos de retención de los compuestos fenólicos detectados en ninguna de las muestras.

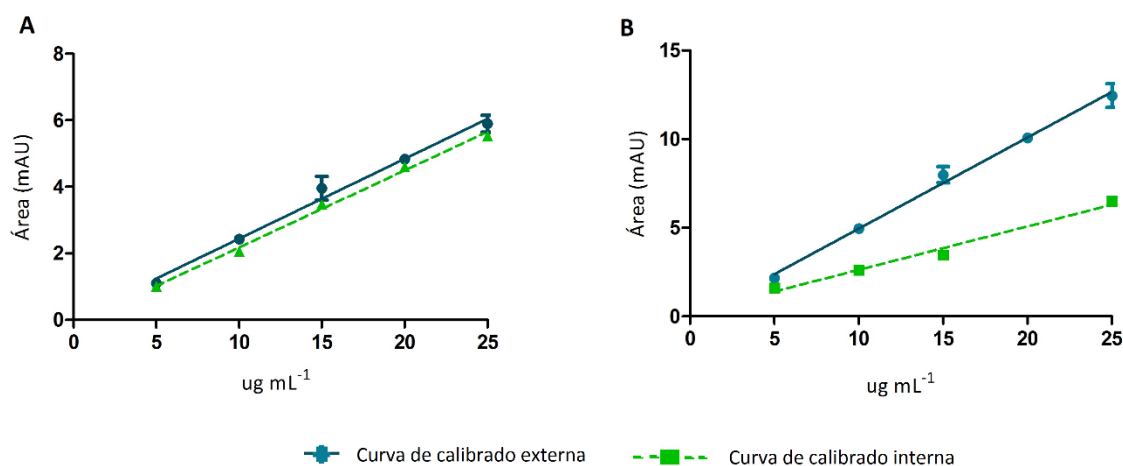


Figura 3.8. Efecto de matriz, A: ácido cafeico (bioextracto de *L. divaricata*) y B: ácido ferúlico (bioextracto de *L. cuneifolia*).

3.3.3.2.1.2 Figuras de mérito

Las figuras de mérito para los compuestos fenólicos determinados en cada matriz se presentan en la Tabla 3.7. Los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) fueron evaluados en función de la relación señal/ruido (S/N) 3 o 10 respectivamente. Los coeficientes de correlación fueron satisfactorios.

Con el fin de estimar la robustez del método se evaluó la reproducibilidad inter-día, tanto para los tiempos de retención (t_R) como para las áreas. Para ello, las muestras fueron fortificadas previo al proceso de extracción (5, 15 and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se realizaron tres extracciones de cada muestra adicionada. Los resultados de reproducibilidad se encontraron entre 0,051 y 9,717 %.

Tabla 3.7. Parámetros analíticos para compuestos fenólicos en los distintos bioextractos.

	Compuestos fenólicos	tR (min)	Curva de calibrado	R ²	LOD*	LOQ*	Reproducibilidad (RSD %)	
							tR	área
<i>L. divaricata</i>	Caf	6,844	$y = 0,2262x - 0,0538$	0,997	0,014	0,018	0,034	9,717
	Nar	15,299	$y = 0,1885x + 0,4288$	0,991	0,007	0,024	0,011	0,834
	NDGA	17,326	$y = 0,0173x + 0,0062$	0,999	0,161	0,538	0,026	0,702
<i>L. cuneifolia</i>	Caf	6,851	$y = 0,2435x - 0,2806$	0,982	0,002	0,005	0,025	1,053
	Fer	9,271	$y = 0,2448x + 0,1804$	0,981	0,009	0,043	0,019	0,051
	Ros	10,789	$y = 0,1181x + 0,0712$	0,999	0,028	0,093	0,016	0,053
	Quer	13,432	$y = 0,018x + 0,0407$	0,979	0,094	0,314	0,013	2,867
	NDGA	17,329	$y = 0,0173x + 0,0364$	0,999	0,050	0,165	0,010	1,217
<i>T. vulgaris</i>	Caf	6,849	$y = 0,2235x - 0,0237$	0,988	0,007	0,024	0,025	0,314
	Ros	10,814	$y = 0,2318x + 2,6942$	0,925	0,001	0,004	0,047	1,129
	Nar	15,301	$y = 0,2527x - 0,4186$	0,999	0,008	0,028	0,011	0,231
	Api	15,844	$y = 0,1141x - 0,1578$	0,987	0,013	0,044	0,015	5,749
<i>O. vulgare</i>	Tyr	5,351	$y = 0,0512x - 0,0401$	0,999	0,025	0,084	0,032	0,272
	Caf	6,850	$y = 0,2188x + 0,4567$	0,975	0,016	0,054	0,044	3,239
	Ros	10,805	$y = 1,0065x + 1,0767$	0,984	0,003	0,010	0,063	0,392

* LOD y LOQ expresados en $\mu\text{g mL}^{-1}$

tR: tiempo de retención

Finalmente, para determinar la exactitud del método se llevó a cabo el estudio de recuperación. Con la metodología propuesta se analizó el contenido de fenoles en seis porciones de bioextracto vegetal. Las concentraciones medias determinadas para cada compuesto fueron tomadas como valor base. Posteriormente, se añadieron concentraciones conocidas de los analitos en tres niveles de concentración (5, 15 y 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a cuatro muestras de extracto vegetal y los fenoles se determinaron siguiendo el mismo procedimiento. Los resultados para 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se muestran en la Tabla 3.8, como puede observarse, los valores de recuperación obtenidos resultaron satisfactorios observándose entre 90-115 % para los compuestos bajo estudio.

Tabla 3.8. Estudio de recuperación de compuestos fenólicos en los bioextractos.

		Concentración base	Concentración agregada	Concentración obtenida	Recuperación (%)
<i>L. divaricata</i>	Nar	2,232	25	29,329	108,390
	Caf	2,940	25	27,394	97,816
	NDGA	86,944	25	110,349	93,618
<i>L. cuneifolia</i>	Caf	7,649	25	30,719	92,283
	Fer	12,130	25	38,668	106,154
	Ros	111,426	25	139,958	114,127
	Quer	170,630	25	198,748	112,474
	NDGA	79,174	25	106,464	109,162
<i>T. vulgaris</i>	Caf	17,795	25	42,040	96,980
	Nar	8,970	25	32,442	93,886
	Api	8,595	25	31,547	91,807
<i>O. vulgare</i>	Tyr	29,696	25	53,781	96,341
	Caf	0,404	25	25,765	101,443

3.3.3.2.2 Determinación de fenoles en los bioextractos

El procedimiento cromatográfico desarrollado se aplicó a la determinación de compuestos fenólicos en los bioextractos (*L. divaricata*, *L. cuneifolia*, *T. vulgaris* y *O. vulgare*) obtenidos mediante la metodología mediada por NADES-UAE previamente optimizada.

Los cromatogramas demostraron diferencias en los perfiles entre los bioextractos de las 4 plantas evaluadas (Figura 3.9). Asimismo, al analizar los resultados obtenidos, se observaron diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre los bioextractos en su contenido de fenoles (Tabla 3.9). Entre los compuestos evaluados, el ácido cafeico fue el único determinado en todos los bioextractos.

Los bioextractos de *L. cuneifolia* y *L. divaricata* presentaron como compuesto mayoritario a NDGA; de acuerdo con reportes previos este compuesto es representativo de las especies de *Larrea* [11, 15]. Cabe destacar que entre ambas especies del género *Larrea* se observaron diferencias en los fenoles encontrados, siendo quercetina, y los ácidos rosmarínico y ferúlico encontrados únicamente en el bioextracto de *L. cuneifolia*, mientras que naringenina solo se detectó en *L. divaricata*.

En los bioextractos de *T. vulgaris* y *O. vulgare*, el compuesto mayoritario fue Ros, el cual es característico de plantas que pertenecen a la familia de las Lamiáceas [37, 41]. La concentración del mismo fue mayor en el bioextracto de orégano. De acuerdo a los resultados obtenidos en las secciones anteriores, este bioextracto fue también el que presentó mayor contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante al compararlo con tomillo.

Interesantemente, ambos biocompuestos mayoritarios (Ros y NDGA) han sido reportados por su elevado poder antioxidante y por sus propiedades antimicrobianas [42-44].

Tabla 3.9. Concentración de compuestos fenólicos en los bioextractos ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Compuestos fenólicos	Bioextractos ^a			
	<i>L. cuneifolia</i>	<i>L. divaricata</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>O. vulgare</i>
Quer	170,980 \pm 4,966	n.d	n.d	n.d
Caf	7,649 \pm 0,068	2,200 \pm 0,037	17,795 \pm 0,056	0,49 \pm 0,11
Fer	12,130 \pm 0,007	n.d	n.d	n.d
Ros	111,426 \pm 0,059	n.d	43,002 \pm 0,617	137,563 \pm 0,543
Nar	n.d	1,833 \pm 0,037	8,970 \pm 0,017	n.d
NDGA	8125,694 \pm 70,093	8304,123 \pm 58,258	n.d	n.d
Tyr	n.d	n.d	n.d	29,70 \pm 0,08
Api	n.d	n.d	8,595 \pm 0,415	n.d

nd: no detectado

^a media \pm error estándar (n = 3)

La presencia de naringenina y ácido cafeico fue reportada en extractos acuosos de *L. divaricata* por Boiteux y colaboradores [13]. Además estos autores determinaron quercetina, luteonina y los ácido cinámico y vanillico en este extracto. En *L. cuneifolia*, Valesi y colaboradores [45] identificaron la presencia de metil-ésteres de quercetina y kaempferol en un extracto 80 % acuoso metanólico.

Previos reportes demostraron la presencia tanto de ácido rosmarínico como de ácido cafeico en extractos de *O. vulgare* [37]. En concordancia con los resultados obtenidos, Aguilar y colaboradores [46] demostraron la presencia de naringenina, apigenina y el ácido rosmarinico en extractos de tomillo.

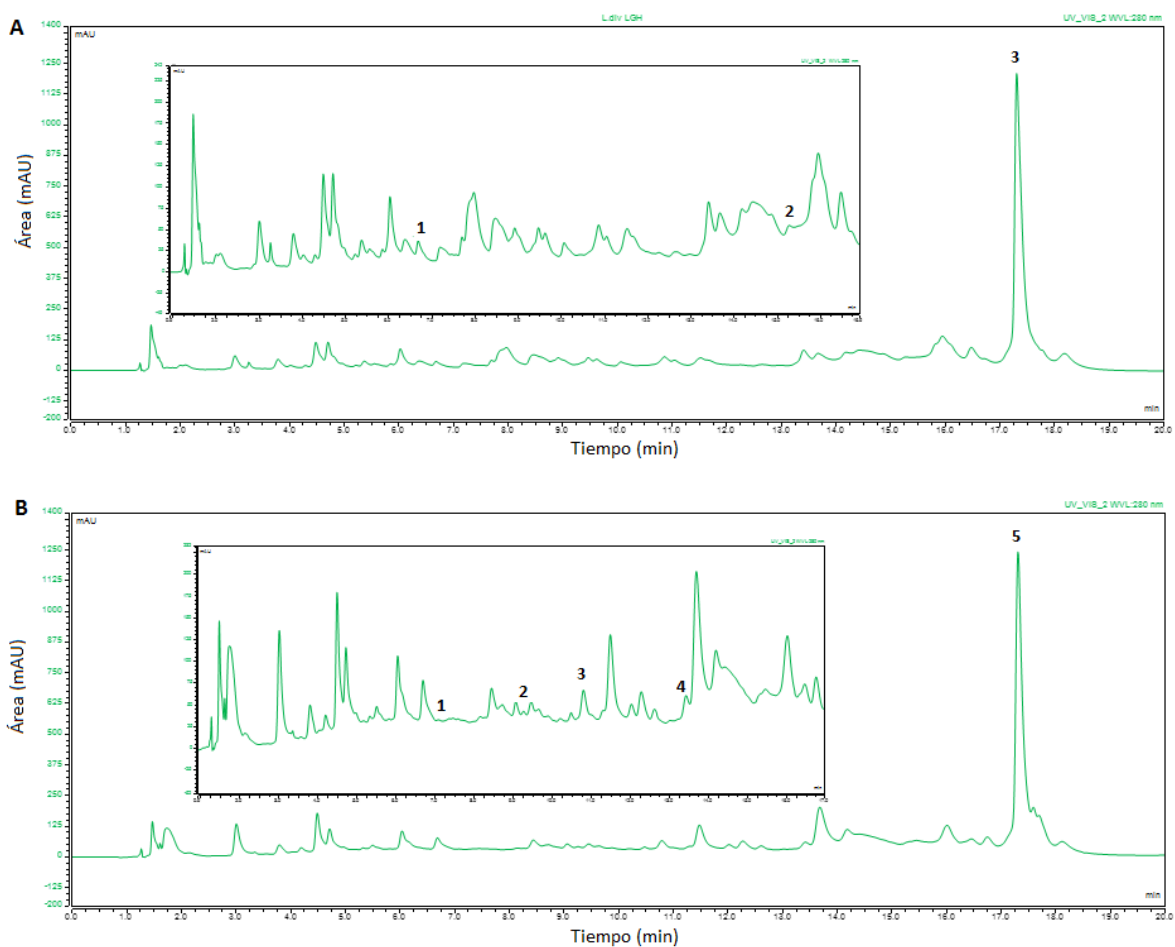


Figura 3.9. Cromatogramas de los bioextractos obtenidos a 280 nm . **A:** *L. divaricata* (1: Caf, 2: Nar, 3: NDGA) y **B:** *L. cuneifolia* (1: Caf, 2: Fer, 3: Ros, 4: Quer y 5: NDGA).

3.3.3.3 Determinación de alcaloides por HPLC-DAD

La mayor parte de los reportes acerca de la aplicación de los NADES como extractantes está destinada a la extracción de compuestos fenólicos (fenoles simples, flavonoides, antocianinas). Sin embargo, su aplicación para extraer otros compuestos bioactivos tales como alcaloides, compuestos volátiles o terpenos; aun es un área poco explorada. La extracción de alcaloides mediada por solventes eutécticos fue reportada por primera vez en 2016 por Duan y colaboradores [47]. Estos autores evaluaron distintas combinaciones de DES y NADES para la extracción de alcaloides isoquinolínicos a partir de matrices vegetales,

demostrando una mayor eficiencia de extracción para las combinaciones eutécticas basadas en ácidos carboxílicos cuando se las comparo con metanol.

En este contexto, se propuso evaluar la capacidad de LGH para solubilizar y extraer alcaloides. Para ello se seleccionaron seis alcaloides: harmalina, teofilina, teobromina, piperina y cafeína (Figura 1.3, Capítulo 1), que fueron elegidos en base a reportes previos que demuestran su presencia en plantas y su bioactividad [48-50].

En primer lugar, se desarrolló un procedimiento cromatográfico para la determinación de los alcaloides. Se evaluaron las siguientes variables utilizando una optimización one-at-a-time: composición de fase móvil y gradiente, temperatura y longitudes de onda de detección. Los alcaloides fueron separados en 12,5 minutos y las condiciones óptimas se describen en la Sección 3.2.4.4.

Los parámetros analíticos de los estándares en LGH se muestran en la Tabla 3.10. Para todos los analitos bajo estudio, los coeficientes de correlación fueron $> 0,9816$. Se evaluaron los tiempos de retención y se los comparó con los observados para los solventes tradicionales. Al igual que el comportamiento observado para fenoles, los tiempos de retención de los estándares en LGH no presentaron desplazamientos al compararlos con los registrados para MeOH y H₂O (Figura 3.10).

