

Este trabajo está bajo licencia [CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)© por Lorena Celina Luna

Este trabajo de tesis es presentado a la Escuela de Posgrado
de la FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Para obtener el título de:
Doctora en Ciencias Químicas

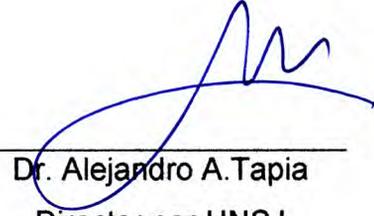
.....
MCs. Lorena Celina Luna

TEMA:

**Estudio de las propiedades antioxidantes y nutricionales de frutos
de especies autóctonas de la Provincia de San Juan**