Tabla 3.10. Parámetros analíticos para los estándares en LGH.

Alcaloide	Tiempo de retención (min)	Curva de calibrado	R ²	LOD*	LOQ*
Teob	2,610	$y = 0,0111x + 0,03$	0,9816	0,011	0,037
Teof	3,207	$y = 0,0957x - 0,0285$	0,9994	0,003	0,009
Cafe	3,750	$y = 0,0459x + 0,001$	0,9993	0,003	0,009
Pip	10,793	$y = 0,0908x - 0,0067$	0,9987	0,002	0,007
Harm	4,470	$y = 0,0945x - 0,0531$	0,9996	0,001	0,004

*LOD y LOQ expresados en $\mu\text{g mL}^{-1}$

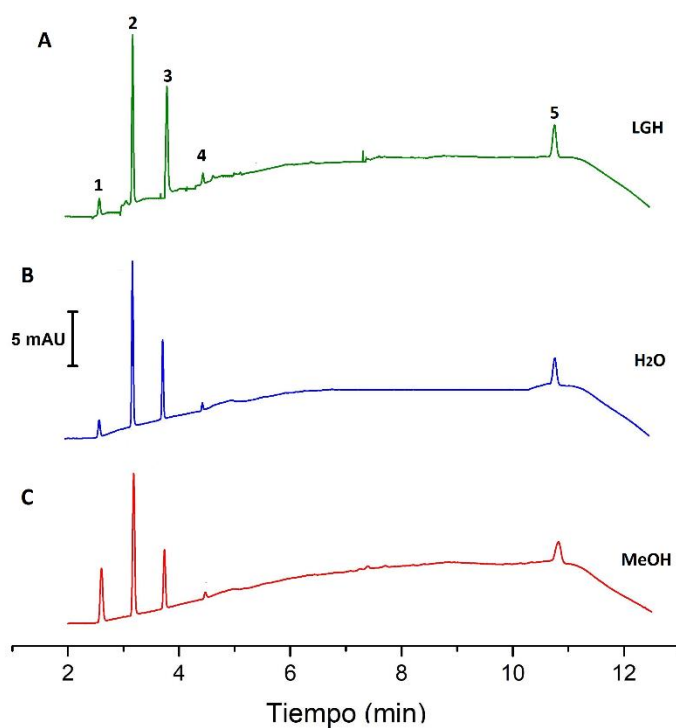


Figura 3.10. Cromatogramas de estándares de alcaloides ($5 \mu\text{g g}^{-1}$) en LGH, H₂O y MeOH a 280 nm. Teob (1), Teof (2), Cafe (3), Harm (4), Pip (5). Tanto Harm como Pip no se muestran en su máxima longitud de onda.

Luego, una vez desarrollado el procedimiento cromatográfico, se procedió a evaluar la eficiencia del solvente verde para la extracción de alcaloides a partir de matrices vegetales (*L. divaricata*, *L. cuneifolia*, *T. vulgaris* y *O. vulgare*). Para ello, se compararon los bioextractos con extractos obtenidos en solventes tradicionales (H₂O y MeOH).

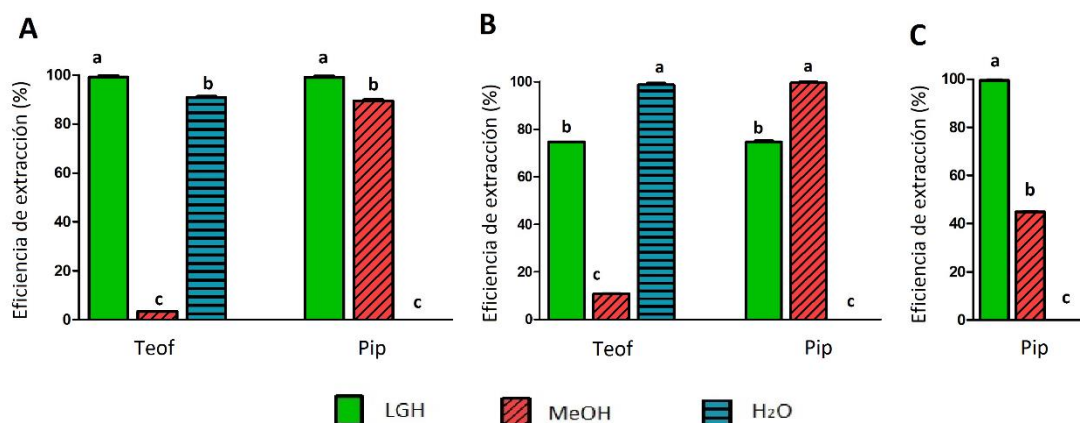


Figura 3.11. Eficiencia de extracción (%) de los diferentes solventes para A: *L. divaricata*, B: *L. cuneifolia*, C: *T. vulgaris*.

Los resultados demuestran diferencias significativas entre los solventes bajo estudio (Figura 3.11). Como puede observarse en la Figura 3.11, piperina se determinó en los extractos de *L. divaricata*, *L. cuneifolia* y *T. vulgaris* obtenidos tanto con LGH como con MeOH, mientras que no se detectó en los acuosos. Estos resultados están de acuerdo a lo reportado por Zarai y colaboradores [50], quienes evaluaron la extracción de piperina con distintos solventes orgánicos y con agua, demostrando para metanol y etanol rendimientos significativamente mayores al compararlos con los extractos acuosos.

Por otro lado, teofilina fue encontrada en ambas especies de *Larrea* siendo la eficiencia de extracción de LGH y H₂O notablemente superior a metanol. Teofilina es un alcaloide soluble en agua, presente en las infusiones de *Camelia sinensis* (té) y de distintas especies de *Ilex spp* (yerba mate) entre otras plantas [51, 52].

Cabe destacar que los tres extractos de orégano (LGH, MeOH y H₂O), no presentaron ninguno de los alcaloides estudiados. Para el extracto acuoso de tomillo se observó el mismo comportamiento; sin embargo, MeOH y LGH permitieron determinar piperina como se mencionó previamente.

3.3.3.3.1 Parámetros analíticos

3.3.3.3.1.1 Efecto matriz

Una vez obtenidas las condiciones cromatográficas óptimas se determinó el efecto matriz de las muestras. El mismo se evaluó siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 3.3.3.2.1.1 para fenoles y calculado según la Eq. 8.

En la Figura 3.12 se muestran los calibrados para teofilina en el bioextracto de *L. cuneifolia* (efecto matriz 7 %) y piperina en el de *L. divaricata* (efecto matriz 33 %). Analizando los resultados obtenidos, se pudo observar que los bioextractos de *L. cuneifolia* y *T. vulgaris* presentaron un efecto matriz menor al 15 %. Sin embargo, el efecto matriz para *L. divaricata* fue mayor a 30 % para los dos compuestos detectados. De acuerdo a esto, se empleó el método de agregado patrón para todas las muestras. Al igual que para la determinación de compuestos fenólicos, no se observaron diferencias en los tiempos de retención de los alcaloides detectados en ninguna de las muestras.

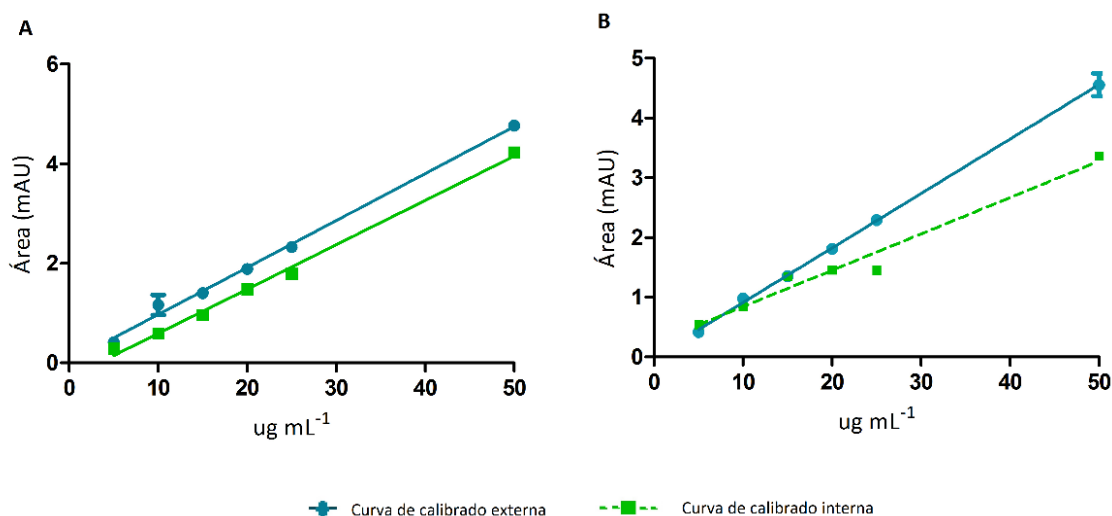


Figura 3.12. Efecto de matriz, A: teofilina (bioextracto de *L. cuneifolia*.) y B: piperina (bioextracto de *L. divaricata*).

3.3.3.3.1.2 Figuras de mérito

Las figuras de mérito para los alcaloides determinados en cada matriz se presentan en la Tabla 3.11. Los coeficientes de correlación fueron mayores a $>0,974$. Los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) fueron evaluados en función de la relación señal/ruido (S/N) 3 o 10 respectivamente.

Con el fin de estimar la robustez del método se evaluó la repetibilidad intra-día, tanto para los tiempos de retención (tR) como para las áreas. Para ello, las muestras fueron fortificadas previo al proceso de extracción (5, 25 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), tres extracciones de la misma muestra adicionada fueron llevadas a cabo antes del proceso cromatográfico.

Tabla 3.11. Figuras de mérito para alcaloides en los distintos bioextractos.

Bioextractos	ALC	tR (min)	Curva de calibrado	R ²	LOD*	LOQ*	Reproducibilidad (RSD %)	
							tR	área
<i>L. divaricata</i>	Teof	3,192	$y = 0,062x + 0,5494$	0,982	0,023	0,078	0,090	1,019
	Pip	10,770	$y = 0,061x + 0,2391$	0,974	0,024	0,081	0,054	0,952
<i>L. cuneifolia</i>	Teof	3,189	$y = 0,089x - 0,2965$	0,994	0,025	0,082	0,091	0,194
	Pip	10,779	$y = 0,0851x + 0,0509$	0,981	0,021	0,069	0,102	1,163
<i>T. vulgaris</i>	Pip	10,797	$y = 0,0796x - 0,0995$	0,998	0,008	0,027	0,033	0,484

ALC: Alcaloides, tR: tiempo de retención, *LOD y LOQ expresados en $\mu\text{g mL}^{-1}$

Luego, para determinar la exactitud del método se llevó a cabo el estudio de recuperación. Con la metodología propuesta se analizó el contenido de alcaloides en seis porciones de extracto vegetal. Las concentraciones medias determinadas para cada compuesto fueron tomadas como un valor base. Posteriormente, se añadieron tres concentraciones conocidas (5, 15 y 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de los analitos a cuatro muestras de extracto vegetal y los alcaloides se determinaron siguiendo el mismo procedimiento. Los porcentajes de recuperación para 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se muestran en la Tabla 3.12, como puede verse, los valores resultaron satisfactorios, con porcentajes comprendidos entre 80 y 120 %.

Tabla 3.12 Estudio de recuperación de alcaloides en los bioextractos

		Concentración base*	Concentración agregada*	Concentración encontrada*	Recuperación (%)
<i>L. divaricata</i>	Teof	24,730	25	54,689	119,837
	Pip	44,844	25	69,459	98,461
<i>L. cuneifolia</i>	Teof	66,006	25	86,118	80,449
	Pip	33,129	25	56,470	93,366
<i>T. vulgaris</i>	Pip	2,531	25	24,866	89,342

* Concentraciones expresadas en $\mu\text{g mL}^{-1}$

3.3.3.3.2 Determinación de alcaloides en los bioextractos.

El procedimiento cromatográfico se aplicó para la determinación de alcaloides en los bioextractos (*L. divaricata*, *L. cuneifolia*, *T. vulgaris* y *O. vulgare*) obtenidos mediante la metodología mediada por NADES-UAE previamente optimizada (Figura 3.13).

Como puede observarse en la Tabla 3.13, las especies de *Larrea* presentaron diferencias en su contenido entre los alcaloides bajo estudio. El compuesto mayoritario en *L. cuneifolia* fue Teofilina mientras que para *L. divaricata* fue piperina. Éste compuesto fue el único encontrado en *T. vulgaris*, mientras que de los alcaloides estudiados ninguno fue detectado en *O. vulgare*.

Tabla 3.13. Contenido de alcaloides en los bioextractos ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Alcaloides	Bioextracto ^a			
	<i>L. divaricata</i>	<i>L. cuneifolia</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>O. vulgare</i>
Teof	24,730 \pm 0,342	66,005 \pm 0,122	n.d	n.d
Pip	44,844 \pm 0,464	33,128 \pm 0,392	2,531 \pm 0,006	n.d
Harm	n.d	n.d	n.d	n.d
Teob	n.d	n.d	n.d	n.d
Cafe	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d: no detectado.

^a media \pm error estándar (n = 3).

Si bien existen reportes acerca de la composición fenólica de las plantas bajo estudio, no se encontraron estudios previos acerca de la presencia de alcaloides. Teofilina es un alcaloide que si bien se encuentra principalmente en té y yerba mate, también está presente en otras especies vegetales. Soto y colaboradores demostraron la presencia de este alcaloide en polen, néctar y flores de cebolla [48]. Por otro lado, piperina es característica de plantas de la familia Piperaceae, a las cuales pertenece *Piper nigrum* (pimienta) [50], la cuál ha sido reportada en plantas de otras familias como *Ludwigia hyssopifolia* [49].

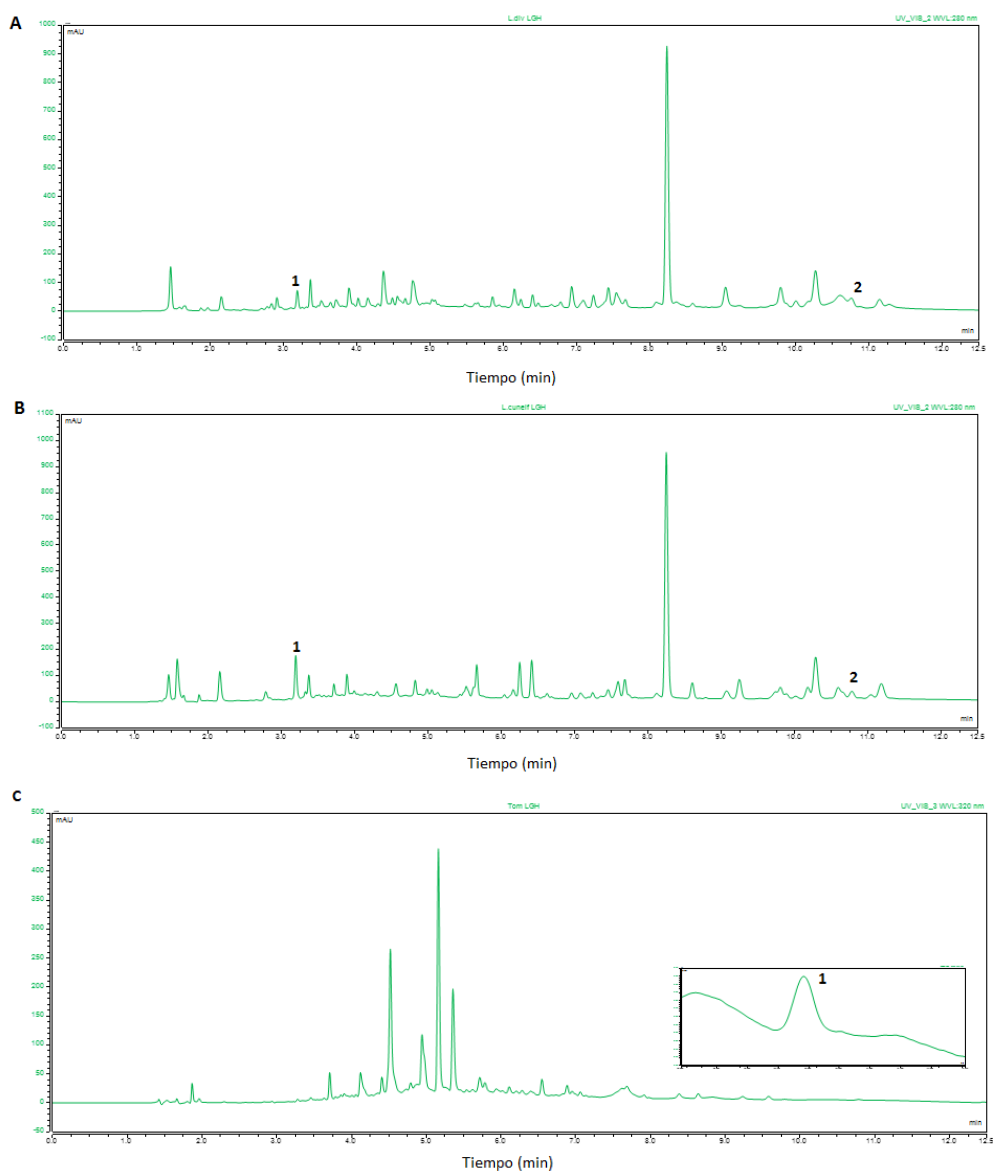


Figura 3.13. Cromatogramas de los bioextractos, **A:** *L. divaricata* (1: Teof, 2: Pip), **B:** *L. cuneifolia*; obtenidos a 280 nm y **C:** *T. vulgaris* (1: Pip) a 320 nm.

3.4 Conclusiones parciales

En este capítulo, se optimizó un procedimiento de extracción mediado por ultrasonido y solventes verdes para la extracción de compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales. La metodología, evaluada según el Certificado Verde, presentó bajos puntos de penalidad demostrando su sustentabilidad.

El procedimiento se aplicó satisfactoriamente a la extracción de compuestos fenólicos a partir de *L. divaricata*, *L. cuneifolia*, *T. vulgaris* y *O. vulgare*. Se caracterizó a LGH en términos de su eficiencia de extracción. El solvente diseñado, demostró excelente capacidad para extraer compuestos fenólicos polares como así también de baja polaridad. Interesantemente, LGH permitió la determinación de alcaloides en los extractos. Como se estableció, existen escasos reportes acerca de la extracción de alcaloides mediada por NADES, por lo que estos resultados contribuyen a extender las aplicaciones de estos sistemas eutécticos.

Se desarrollaron metodologías por HPLC-DAD para determinar fenoles y alcaloides en los extractos. En una primera etapa, la evaluación del comportamiento de soluciones estándares en LGH y su comparación con solventes tradicionales, permitió demostrar la compatibilidad del NADES con este sistema de separación y detección.

Considerando el comportamiento satisfactorio del solvente eutéctico, se seleccionaron los bioextractos obtenidos con LGH para su caracterización. Los resultados mostraron diferencias en el contenido de fenoles entre las plantas, siendo el ácido cafeico el único compuesto presente en todas las plantas bajo estudio. La metodología permitió determinar NDGA en los extractos de *Larrea*; compuesto característico de estas especies, mientras que los extractos de *T. vulgaris* y *O. vulgare* presentaron elevadas concentraciones de ácido rosmarínico, compuesto característico de la familia Lamiáceas a la cual pertenecen. Asimismo, se determinaron los alcaloides teofilina y piperina en los extractos de *Larreas* y solamente piperina en el de *T. vulgaris*. Cabe destacar que no existen reportes acerca de la evaluación de alcaloides en estas plantas.

3.5 Bibliografía

- [1] C. Piccirillo, S. Demiray, A.S. Ferreira, M. Pintado, P.M. Castro, Chemical composition and antibacterial properties of stem and leaf extracts from *Ginja cherry* plant, *Industrial crops and products* 43 (2013) 562-569.
- [2] T. Belwal, S.M. Ezzat, L. Rastrelli, I.D. Bhatt, M. Daglia, A. Baldi, H.P. Devkota, I.E. Orhan, J.K. Patra, G. Das, A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: trends, priorities, industrial uses and optimization strategies, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2018).
- [3] A. Ali, X.Y. Lim, C.H. Chong, S.H. Mah, B.L. Chua, Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from *Piper betle* using response surface methodology, *LWT* 89 (2018) 681-688.
- [4] D.E. Yoo, K.M. Jeong, S.Y. Han, E.M. Kim, Y. Jin, J. Lee, Deep eutectic solvent-based valorization of spent coffee grounds, *Food Chemistry* 255 (2018) 357-364.
- [5] Y. Dai, J. van Spronsen, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Analytica Chimica Acta* 766 (2013) 61-68.
- [6] S. Armenta, S. Garrigues, M. Guardia, *The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry*, 2015.
- [7] D. Raynie, J. Driver, *Green Assessment of Chemical Methods*, 2009.
- [8] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3) (1965) 144-158.
- [9] A.M. Nuutila, R. Puupponen-Pimiä, M. Aarni, K.-M. Oksman-Caldentey, Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity, *Food Chemistry* 81(4) (2003) 485-493.
- [10] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine* 26(9) (1999) 1231-1237.
- [11] M. Silvia, A.C. N., G.-R.I.d. la, M.S. I., T.J. A., Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from *Larrea tridentata* by microwave-assisted extraction, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 85(8) (2010) 1142-1147.
- [12] W. Luo, C.Y. Ang, T.A. Gehring, T.M. Heinze, L.J. Lin, A. Mattia, Determination of phenolic compounds in dietary supplements and tea blends containing *Echinacea* by liquid chromatography with coulometric electrochemical detection, *Journal of AOAC International* 86(2) (2003) 202-8.
- [13] B. Joana, V.C. Soto, P. Pablo, L. Gabriela, S.M. Fernanda, Phenolic characterization and antimicrobial activity of folk medicinal plant extracts for their applications in olive production, *ELECTROPHORESIS* 35(11) (2014) 1709-1718.
- [14] M.H.C. Moura, M.G. Cunha, M.R. Alezandro, M.I. Genovese, Phenolic-rich jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) extracts prevent high-fat-sucrose diet-induced obesity in C57BL/6 mice, *Food research international* (Ottawa, Ont.) 107 (2018) 48-60.
- [15] M.C. Varela, I. Arslan, M.A. Reginato, A.M. Cenzano, M.V. Luna, Phenolic compounds as indicators of drought resistance in shrubs from Patagonian shrublands (Argentina), *Plant Physiology and Biochemistry* 104 (2016) 81-91.

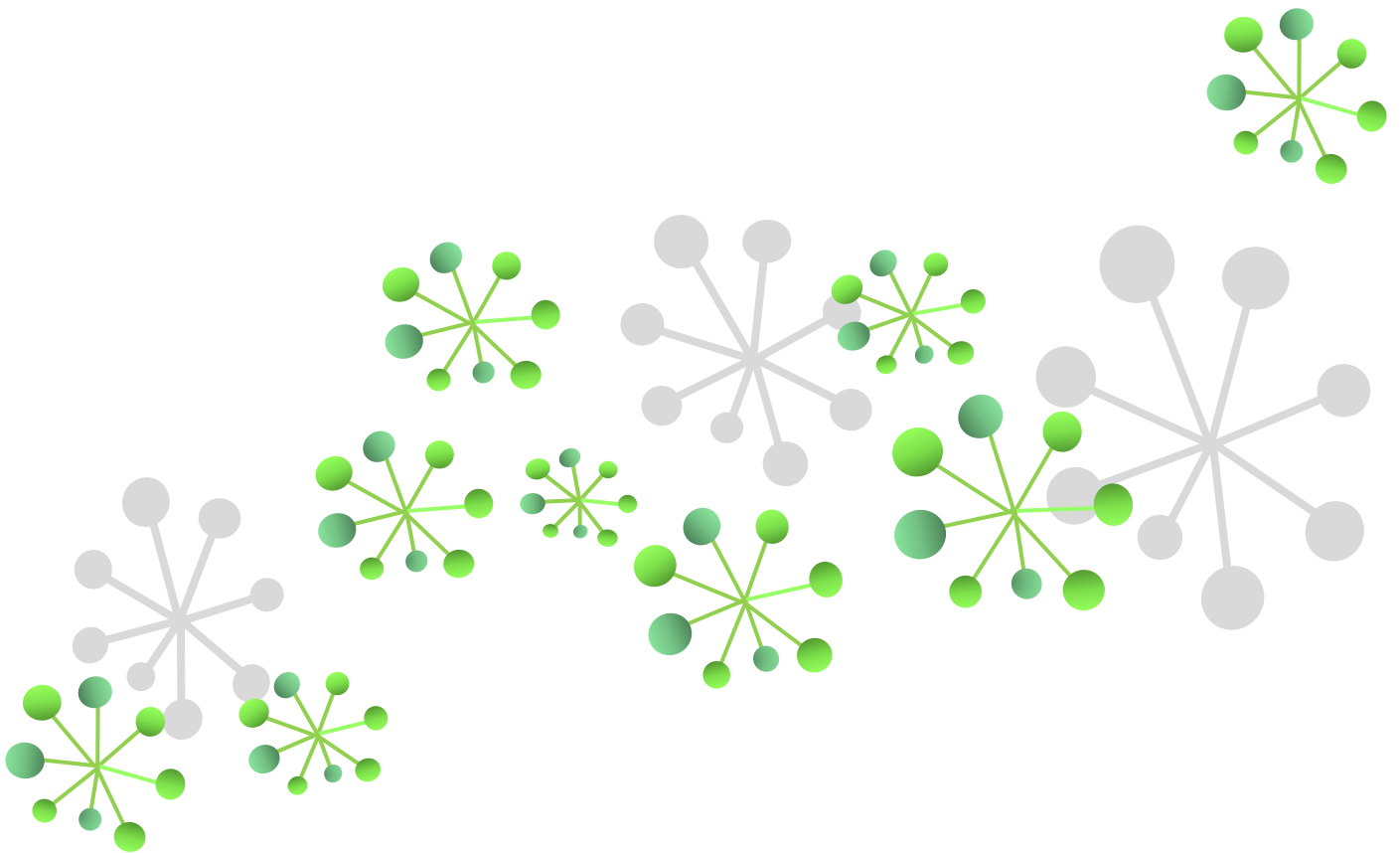
- [16] C.M. Ma, C.L. Cheng, S.C. Lee, G.B. Hong, Antioxidant capacity, insecticidal ability and heat-oxidation stability of *Tagetes lemmonii* leaf extract, *Ecotoxicology and environmental safety* 151 (2018) 68-75.
- [17] B. Kirkan, M.S. Ozer, C. Sarikurkcü, M. Copuroglu, M. Cengiz, B. Tepe, Can the stalks of *Papaver somniferum* L. be an alternative source of bioactive components?, *Industrial Crops and Products* 115 (2018) 1-5.
- [18] S. Uysal, A. Aktumsek, C.M.N. Picot, A. Sahan, A. Mollica, G. Zengin, M. Fawzi Mahomoodally, A comparative in vitro and in silico study of the biological potential and chemical fingerprints of *Dorcycinum pentaplyllum subsp. haussknechtii* using three extraction procedures, *New Journal of Chemistry* 41(22) (2017) 13952-13960.
- [19] P.R. Das, J.B. Eun, A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract, *Food Chem* 253 (2018) 22-29.
- [20] C. Castro-López, J.M. Ventura-Sobrevilla, M.D. González-Hernández, R. Rojas, J.A. Ascacio-Valdés, C.N. Aguilar, G.C.G. Martínez-Ávila, Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts, *Food Chemistry* 237 (2017) 1139-1148.
- [21] B. Zhuang, L.-L. Dou, P. Li, E.H. Liu, Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi Cacumen*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 134 (2017) 214-219.
- [22] C. Georgantzi, A.-E. Lioliou, N. Paterakis, D. Makris, Combination of Lactic Acid-Based Deep Eutectic Solvents (DES) with β -Cyclodextrin: Performance Screening Using Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from Selected Native Greek Medicinal Plants, *Agronomy* 7(3) (2017) 54.
- [23] M.d.l.Á. Fernández, M. Espino, F.J.V. Gomez, M.F. Silva, Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products, *Food Chemistry* 239 (2018) 671-678.
- [24] M. Espino, M. de los Ángeles Fernández, F.J.V. Gomez, M.F. Silva, Natural designer solvents for greening analytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016) 126-136.
- [25] Y. Liu, J.B. Friesen, J.B. McAlpine, D.C. Lankin, S.-N. Chen, G.F. Pauli, Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives, *Journal of Natural Products* 81(3) (2018) 679-690.
- [26] Z. Wei, X. Qi, T. Li, M. Luo, W. Wang, Y. Zu, Y. Fu, Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography, *Separation and Purification Technology* 149 (2015) 237-244.
- [27] M.W. Nam, J. Zhao, M.S. Lee, J.H. Jeong, J. Lee, Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*, *Green Chemistry* 17(3) (2015) 1718-1727.
- [28] Y. Dai, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *carthamus tinctorius* L, *Analytical Chemistry* 85(13) (2013) 6272-6278.
- [29] K. Tawaha, F.Q. Alali, M. Gharaibeh, M. Mohammad, T. El-Elmat, Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species, *Food Chemistry* 104(4) (2007) 1372-1378.
- [30] J. Javanmardi, C. Stushnoff, E. Locke, J.M. Vivanco, Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions, *Food Chemistry* 83(4) (2003) 547-550.

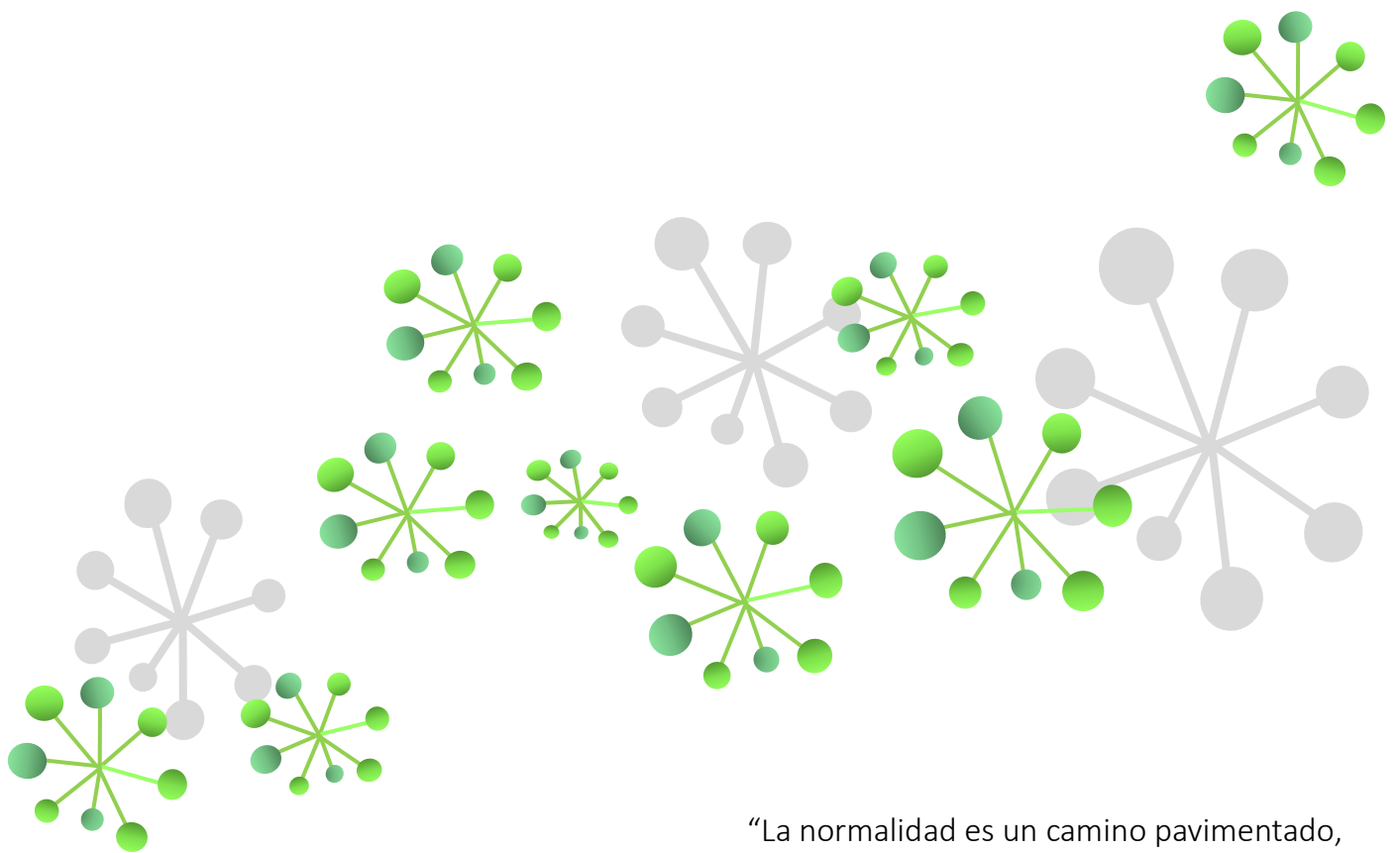
- [31] Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, H. Corke, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Sciences* 74(17) (2004) 2157-2184.
- [32] P. Knekt, J. Kumpulainen, R. Järvinen, H. Rissanen, M. Heliövaara, A. Reunanen, T. Hakulinen, A. Aromaa, Flavonoid intake and risk of chronic diseases, *The American Journal of Clinical Nutrition* 76(3) (2002) 560-568.
- [33] D. Bagchi, C.K. Sen, M. Bagchi, M. Atalay, Anti-angiogenic, Antioxidant, and Anti-carcinogenic Properties of a Novel Anthocyanin-Rich Berry Extract Formula, *Biochemistry (Moscow)* 69(1) (2004) 75-80.
- [34] I. Gülçin, Antioxidant activity of food constituents: An overview, *Archives of Toxicology* 86(3) (2012) 345-391.
- [35] C. Bakirtzi, K. Triantafyllidou, D.P. Makris, Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 3(3) (2016) 120-127.
- [36] M. Arivalagan, T.K. Roy, A.M. Yasmeen, K.C. Pavithra, P.N. Jwala, K.S. Shivasankara, M.R. Manikantan, K.B. Hebbar, S.R. Kanade, Extraction of phenolic compounds with antioxidant potential from coconut (*Cocos nucifera* L.) testa and identification of phenolic acids and flavonoids using UPLC coupled with TQD-MS/MS, *LWT* 92 (2018) 116-126.
- [37] J. Gómez-Estaca, L. Bravo, M.C. Gómez-Guillén, A. Alemán, P. Montero, Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts, *Food Chemistry* 112(1) (2009) 18-25.
- [38] K.H. Miean, S. Mohamed, Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(6) (2001) 3106-3112.
- [39] T. Wang, J. Jiao, Q.-Y. Gai, P. Wang, N. Guo, L.-L. Niu, Y.-J. Fu, Enhanced and green extraction polyphenols and furanocoumarins from Fig (*Ficus carica* L.) leaves using deep eutectic solvents, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 145 (2017) 339-345.
- [40] F.J. Gomez, I.G. Hernandez, L.D. Martinez, M.F. Silva, S. Cerutti, Analytical tools for elucidating the biological role of melatonin in plants by LC-MS/MS, *Electrophoresis* 34(12) (2013) 1749-56.
- [41] A. Wojdyło, J. Oszmiański, R. Czemerys, Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, *Food Chemistry* 105(3) (2007) 940-949.
- [42] M. Shekarchi, H. Hajimehdipoor, S. Saeidnia, A.R. Gohari, M.P. Hamedani, Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family, *Pharmacognosy Magazine* 8(29) (2012) 37-41.
- [43] E. Floriano-Sanchez, C. Villanueva, O.N. Medina-Campos, D. Rocha, D.J. Sanchez-Gonzalez, N. Cardenas-Rodriguez, J. Pedraza-Chaverri, Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs, *Free radical research* 40(5) (2006) 523-33.
- [44] G. Batallan, R. Torre, F. Flores, B. Konigheim, F. Luduena-Almeida, C. Tonn, M. Contigiani, W. Almiron, Larvicidal activity of crude extracts from *Larrea cuneifolia* (Zygophyllaceae) and of its metabolite nordihydroguaiaretic acid against the vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46(1) (2013) 84-7.

- [45] A.G. Valesi, E. Rodriguez, G. Vander Velde, T.J. Mabry, Methylated flavonols in *Larrea cuneifolia*, *Phytochemistry* 11(9) (1972) 2821-2826.
- [46] O. Aguilar, C. Hernández-Brenes, Use of modified phenolic thyme extracts (*Thymus vulgaris*) with reduced polyphenol oxidase substrates as anthocyanin color and stability enhancing agents, *Molecules* 20(12) (2015) 22422-22434.
- [47] L. Duan, L.-L. Dou, L. Guo, P. Li, E.-H. Liu, Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4(4) (2016) 2405-2411.
- [48] V. Carolina Soto, V.P. Jofré, C.R. Galmarini, M.F. Silva, Determination of alkaloids in onion nectar by micellar electrokinetic chromatography, *Electrophoresis* 37(13) (2016) 1909-1915.
- [49] B. Das, J. Kundu, S.C. Bachar, M.A. Uddin, J.K. Kundu, Antitumor and antibacterial activity of ethylacetate extract of *Ludwigia hyssopifolia* linn and its active principle piperine, *Pak J Pharm Sci* 20(2) (2007) 128-131.
- [50] Z. Zarai, E. Boujelbene, N. Ben Salem, Y. Gargouri, A. Sayari, Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*, *LWT - Food Science and Technology* 50(2) (2013) 634-641.
- [51] R. Filip, P. Lopez, J. Coussio, G. Ferraro, Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content, *Phytotherapy Research* 12(2) (1998) 129-131.
- [52] A.B. Sharangi, Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review, *Food Research International* 42(5) (2009) 529-535.

CAPÍTULO 4

CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS BIOEXTRACTOS Y ELABORACIÓN DE FORMULACIONES TÓPICAS





“La normalidad es un camino pavimentado,
es cómodo para caminar,
pero no crecen flores en él”
Vincent Van Gogh

CAPÍTULO 4

*Capacidad antimicrobiana de los extractos y elaboración de formulaciones tópicas***4.1 Introducción**

Entre los principales patógenos dérmicos se encuentran las especies del género *Candida*, siendo *C. albicans* la de mayor prevalencia a nivel mundial causando una elevada tasa de mortalidad [1]. Las infecciones producidas por este patógeno, conocidas como candidiasis, afectan predominantemente la piel y mucosas (oral y vaginal), mientras que en pacientes inmunocomprometidos pueden generar serias infecciones sistémicas [2, 3]. El tratamiento convencional para candidiasis consiste en la utilización de un limitado número de agentes antifúngicos, principalmente azoles, los cuales causan diversos efectos secundarios que limitan la cantidad y frecuencia de las dosis. Además, el uso extensivo de antimicóticos, ha llevado a la selección de cepas resistentes a ellos [2]. Sumado a esto, es importante destacar que en el caso de infecciones dérmicas, las recaídas debido a éste patógeno son muy frecuentes [4]. En este contexto, el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos para el control de *C. albicans* representa no sólo un gran desafío, sino también una necesidad apremiante [5, 6].

A lo largo de la historia, las plantas medicinales se han utilizados por sus propiedades antimicrobianas para el tratamiento de enfermedades causadas por diversos patógenos. En el caso de las infecciones generadas por *C. albicans*, estudios previos demuestran la posibilidad de utilizar preparados fitoterápicos para su control y tratamiento [7, 8]. Esto abre posibilidades interesantes para el desarrollo de nuevas formulaciones antifúngicas como alternativa a la terapia convencional.

En este último capítulo, se propuso desarrollar formulaciones antifúngicas incorporando como ingrediente activo a los bioextractos obtenidos y caracterizados previamente. Con este fin, se propuso evaluar en primer lugar la actividad antimicrobiana de *Larrea divaricata*, *Larrea cuneifolia*, *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* frente a *Candida albicans* utilizando el método disco de difusión. Luego, se seleccionaron los extractos con mayor acción

antifúngica y se cuantificó su actividad, determinando la concentración mínima inhibitoria mediante el método de macrodilución. Con el propósito de identificar los metabolitos responsables de las propiedades antifúngicas de los extractos, se decidió evaluar la acción de los compuestos individuales determinados en el Capítulo 3 frente al patógeno. Finalmente, los bioextractos se incorporaron en formulaciones tópicas. Éstas se evaluaron en términos de parámetros físicos y capacidad antimicrobiana.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Reactivos y equipamiento

En este capítulo, se emplearon algunos de los reactivos y equipamiento detallados en el Capítulo 2 y 3; así como también se utilizó el mismo procedimiento para la preparación de soluciones de estándares.

Para los ensayos de actividad antimicrobiana, se utilizó agar Mueller Hinton y agar sabouraud glucosado obtenidos de Laboratorios Britania S.A. (Bs.As. Argentina) y caldo trypto-caseína soja (Biokar, France). Para la preparación de las formulaciones se utilizó crema base para hidroquinona, silicona 344 (S_{344}) y silicona 1000 (S_{1000}) obtenidas de Laboratorios Parafarm (Saporiti, Buenos Aires).

4.2.2 Microorganismos

Candida albicans fue obtenida del área de Dermatología del Hospital Lagomaggiore (Mendoza, Argentina). El patógeno fue cultivado en agar sabouraud glucosado por 24 horas a 35 °C (Figura 4.1). Luego, se preparó una suspensión en solución salina estéril (cloruro de sodio 0,9 %) y se ajustó a 0,5 en la escala de Mc Farland.



Figura 4.1. Colonias brillantes de color blanco o ligeramente beige, correspondientes a *Candida albicans*.

4.2.3 Capacidad antimicrobiana frente a *Candida albicans*

4.2.3.1 Evaluación mediante disco de difusión

El ensayo de disco de difusión se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), documento M44-A2 [9]. Para lo cual, se preparó agar Mueller-Hinton suplementado con 10 % de solución de azul de metileno (5 mg mL^{-1}) y 2 % de glucosa (MHA). Este medio de cultivo se esterilizó y se incorporó en cajas de Petri (15 cm). Luego de enfriarse, las placas se inocularon con la suspensión de *C. albicans* (Sección 4.2.2). Asimismo, se impregnaron discos de papel de filtro estériles (9 mm de diámetro) con 15 μL de bioextracto (filtrado por $0,2 \mu\text{m}$) y se incluyeron como control discos de fluconazol (25 μg por disco, Neo-sensitabsTM). Los discos se secaron por 5 minutos, y posteriormente se colocaron en el medio MHA inoculado. Las placas se incubaron a 35°C por 48 horas. Transcurrido este periodo, las cajas se fotografiaron y se determinó la actividad de los extractos midiendo el diámetro de inhibición del crecimiento microbiano utilizando el programa aplicativo Axion Vision 4.8.

4.2.3.2 Concentración mínima inhibitoria

Con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los bioextractos, se utilizó el método de macrodilución en caldo siguiendo el protocolo M27-A2 de la CLSI (Figura 4.2) [9]. Los bioextractos que presentaron mayor inhibición en el ensayo de disco de difusión fueron seleccionados para esta determinación. Con este fin, se prepararon nueve diluciones

seriadas del extracto entre 1,875 y 75 mg mL⁻¹ en Caldo de Triptona Soja (TSB). La suspensión de *C. albicans* se diluyó 1:2000 en TSB. El ensayo se realizó de la siguiente forma: se adicionaron 500 µL de cada dilución del bioextracto a 4,5 mL de la macrodilución del patógeno y se incubaron por 48 h a 35 °C. Como control positivo se utilizó fluconazol (agente antifúngico) a 0,5 y 400 µg mL⁻¹. Asimismo, se incluyó un control de solvente (LGH) para cada dilución evaluada con el fin de corroborar que este no presenta efecto antifúngico. Además, se realizó un control de medio de cultivo que permitió confirmar que el caldo permite el crecimiento del patógeno y un control de esterilidad que validó el procedimiento de esterilización. El ensayo se realizó por triplicado. La CMI se interpretó como la mínima concentración a la cual el crecimiento es inhibido (considerando el primer tubo claro).

Finalmente, con el fin de evaluar el efecto fungicida o fungistático de los bioextractos, la suspensión del primer tubo claro y de los dos tubos consecutivos (uno de concentración mayor y otro menor) se inocularon en placas de agar sabouraud glucosado y se incubaron a 35 °C por 24 h. Este ensayo se llevó a cabo por triplicado. Luego del periodo de incubación se fotografiaron las cajas, observando presencia o ausencia de crecimiento.

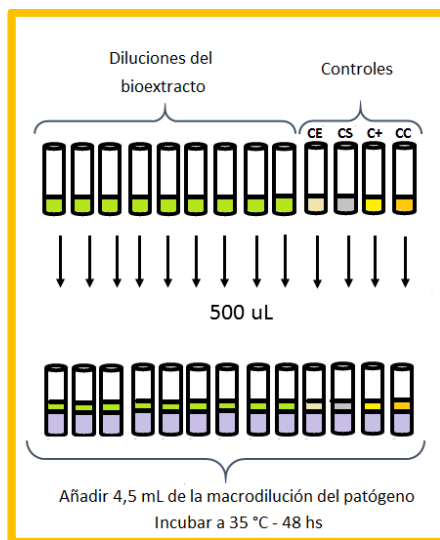


Figura 4.2. Esquema del ensayo de CMI, evaluando nueve diluciones de cada bioextracto. **CE:** control de esterilidad, **CS:** control del solvente (se llevaron a cabo las mismas 9 diluciones de LGH que las realizadas para los bioextractos), **C+:** control positivo (se llevó a cabo a dos concentraciones 0,5 y 400 µg mL⁻¹), **CC:** control de crecimiento.

4.2.4 Elaboración de formulaciones tópicas

Para la preparación de las formulaciones tópicas se mezcló crema base con diferentes concentraciones de silicona y de bioextracto. La mezcla se agitó constantemente, a temperatura ambiente, hasta completar la homogeneización. Las formulaciones obtenidas se caracterizaron en términos de color, olor, consistencia, homogeneidad y extensibilidad. El ensayo de extensibilidad se realizó siguiendo el método propuesto por De Paula y colaboradores [10]. Para ello, una cantidad determinada de crema (25 mg) se sometió a presión, aplicando cuatro pesas de peso conocido (5; 2; 2 y 5 g). Las pesas fueron agregadas subsecuentemente sobre la muestra con intervalos de un minuto. El radio de expansión alcanzado por la crema con cada pesa adicionada se midió en los 4 ejes (horizontales y verticales). El resultado se expresó como el área de expansión en función de la masa aplicada siguiendo la ecuación (Eq. 1):

$$S = \frac{d^2\pi}{4} \quad (1)$$

donde, S: área de extensibilidad (mm²) resultante del peso aplicado y d: es el promedio de los diámetros alcanzados por la muestra (mm).

Con el propósito de evaluar la actividad antimicrobiana de las formulaciones se aplicó el método de disco de difusión descrito en la Sección 4.2.3.1, con modificaciones. Para ello, se inoculó el medio de cultivo con la suspensión de *C. albicans*. Posteriormente, se llevaron a cabo perforaciones de 6 mm de diámetro en el agar y se rellenaron con cada formulación preparada. El ensayo se llevó a cabo por triplicado. Para determinar la eficacia de las cremas evaluadas se midió el área de inhibición de crecimiento, utilizado el programa Axion Vision 4.8.

4.3 Resultados

4.3.1 Evaluación de la actividad antifúngica

En primer lugar, se llevó a cabo el ensayo de disco de difusión para estudiar la actividad antimicrobiana de los bioextractos obtenidos en el capítulo anterior. Las áreas de inhibición de *C. albicans* mostraron diferencias entre las cuatro plantas bajo estudio (Figura 4.3). El mayor área de inhibición se observó para los extractos de *L. divaricata* y *L. cuneifolia*, mientras que *T. vulgaris* y *O. vulgare* presentaron las menores inhibiciones. Cabe resaltar que los resultados obtenidos en el capítulo 3, revelaron que los bioextractos de las especies de *Larrea* poseen un elevado contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante.

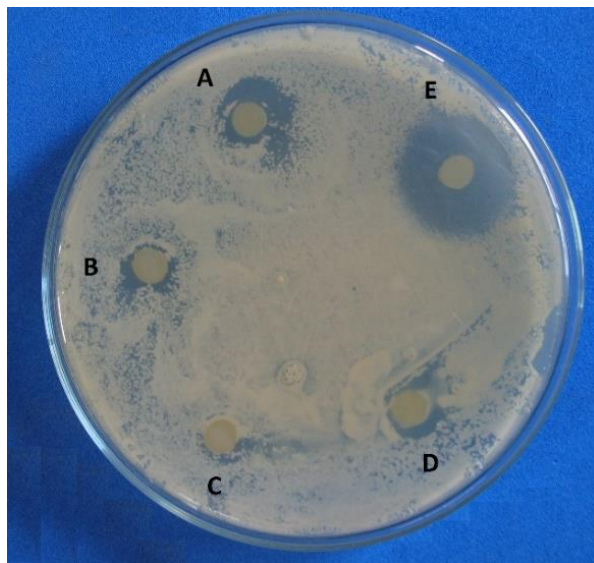


Figura 4.3. Actividad antimicrobiana de los bioextractos, mediante el ensayo de disco de difusión. A: *L. divaricata* B: *T. vulgaris*, C: *O. vulgare*, D: *L. cuneifolia*, E: Fluconazol.

Las especies del género *Larrea* se han reportado previamente por sus interesantes propiedades antimicrobianas. Extractos alcohólicos de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* mostraron actividad frente a hongos filamentosos (*Lenzites elegans*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus*, *Ganoderma applanatum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger* y *Trichoderma spp*) [11]. Zampini y colaboradores [12] demostraron la actividad de extractos etanólicos de *Larrea* frente a bacterias resistentes a

antibióticos. Más recientemente, Moreno y colaboradores [13] reportaron la actividad de extractos etanólicos secos de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* frente a *C. albicans*.

Teniendo en cuenta tanto los resultados obtenidos, así como también los antecedentes reportados, se seleccionaron los bioextractos de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* para ensayos posteriores.

4.3.2 Actividad antimicrobiana de los compuestos individuales

Con el objetivo de evaluar que compuestos presentes en los bioextractos de *Larrea* presentan actividad frente a *C. albicans*, se evaluaron los alcaloides y fenoles determinados en el Capítulo 3. Para este fin, se utilizó el método de disco de difusión y cada compuesto se evaluó a la concentración encontrada en el correspondiente bioextracto.

Como puede observarse en la Figura 4.4, todos los biocompuestos presentaron actividad antimicrobiana frente al patógeno evaluado. Los resultados demostraron que entre los metabolitos presentes en el bioextracto *L. divaricata*, NDGA y el ácido cafeico presentaron los mayores porcentajes de inhibición (Figura 4.4.A), mientras que para *L. cuneifolia* NDGA, los ácidos cafeico y ferúlico, piperina y teofilina fueron los compuestos con mayor actividad antimicrobiana (Figura 4.4.B). Es importante destacar que ninguno de los compuestos bioactivos evaluados alcanzó la inhibición presentada por los bioextractos.

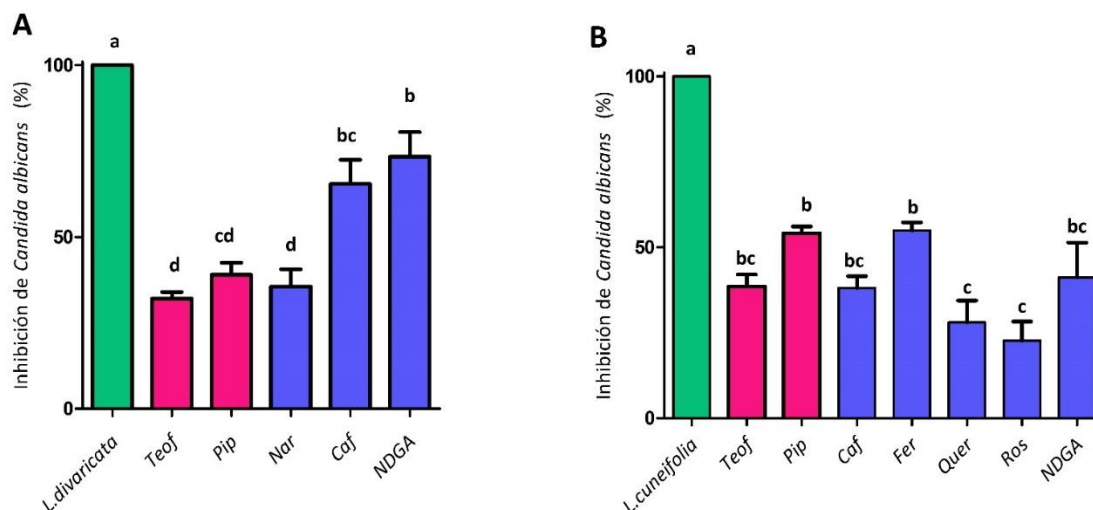


Figura 4.4. Inhibición de *C. albicans* (%) mediante método de disco de difusión; A: Inhibición para el bioextracto de *L. divaricata* y sus biocompuestos, B: Inhibición para el bioextracto de *L. cuneifolia* y sus biocompuestos. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey, $\alpha \pm 0,05$).

Considerando la complejidad de una matriz vegetal, es difícil atribuir el efecto antimicrobiano a un compuesto específico. Sin embargo, reportes previos han mostrado la relación entre la presencia de fenoles y alcaloides con la actividad frente a diversos patógenos [14-17]. Raut y colaboradores reportaron la actividad de fenilpropanoides, entre ellos Caf y Fer, para inhibir la formación de biofilms de *C. albicans*. Por otro lado, NDGA es reconocido como un potente antioxidante, además de haber demostrado capacidad antiviral, antiinflamatorio, entre otras [18, 19]. Su potencial antimicrobiano ha sido evaluado frente a diversos microorganismos, Guzmán-Beltrán y colaboradores [20] comprobaron la efectividad de NDGA para inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, mientras que Batallán y colaboradores demostraron su efecto larvicida frente a *Culex quinquefasciatus*. La actividad antimicrobiana de los alcaloides teofilina y piperina ha sido poco estudiada. Zarai y colaboradores [21] demostraron la actividad de piperina frente a bacterias gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) y negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Salmonella entérica*). Por otro lado, Ruddarraju y colaboradores demostraron actividad antimicrobiana de derivados de teofilina frente a *C. albicans* [22].

4.3.3 Concentración mínima inhibitoria

Con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los bioextractos de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* frente a *C. albicans*, se llevó a cabo el método de macrodilución. Para ello, se evaluaron las siguientes diluciones seriadas de los bioextractos: 1,87; 3,75; 7,5; 18,75; 20; 25; 30; 37,5 y 75 mg mL⁻¹. La mínima concentración sin crecimiento visible se definió como la MIC (el primer tubo claro). Los resultados evidenciaron que *C. albicans* fue más susceptible al extracto de *L. divaricata* que al de *L. cuneifolia*, siendo la CMI 20 y 25 mg mL⁻¹ respectivamente.

Posteriormente, para evaluar el efecto fungicida o fungistático, se sembraron las diluciones seleccionadas (tubo correspondiente a la CMI y los tubos con concentraciones de extracto mayor y menor a la CMI) en medio sólido. Como puede verse en la Figura 4.5, los bioextractos de ambas *Larreas* a sus respectivas CMI mostraron actividad fungicida, es decir, el patógeno no fue capaz de crecer luego de suspender el contacto con el bioextracto. Mientras que, a las concentraciones de bioextracto menores a la CMI se observó efecto fungistático, por lo que el patógeno se desarrolló en el medio nutritivo en ausencia del bioextracto. El control positivo fluconazol, mostró efecto fungistático a la menor concentración probada (0,5 µg mL⁻¹), mientras que a la más alta (400 µg mL⁻¹) demostró ser fungicida. Es necesario resaltar que el control del solvente LGH permitió el crecimiento del microorganismo, demostrando que no posee acción antimicrobiana.

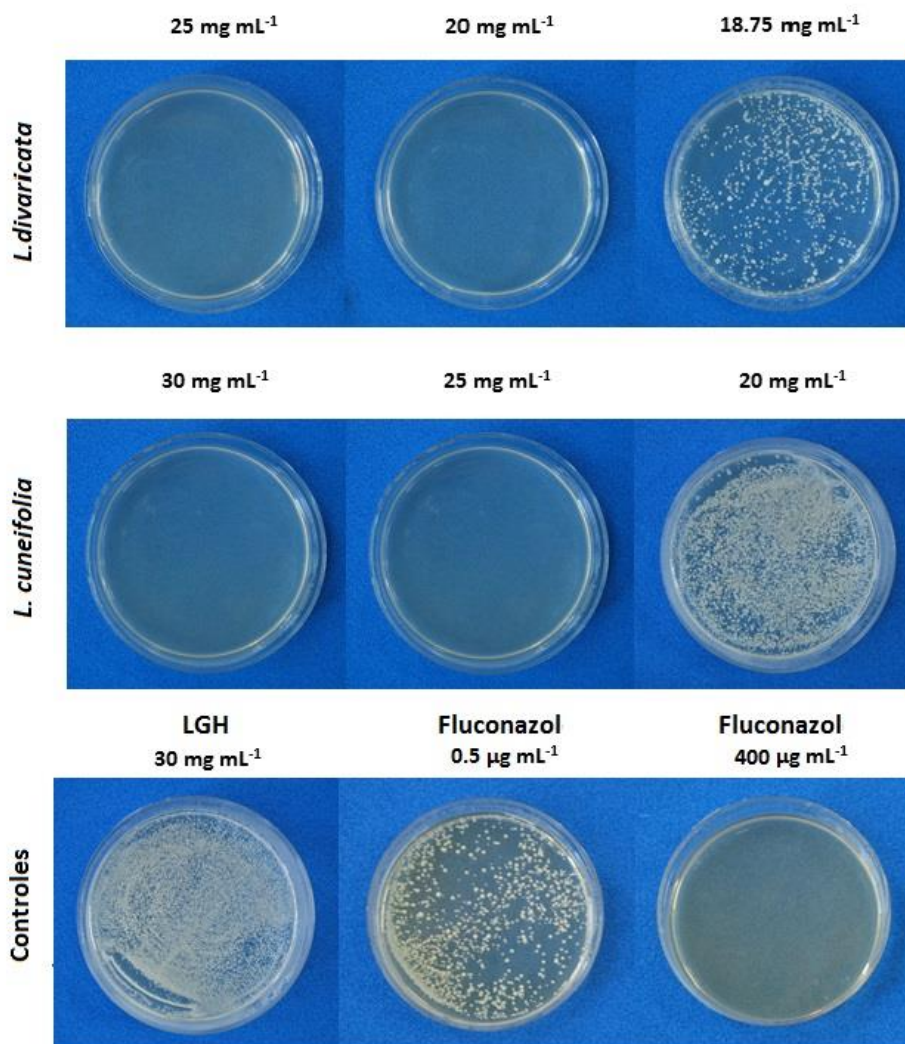


Figura 4.5. Efecto fungitóxico de los bioextractos de *L. cuneifolia* y *L. divaricata*.

Los resultados obtenidos, se encuentran de acuerdo con lo reportado por Moreno y colaboradores [13], cuyos valores de CMI para *C. albicans* fueron menores para el extracto de *L. divaricata*. Por otro lado, Quiroga y colaboradores [11] obtuvieron menores valores de CMI para *L. cuneifolia*, al evaluarla frente a otros microorganismos como *Saccharomyces carlsbergensis* y *Rhodotorula spp.*

4.3.4 Formulaciones tópicas

Luego de determinar la actividad antifúngica de los bioextractos de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* frente a *C. albicans*; se incorporaron como ingrediente activo en formulaciones tópicas. Las mismas se prepararon utilizando crema base y silicona. En primer lugar, se realizó un estudio preliminar para evaluar dos siliconas (S_{1000} y S_{344}) a concentraciones entre 12,5 y 25 %. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre el tipo de silicona y la concentración usada, por lo tanto se utilizó silicona S_{344} al 25 %. Para seleccionar las concentraciones de los bioextractos de *Larrea spp*, se tuvieron en cuenta los valores de CMI obtenidos en la sección anterior. A partir de ello, se elaboraron cuatro formulaciones; donde los bioextractos de *L. cuneifolia* (C) y *L. divaricata* (D) se evaluaron a 0,5x y x, siendo x el valor de CMI (C 0,5x; C x; D 0,5x y D x). Además, se prepararon dos formulaciones combinando ambos bioextractos usando 0,25x y 0,5x de cada uno (D 0,25x-C 0,25x y D 0,5x –C 0,5x).

Los resultados de la evaluación de los caracteres organolépticos de las cremas (color, olor, consistencia y homogeneidad) resultaron satisfactorios y no se encontraron señales de separación o deterioro por un periodo de 60 días. Asimismo, los resultados del ensayo de extensibilidad no mostraron diferencias significativas entre las formulaciones tópicas preparadas con diferentes extractos de plantas y concentraciones por al menos 60 días. Cuando se compararon las cremas de *Larrea* con un antifúngico comercial, se observaron áreas de expansión similares (Figura 4.6). La extensibilidad es una característica importante para las cremas diseñadas para aplicación tópica, ya de ella depende una correcta aplicación, su facilidad para extraerla del envase, y la aceptación del paciente [23].

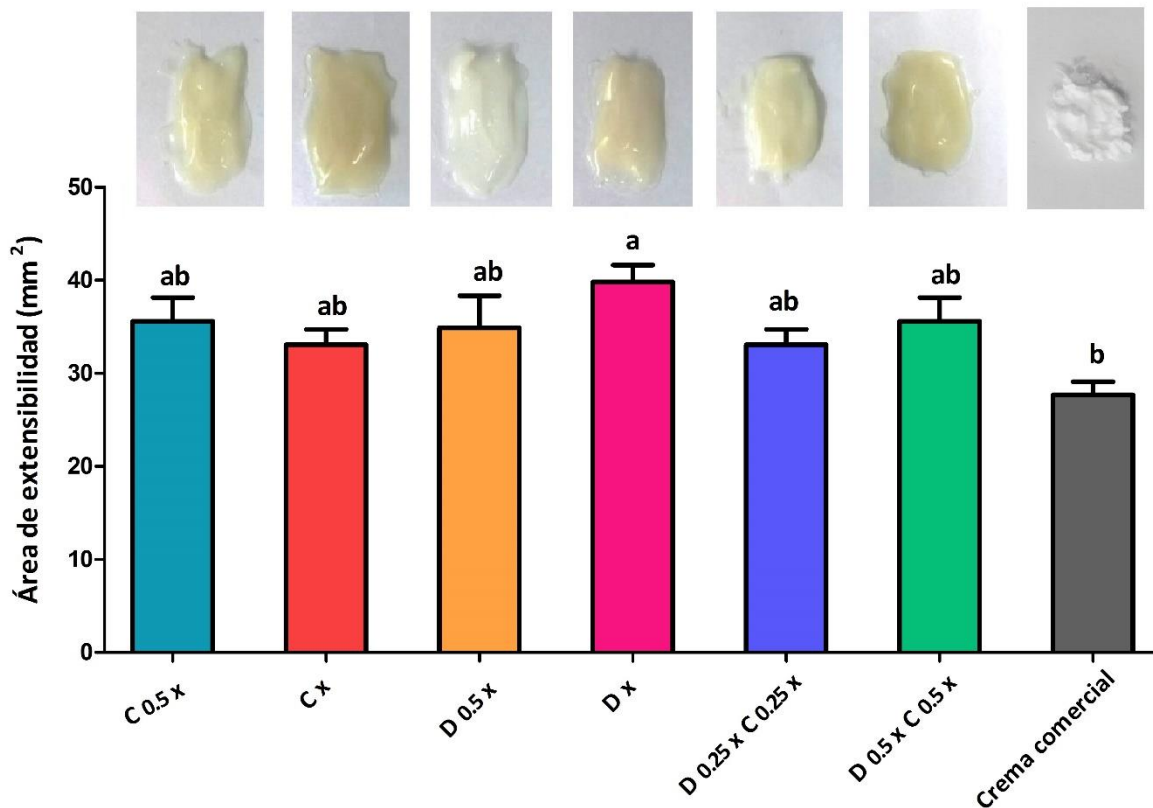


Figura 4.6. Áreas de extensibilidad (mm²) de las formulaciones tópicas con diferentes concentraciones de los bioextractos de *L. divaricata* y *L. cuneifolia*. Letras distintas indican diferencias significativas. (Tukey $\alpha \pm 0,05$)

4.3.4.1 Actividad antimicrobiana de las formulaciones tópicas

La actividad antimicrobiana de las cremas tópicas preparadas se evaluó mediante el ensayo de disco de difusión. Como puede observarse en la Figura 4.7, las cremas de *L. divaricata* a 0,5x y x presentaron áreas de 2 y 3 mm respectivamente; mientras que se observó un comportamiento similar para las formulaciones de *L. cuneifolia*. Interesantemente, la combinación de ambas especies de *Larrea* (Dx- Cx) presentó una mayor inhibición de *C. albicans* (8 mm). Esto reveló un efecto sinérgico entre los bioextractos de *Larrea* aumentando la actividad antimicrobiana frente a *C. albicans*.

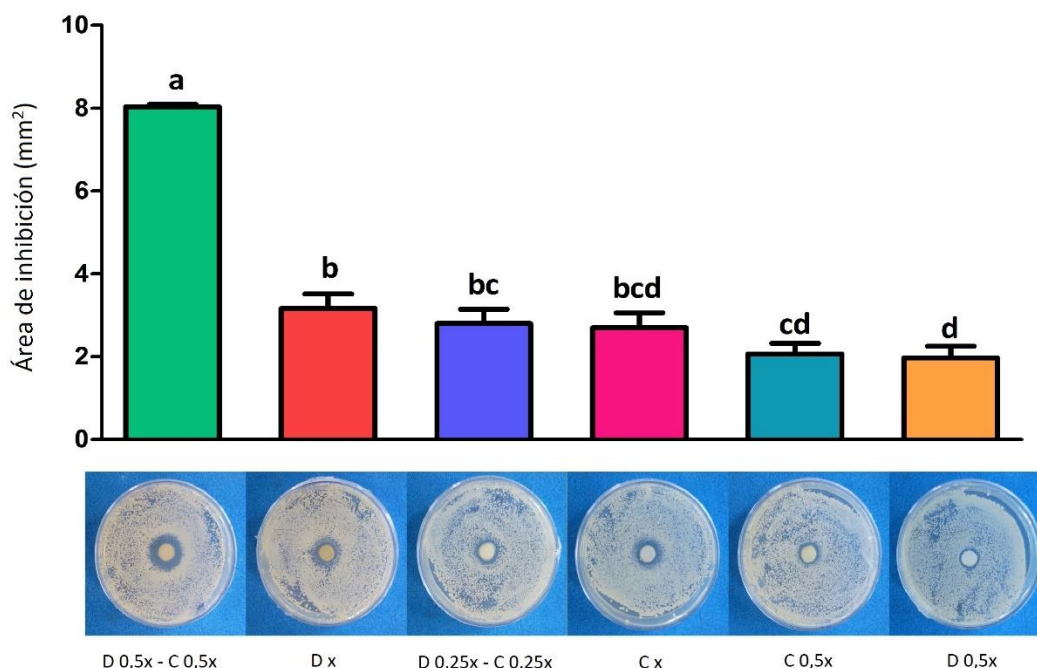


Figura 4.7. Actividad antimicrobiana de las formulaciones tópicas de *L. divaricata* y *L. cuneifolia*. Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey, $\alpha \leq 0,05$).

Estudios previos demostraron el potencial de formulaciones tópicas basadas en extractos de plantas para el tratamiento de infecciones causadas por *C. albicans*. Cremas preparadas con un 4 % de extracto alcohólico de *Juglans nigra* presentó una inhibición satisfactoria frente a candidiasis vaginal [24]. Awad El-Gied y colaboradores [7], reportaron la actividad in vitro de cremas y ungüentos preparados con extractos de *Mangifera indica*. Oridupa y colaboradores [8] demostraron que la crema y ungüento preparados en base al extracto de *Phyllanthus amarus* presentaron aceptables propiedades fisicoquímicas y una satisfactoria actividad antimicrobiana in vitro frente a *C. albicans*.

4.4 Conclusiones

En el presente capítulo, se demostró la actividad antimicrobiana de los bioextractos de las dos especies de *Larrea* frente a *C. albicans*. Se determinaron los valores de CMI, siendo de 20 y 25 mg mL⁻¹ para los bioextractos de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* respectivamente.

Asimismo, se evaluó la actividad de sus biocompuestos, los cuales si bien presentar actividad frente al patógeno, ninguno alcanzó la misma inhibición que la obtenida con los bioextractos.

Luego, los bioextractos se incorporaron a formulaciones tópicas, las cuales presentaron características satisfactorias en términos de estabilidad y extensibilidad. Interesantemente, al evaluar la actividad frente a *C. albicans*, la crema obtenida a partir de la combinación de bioextractos de *Larrea* reveló un efecto sinérgico, es decir presentó una actividad mayor a la obtenida para cada bioextracto. Esto destaca el potencial de las formulaciones de las especies de *Larrea* para el tratamiento de candidiasis. Cabe resaltar, que no existen antecedentes que incorporen extractos mediados por solventes eutécticos en formulaciones tópicas.

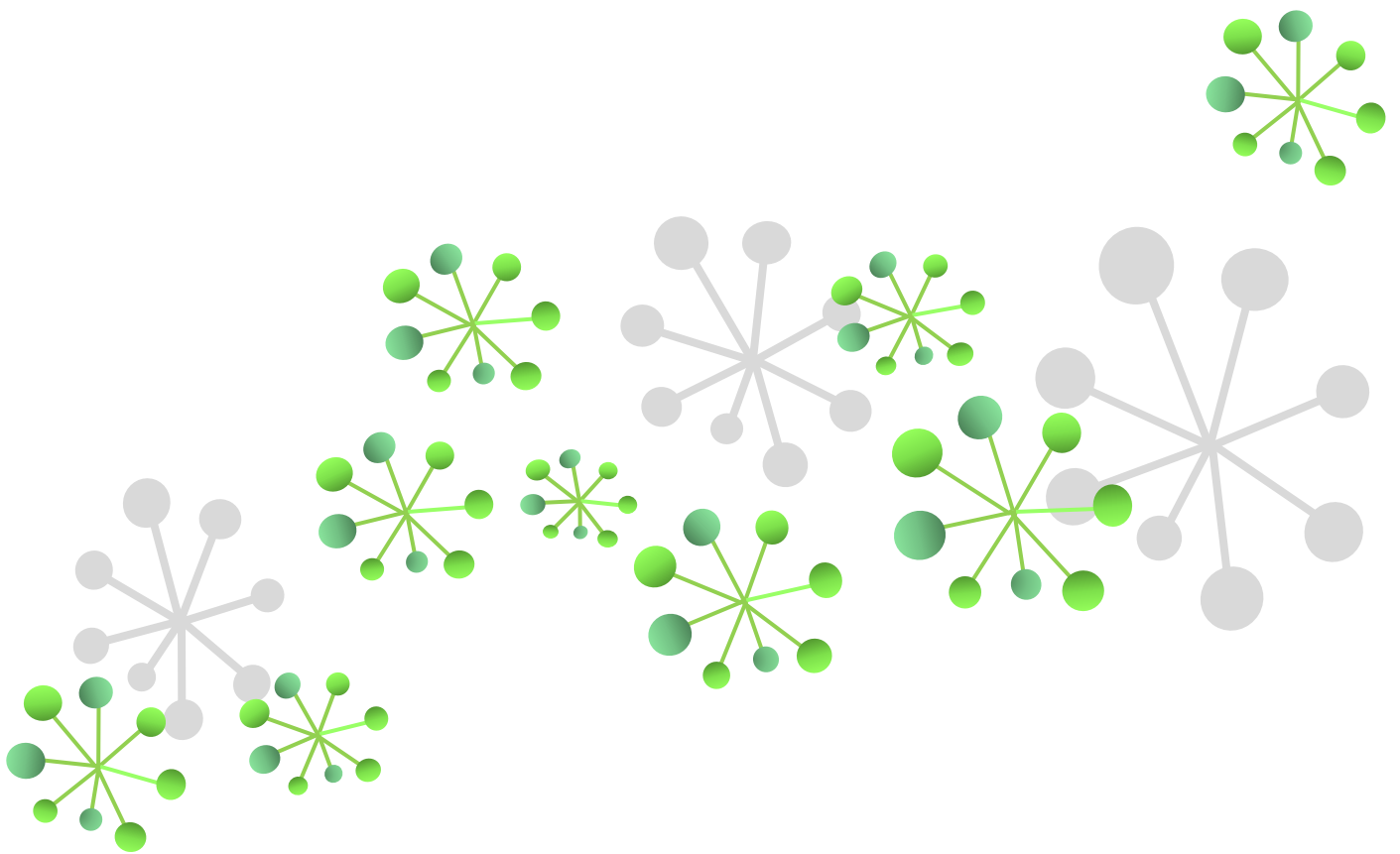
4.5 Bibliografía

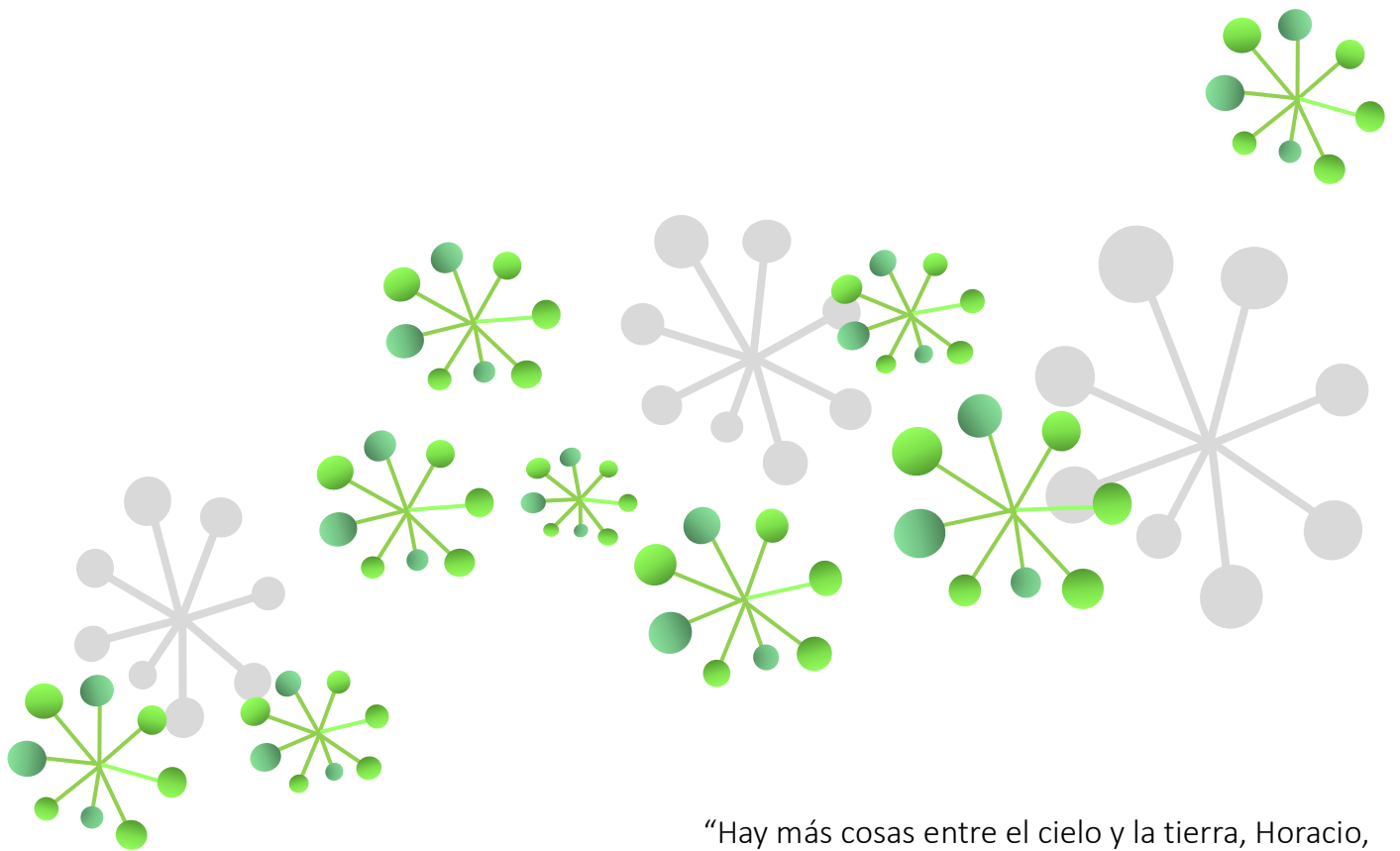
- [1] J.R. Naglik, A. König, B. Hube, S.L. Gaffen, *Candida albicans*–epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity, *Current Opinion in Microbiology* 40 (2017) 104-112.
- [2] S. Cretton, A. Oyarzún, D. Righi, L. Sahib, M. Kaiser, P. Christen, V. Fajardo, A new antifungal and antiprotozoal bibenzyl derivative from *Gavilea lutea*, *Natural Product Research* 32(6) (2018) 695-701.
- [3] A. Zida, S. Bamba, A. Yacouba, R. Ouedraogo-Traore, R.T. Guiguemdé, Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review, *Journal de Mycologie Médicale* 27(1) (2017) 1-19.
- [4] A. Piras, M.J. Gonçalves, J. Alves, D. Falconieri, S. Porcedda, A. Maxia, L. Salgueiro, *Ocimum tenuiflorum* L. and *Ocimum basilicum* L., two spices of Lamiaceae family with bioactive essential oils, *Industrial Crops and Products* 113 (2018) 89-97.
- [5] N. Tocci, T. Weil, D. Perenzoni, L. Narduzzi, S. Madriñán, S. Crockett, N.M. Nürk, D. Cavalieri, F. Mattivi, Phenolic profile, chemical relationship and antifungal activity of Andean *Hypericum* species, *Industrial Crops and Products* 112 (2018) 32-37.
- [6] S. Petropoulos, Â. Fernandes, L. Barros, A. Ciric, M. Sokovic, I.C.F.R. Ferreira, Antimicrobial and antioxidant properties of various Greek garlic genotypes, *Food Chemistry* 245 (2018) 7-12.
- [7] A. Awad El-Gied, A. Abdelkareem, E. Hamedelniel, Investigation of cream and ointment on antimicrobial activity of *Mangifera indica* extract, *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 6(2) (2015) 53-57.
- [8] T.O. Ajala, M.N. Femi-Oyewo, O.A. Odeku, O.O. Aina, A.B. Saba, O.O. Oridupa, The physicochemical, safety and antimicrobial properties of *Phyllanthus amarus* herbal cream and ointment, *Journal of Pharmaceutical Investigation* 46(2) (2016) 169-178.
- [9] C.a.L.S.I. (CLSI), Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard—3rd ed, CLSI document M27-A3 (2008).
- [10] I.C. de Paula, G.G. Ortega, V.L. Bassani, P.R. Petrovick, Development of Ointment Formulations Prepared with *Achyrocline satureioides* Spray-Dried Extracts, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 24(3) (1998) 235-241.

- [11] E.N. Quiroga, A.R. Sampietro, M.A. Vattuone, Screening antifungal activities of selected medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology* 74(1) (2001) 89-96.
- [12] I.C. Zampini, N. Cudmani, M.I. Isla, Antimicrobial activity of Argentine medicinal plants on antibiotic-resistant bacteria, *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 41(3) (2007) 385-393.
- [13] M.A. Moreno, S. Córdoba, I.C. Zampini, M.I. Mercado, G. Ponessa, J.E. Sayago, L.L.P. Ramos, G. Schmeda-Hirschmann, M.I. Isla, Argentinean *larrea* dry extracts with potential use in vaginal candidiasis, *Natural Product Communications* 13(2) (2018) 171-174.
- [14] B. Joana, V.C. Soto, P. Pablo, L. Gabriela, S.M. Fernanda, Phenolic characterization and antimicrobial activity of folk medicinal plant extracts for their applications in olive production, *ELECTROPHORESIS* 35(11) (2014) 1709-1718.
- [15] M.A. De León-Zapata, L. Pastrana-Castro, M.L. Rua-Rodríguez, O.B. Alvarez-Pérez, R. Rodríguez-Herrera, C.N. Aguilar, Experimental protocol for the recovery and evaluation of bioactive compounds of tarbush against postharvest fruit fungi, *Food Chemistry* 198 (2016) 62-67.
- [16] A. Maria, Gatto, A. Ippolito, V. Linsalata, N. A. Casciarano, F. Nigro, S. Vanadia, D.V. Donato, Venere, Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables, 2011.
- [17] M.G. Nicosia, S. Pangallo, G. Raphael, F. Romeo, M. Strano, P. Rapisarda, S. Droby, L. Schena, Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract, 2016.
- [18] J.-M. Lü, J. Nurko, S.M. Weakley, J. Jiang, P. Kougias, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen, Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: an update, *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 16(5) (2010) RA93-RA100.
- [19] E. Floriano-Sanchez, C. Villanueva, O.N. Medina-Campos, D. Rocha, D.J. Sanchez-Gonzalez, N. Cardenas-Rodriguez, J. Pedraza-Chaverri, Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs, *Free radical research* 40(5) (2006) 523-33.
- [20] S. Guzmán-Beltrán, M.Á. Rubio-Badillo, E. Juárez, F. Hernández-Sánchez, M. Torres, Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and α -mangostin inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* by inducing autophagy, *International Immunopharmacology* 31 (2016) 149-157.
- [21] Z. Zarai, E. Boujelbene, N. Ben Salem, Y. Gargouri, A. Sayari, Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*, *LWT - Food Science and Technology* 50(2) (2013) 634-641.
- [22] R.R. Ruddaraju, A.C. Murugulla, R. Kotla, M. Chandra Babu Tirumalasetty, R. Wudayagiri, S. Donthabakthuni, R. Maraju, K. Baburao, L.S. Parasa, Design, synthesis, anticancer, antimicrobial activities and molecular docking studies of theophylline containing acetylenes and theophylline containing 1,2,3-triazoles with variant nucleoside derivatives, *European journal of medicinal chemistry* 123 (2016) 379-396.
- [23] D.A. Alka Garg, Sanjay Garg, and Anil K. Singla, Spreading of Semisolid Formulations An Update, *Pharmaceutical Technology* (2002).
- [24] P. Abedi, M. Yaralizadeh, M. Fatahinia, F. Namjoyan, S. Nezamivand-Cheginini, M. Yaralizadeh, Comparison of the effects of *juglans nigra* green husk and clotrimazole on *candida albicans* in rats, *Jundishapur Journal of Microbiology* 11(2) (2018).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS





“Hay más cosas entre el cielo y la tierra, Horacio,
que las que sospecha tu filosofía”
William Shakespeare

CAPÍTULO 5

Conclusiones Generales

En el presente trabajo de tesis se desarrolló un procedimiento de extracción sustentable para la obtención de bioextractos a partir de matrices vegetales. La extracción se optimizó con el propósito de obtener extractos ricos en compuestos bioactivos. Los bioextractos se caracterizaron en términos de compuestos fenólicos, alcaloides y actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans*. Finalmente, se incorporaron como ingrediente activo en formulaciones tópicas farmacéuticas. La presente tesis se sustentó en los principios de la Química Analítica Verde; por lo que todas las actividades desarrolladas tuvieron como fundamento contribuir al desarrollo de procedimientos y metodologías de trabajo sustentables y seguras tanto para el medio ambiente como para el operario.

Los resultados demostraron la importancia de incorporar herramientas quimiométricas para la preparación de un solvente eutéctico natural. De esta forma, es posible diseñar solventes para propósitos específicos, tanto para la extracción de biocompuestos, así como también podría aplicarse en otras áreas, como en síntesis orgánica. Cabe destacar que la quimiometría permite reducir el número de experimentos en una optimización, disminuyendo el consumo de solventes y la generación residuos. Por lo que es una herramienta esencial para el desarrollo de procedimientos sustentables.

El diseño de la metodología de extracción se realizó teniendo como objetivos la sustentabilidad del proceso así como también la eficiencia del mismo. Para esto se aplicó el “Certificado Verde”, la cual permite evaluar la sustentabilidad de los procedimientos. La metodología optimizada presentó bajo puntos de penalidad para este certificado, al compararla con metodologías tradicionales. Asimismo, la eficiencia del solvente LGH fue satisfactoria cuando se la comparó con metanol y agua.

Se demostró la compatibilidad del eutéctico LGH, con el sistema de separación y detección HPLC-DAD. Las metodologías cromatográficas desarrolladas permitieron determinar compuestos fenólicos y alcaloides en los bioextractos. Esto demuestra que no es necesario incluir solventes orgánicos para diluir los extractos en pasos previos a la inyección.

Los bioextractos de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* presentaron actividad antifúngica frente a *C. albicans* y se determinó su concentración mínima inhibitoria. Las formulaciones preparadas a partir de los mismos presentaron satisfactorias características físicas y organolépticas. Esto demuestra la posibilidad de incorporar NADES a formulaciones farmacéuticas. Interesantemente, al evaluar la actividad antimicrobiana de las formulaciones, la crema preparada a partir de la combinación de ambos bioextractos presentó una mayor actividad que las provenientes de los bioextractos individuales. Esto reveló un sinergismo entre ambas especies de *Larrea*.

Los aportes de esta tesis, destacan la importancia de incorporar herramientas que permiten discernir y seleccionar las metodologías adecuadas para lograr resultados eficientes trabajando de manera sustentable.

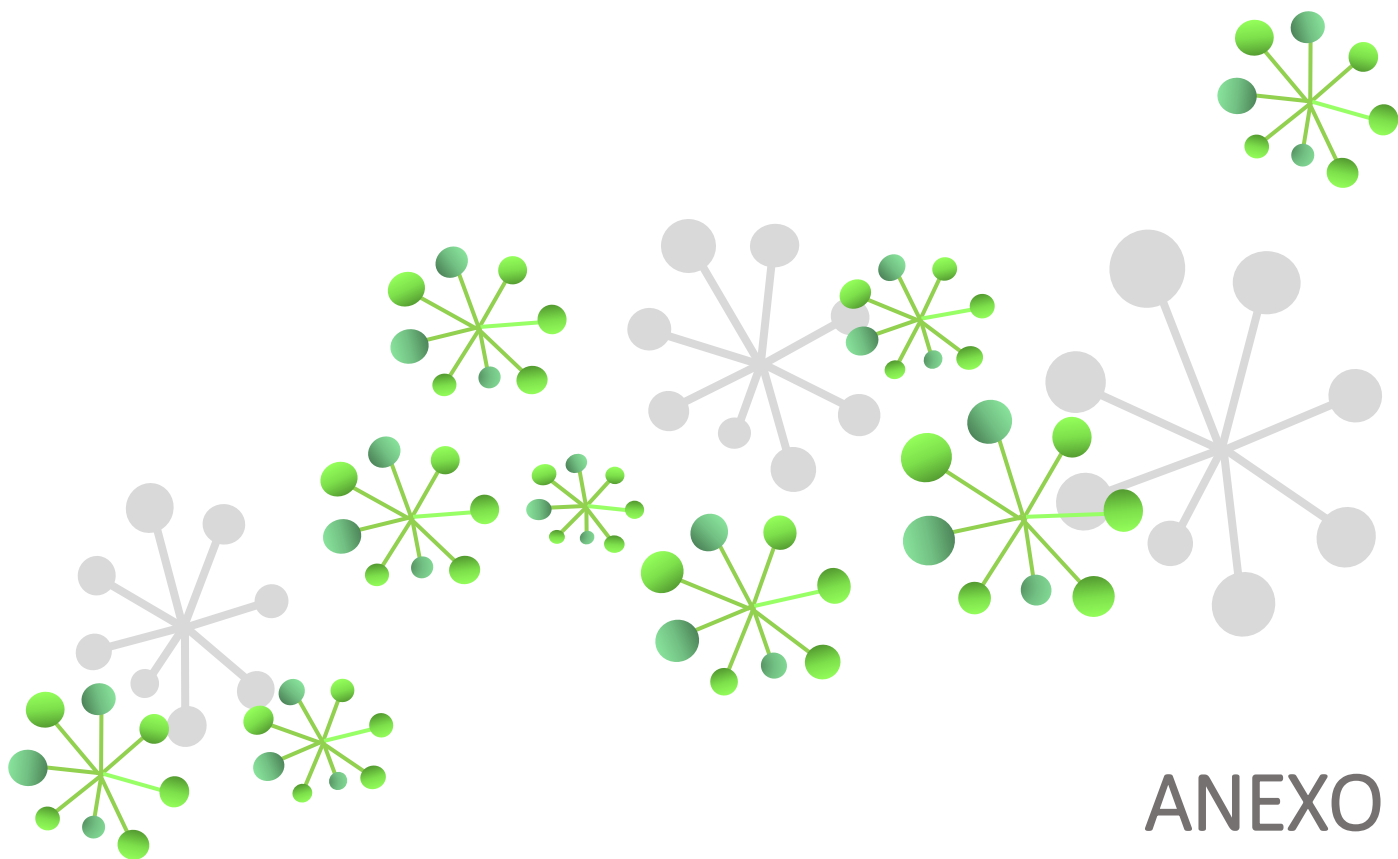
Perspectivas Futuras

A partir del presente trabajo surge el interés de profundizar en la caracterización de LGH como solvente de extracción, evaluando otros compuestos bioactivos tales como compuestos volátiles, terpenos y aminoácidos.

Asimismo, la necesidad de alinear completamente el procedimiento analítico con los principios de la Química Analítica Verde, motiva a adaptar los sistemas cromatográficos para incorporar a los solventes eutécticos naturales como componentes mayoritarios de la fase móvil, eliminando definitivamente el uso de solventes orgánicos.

Los bioextractos obtenidos mostraron un gran potencial para ser incorporados como ingredientes activos, por lo que es de gran interés complementar la caracterización de los mismos evaluando la presencia de otros compuestos activos, así como también evaluar su actividad frente a otros microorganismos.

Para poder concluir con aplicaciones fitoterápicas seguras, se deben realizar estudios de citotoxicidad, tanto de LGH como de los bioextractos y las formulaciones. Asimismo, se vislumbran numerosas posibilidades de aplicaciones de solventes eutécticos naturales en formulaciones farmacéuticas.



Anexo Tabla 1: Solventes eutécticos naturales descritos en la bibliografía.

NADES	Relación Molar	Dilución con agua (%)	Aplicaciones	Método de preparación	Ref
Derivados de ácidos orgánicos					
ácido málico : prolina	1:1	25;50;75	capacidad de estabilizar compuestos fenólicos	agitación y calentamiento a 50 °C	[1]
	1 ^(a) :1 ^(b,c)		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
	n.r		estudio de las propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento a 70 °C	[3]
DL- ácido málico : L-serina	2:3/1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
DL- ácido málico : β- alanina	2:3/1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
ácido málico : sucrosa	1:1		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas con frío	[2]
	1 ^(a) :1/2 ^(a) :1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
ácido málico : fructosa	1:1		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas con frío	[4]
ácido málico : glucosa	1:1				
DL- ácido málico :D-manosa	1:1	30	preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
DL- ácido málico :D (+)trehalosa	2:1				
DL- ácido málico : lactosa	2:1/1:1				
DL- ácido málico :betaína	1:1				
		30	extracción de flavonoides de <i>Flos sophorae</i>	secado en frío	[5]
DL- ácido málico : D-sorbitol	1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
DL- ácido málico :D(+)glucosa: D(-)fructosa	1:1:1				
DL- ácido málico : D(+)glucosa : glicerol	1:1:1				
DL- ácido málico : sucrosa: glicerol	1:1:2				
DL- ácido málico :betaína: D(+)glucosa	1:1:1				

DL-ácido málico :betaína:prolina	1:1:1				
ácido málico :prolina:agua	1:1:3	0-100	estudio de las propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento en baño de agua a 50°C(*)	[3]
			propiedades físicas de NADES	agitación y calentamiento a 50 °C	[2]
ácido málico :β:alanina:agua	1:1:3		estudio de las propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento en baño de agua a 50°C(*)	[3]
			propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento a 50 °C	[2]
maleic acid:glucosa	4:1		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secado en frío	[4]
maleic acid;sucrosa	1:1				
L (+)ácido tartárico:betaína	1:2		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
ácido tartárico:glucosa	1:1	7,5	uso como agentes plastificantes de polímeros para el desarrollo de estructuras porosas 3D	evaporación del agua con rotavapor a 50 °C(*)	[6]
	1 ^(e) :1 ^(d)		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
ácido láctico:sucrosa	1:2	20	extracción y determinación de fenoles en <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
			extracción y separación de flavonoides de <i>Radix Scutellariae</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[8]
ácido láctico:glucosa	1:2	20	extracción y determinación de fenoles en <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
	5:1		capacidad de estabilizar compuestos fenólicos	agitación y calentamiento a 50 °C	[1]
	5:1 ^(d)		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
ácido láctico:β- alanina	1:1				[2]
ácido láctico:betaína	2:1/5:1	5;10;15;20;50	pretratamiento de biomasa ligno-celulósica de paja de arroz	agitación en baño de agua a 60 °C 100 rpm	[9]
ácido láctico: D/L-prolina	1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
ácido láctico:glucosa:agua	5:1:3	0-100	estudio de las propiedades fisicoquímicas	calentamiento y agitación en baño de agua a 50°C(*)	[3]
			propiedades físicas de los NADES-solubilidad de pequeñas moléculas y de macromoléculas	agitación y calentamiento a 50 °C	[2]

ácido cítrico:sucrosa	1:1	6,4	uso como agentes plastificantes de polímeros para el desarrollo de estructuras porosas 3D	evaporación del agua con rotavapor a 50 °C(*)	[6]
			preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
			preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas con frío	
	1:2	20	extracción y determinación de fenoles en <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
			extracción y separación de flavonoides de <i>Radix Scutellariae</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[8]
ácido cítrico:glucosa	1:1	8.2	uso como agentes plastificantes de polímeros para el desarrollo de estructuras porosas 3D	evaporación del agua con rotavapor a 50 °C(*)	[6]
	1:1 ^(d)		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
		30	extracción de flavonoides de <i>Flos sophorae</i>	secado en frío	[5]
	1:2	20	extracción y determinación de fenoles en <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
			extracción y separación de flavonoides de <i>Radix Scutellariae</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[8]
ácido cítrico: D(-)fructosa	1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
ácido cítrico: D- manosa	1:1				
ácido cítrico:maltosa	2:1				
ácido cítrico:rafinosa	3:1				
ácido cítrico: trehalose	2:1 ⁽ⁱ⁾		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
	2:1		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas en frío	
ácido cítrico:adonitol	1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
		30	extracción de flavonoides de <i>Flos sophorae</i>	secado en frío	[5]
ácido cítrico: D-sorbitol	1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
ácido cítrico:xylitol	1:1				
ácido cítrico:ribitol	1:1				
ácido cítrico:prolina	1:1 ^(b) /1:2 ^(b) / 1:3 ^(b)				

	1:1/1:2/ 1:3		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas en frío	
ácido cítrico:β alanina	1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
ácido cítrico:betaína	1:1				
	2:1		solubilidad de aminoácidos	mezclando a 90°C	[10]
glycolic acid: betaína	2:1				
ácido oxálico: betaína	2:1				
ácido oxálico: betaína:D(+)-glucosa	1:1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
Mezclas de azúcares					
fructosa:sucrosa	1 ^(f) :1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
	1:1		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas en frío	[4]
glucosa:sucrosa	1:1				
glucosa:fructosa	1:1				
glucosa:sucrosa:fructosa	1:1:1				
fructosa:glucosa:sucrosa:agua	1:1:1:11		estudio de las propiedades fisicoquímicas	calentamiento y agitación a 50°C(*)	[3]
			Propiedades físicas de NADES	agitación y calentamiento a 50 °C	[2]
Derivados de cloruro de colina					
cloruro de colina:D(-)-fructosa	5:2		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
cloruro de colina:xylose	2:1	7	uso como agentes plastificantes de polímeros para el desarrollo de estructuras porosas 3D	evaporación del agua en rotavapor a 50 °C(*)	[6]
	3:1	5,6			
		2:1 ^(g) /3:1 ^(g)		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío
cloruro de colina:A- L rhamnosa	2:1				
cloruro de colina: D(+)-trehalosa	4:1				
cloruro de colina: (D)-manosa	5:2				
cloruro de colina: sorbosa	5:2/1:1				
cloruro de colina: D(+)-galactosa	5:2				
cloruro de colina:rafinosa	11:2				
cloruro de colina:maltosa	1:1/1:2 1:3/1:4	0,20,40,60	extracción y determinación de fenoles en <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
	1:2	20	extracción y determinación de flavonoides de <i>Radix Scutellariae</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[8]

	4:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
cloruro de colina:sorbitol	1:2	20	extracción y determinación de fenoles en <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
			extracción y determinación de flavonoides de <i>Radix Scutellariae</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[8]
	3:1 ^(h) /5:2 ^(h)		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
cloruro de colina:glucosa	1:1 ^(d)	30	extracción de flavonoides de <i>Flos sophorae</i>	secado en frío	[5]
	1:2	20	extracción y determinación de fenoles en <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
			extracción y determinación de flavonoides de <i>Radix Scutellariae</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[8]
	5:2	90	capacidad de estabilizar compuestos fenólicos	agitación y calentamiento a 50 °C	[1]
	5:2 ^(d)		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
cloruro de colina:xylitol	4:1		capacidad de estabilizar compuestos fenólicos	agitación y calentamiento a 50 °C	[1]
	5:2		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
		30	extracción de flavonoides de <i>Flos sophorae</i>	secado en frío	[5]
cloruro de colina:ribitol	5:2		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
cloruro de colina:glicerol	1:1/1:2		determinación de los coeficientes de actividad límites	agitación y calentamiento a 80 °C	[11]
	1:1	30	extracción de flavonoides de <i>Flos sophorae</i>	secado en frío	[5]
	1:2		extracción de astaxanthin	agitación y calentamiento a 80 °C	[11]
		20	extracción y separación de flavonoides de <i>Radix Scutellariae</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[8]
			extracción y determinación de fenoles de <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
			adjuvante en la extracción de saponinas de <i>Ziziphus joazeiro</i> y <i>Agave sisalana</i>	agitación y calentamiento a 100 °C	[12]
	1:1/3:2		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
cloruro de colina:sucrosa	1:1	6,4	uso como agentes plastificantes de polímeros para el desarrollo de estructuras porosas 3D	evaporación del agua en rotavapor a 50 °C(*)	[6]
			preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]

	1:2	20	extracción y determinación de fenoles en <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
			extracción y separación de flavonoides de <i>Radix Scutellariae</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[8]
	4:1	25;50;75	capacidad de estabilizar compuestos fenólicos	agitación y calentamiento a 50 °C	[1]
		8,1	uso como agentes plastificantes de polímeros para el desarrollo de estructuras porosas 3D	evaporación del agua en rotavapor a 50 °C(*)	[6]
			preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
cloruro de colina:ácido acético	1:2		adyuvantes en la extracción de saponinas de <i>Ziziphus joazeiro</i> y <i>Agave sisalana</i>	agitación y calentamiento a 100 °C	[12]
cloruro de colina:ácido láctico	1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
	1:2	20	extracción y determinación de fenoles en <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
			adyuvantes en la extracción de saponinas de <i>Ziziphus joazeiro</i> y <i>Agave sisalana</i>	agitación y calentamiento a 100 °C	[12]
	1:1/1:2/1:3/1:4/2:1/3:1	20;40 60;80	extracción and determinación de flavonoides en <i>Radix Scutellariae</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[8]
	1:2/1:5/1:9	5;10;15;20;50	pretratamiento de biomasa ligno-celulósica de paja de arroz	agitación en baño de agua a 60 °C y 100 rpm	[9]
cloruro de colina:ácido cítrico	1:1	7,7	uso como agentes plastificantes de polímeros para el desarrollo de estructuras porosas 3D	evaporación del agua en rotavapor a 50 °C(*)	[6]
	1:2	20	extracción y determinación de fenoles en <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
			extracción y separación de flavonoids de <i>Radix Scutellariae</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[8]
	1:1/2:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
	2:1/3:1		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas en frío	[4]
cloruro de colina:ácido málico	1:1		preparación de los NADES y estudios de NMR – solubilidad de compuestos	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas en frío	[4]

	1:2	20	extracción y determinación de fenoles en <i>Cajanus cajan</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[7]
			extracción y separación de flavonoids de <i>Radix Scutellariae</i>	agitación y calentamiento a 80 °C	[8]
	1:1 ^(a) /1,5:1 _(a)		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
	2:1/3:1		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas en frío	[4]
cloruro de colina:ácido malónico	1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
	1:2		adyuvantes en la extracción de saponinas de <i>Ziziphus joazeiro</i> y <i>Agave sisalana</i>	agitación y calentamiento a 100 °C	[12]
cloruro de colina:ácido maleico	1:1/2:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
	1:1/2:1/3:1		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas en frío	[2, 4]
cloruro de colina:ácido oxálico	1:2		adyuvantes en la extracción de saponinas de <i>Ziziphus joazeiro</i> y <i>Agave sisalana</i>	agitación y calentamiento a 100 °C	[12]
cloruro de colina:propionic acid	1:2		adyuvantes en la extracción de saponinas de <i>Ziziphus joazeiro</i> y <i>Agave sisalana</i>	agitación y calentamiento a 100 °C	[12]
cloruro de colina:L(+)-ácido tartárico	2:1		formación y estabilidad de NADES	evaporación con vacío	[2]
cloruro de colina:urea	1:2		catálisis y medio de reacción para síntesis de 4-tiazolidinonas	agitación y calentamiento a 100 °C	[13]
			catálisis y medio de reacción para la síntesis de auronas	agitación y calentamiento a 80 °C, 150 rpm	[14]
			adyuvantes en la extracción de saponinas de <i>Ziziphus joazeiro</i> y <i>Agave sisalana</i>	agitación y calentamiento a 100 °C	[12]
cloruro de colina:fructosa:agua	1:1:1		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas en frío	[4]
	5:2:5		evaluación de propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento en baño de agua a 50 °C(*)	[3]
			propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento a 50 °C	[2]
cloruro de colina:glucosa:agua	1:1:1		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas en frío	[4]

	5:2:5	0-100	evaluación de propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento en baño de agua a 50 °C(*)	[3]
			propiedades físicas de los NADES- solubilidad de pequeñas moléculas y de macromoléculas	agitación y calentamiento a 50 °C	[2]
cloruro de colina:sucrosa:agua	1:1:1		preparación de los NADES y estudios de NMR	evaporación a 30 °C a sequedad, luego las mezclas son secadas en frío	[4]
	4:1:4	0-100	evaluación de propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento en baño de agua a 50 °C(*)	[3]
				propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento a 50 °C
cloruro de colina:ácido láctico:agua	1:1		evaluación de propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento en baño de agua a 50 °C(*)	[3]
cloruro de colina:ácido málico : agua	1:1:2		evaluación de propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento en baño de agua a 50 °C(*)	[3]
			propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento a 50 °C	[2]
cloruro de colina:DL-ácido málico :prolina	1:1:1		preparación y estabilidad de los NADES	evaporación con vacío	[2]
cloruro de colina:DL-ácido málico :xylitol	1:1:1				
cloruro de colina : glicerol : agua	1:2:1		evaluación de propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento en baño de agua a 50 °C(*)	[3]
			propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento a 50 °C	[2]
cloruro de colina : sorbitol : agua	5:2:6		evaluación de propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento en baño de agua a 50 °C(*)	[3]
			propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento a 50 °C	[2]
cloruro de colina : xilitol : agua	2:1:3		evaluación de propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento en baño de agua a 50 °C(*)	[3]
			propiedades físicas de los NADES- solubilidad de pequeñas moléculas y de macromoléculas	agitación y calentamiento a 50 °C	[2]
cloruro de colina:xilosa:agua	2:1:2		evaluación de propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento en baño de agua a 50 °C(*)	[3]
			propiedades fisicoquímicas	agitación y calentamiento a 50 °C	[2]
Otras combinaciones					

betaína:sucrosa	2:1			evaporación con vacío	[2]
betaína: D(+)-trehalosa	4:1				
betaína:D-manosa	5:2				
betaína:sucrosa:prolina	1:1:1 5:2:2				
betaína:D-(+) glucosa:prolina	1:1:1				
D/L- prolina:sucrosa	2:1/3:1				
D/L- prolina: D-sorbitol	1:1				
prolina:D (+)glucosa	1(b,c):1/5(b,c):3				
	5(b):3	30	extracción de flavonoides de <i>Flos sophorae</i>	secado en frío	[5]

(a) DL- ácido málico (b) L-prolina (c) D-prolina (d) D(+)- glucosa (e) L(+)- tartárico (f) D(-)fructosa (g) D-xilosa (h) D- sorbitol (i) D(+)-trehalosa (*)mezcla con determinada cantidad de agua

Bibliografia

- [1] Y. Dai, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*), *Food Chemistry* 159 (2014) 116-121.
- [2] Y. Dai, J. van Spronsen, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Analytica Chimica Acta* 766 (2013) 61-68.
- [3] Y. Dai, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications, *Food Chemistry* 187 (2015) 14-19.
- [4] Y.H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I.W.C.E. Arends, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?, *Plant Physiology* 156(4) (2011) 1701-1705.
- [5] M.W. Nam, J. Zhao, M.S. Lee, J.H. Jeong, J. Lee, Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*, *Green Chemistry* 17(3) (2015) 1718-1727.
- [6] M. Martins, I.M. Aroso, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, R. Craveiro, A. Paiva, Enhanced performance of supercritical fluid foaming of natural-based polymers by deep eutectic solvents, *AIChE Journal* 60(11) (2014) 3701-3706.
- [7] Z. Wei, X. Qi, T. Li, M. Luo, W. Wang, Y. Zu, Y. Fu, Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography, *Separation and Purification Technology* 149 (2015) 237-244.
- [8] Z.-F. Wei, X.-Q. Wang, X. Peng, W. Wang, C.-J. Zhao, Y.-G. Zu, Y.-J. Fu, Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae*, *Industrial Crops and Products* 63 (2015) 175-181.
- [9] A.K. Kumar, B.S. Parikh, M. Pravakar, Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw: bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue, *Environmental science and pollution research* 23(10) (2016) 9265-9275.
- [10] F. Cardellini, M. Tiecco, R. Germani, G. Cardinali, L. Corte, L. Roscini, N. Spreti, Novel zwitterionic deep eutectic solvents from trimethylglycine and carboxylic acids: characterization of their properties and their toxicity, *RSC Advances* 4(99) (2014) 55990-56002.
- [11] S.P. Verevkin, A.Y. Sazonova, A.K. Frolova, D.H. Zaitsau, I.V. Prihodko, C. Held, Separation performance of BioRenewable deep eutectic solvents, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 54(13) (2015) 3498-3504.
- [12] B.D. Ribeiro, M.A.Z. Coelho, I.M. Marrucho, Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents, *European Food Research and Technology* 237(6) (2013) 965-975.
- [13] A. Mobinikhaledi, A.K. Amiri, Natural eutectic salts catalyzed one-pot synthesis of 5-arylidene-2-imino-4-thiazolidinones, *Research on Chemical Intermediates* 39(3) (2013) 1491-1498.
- [14] I. Hawkins, S.T. Handy, Synthesis of aurones under neutral conditions using a deep eutectic solvent, *Tetrahedron* 69(44) (2013) 9200-9204.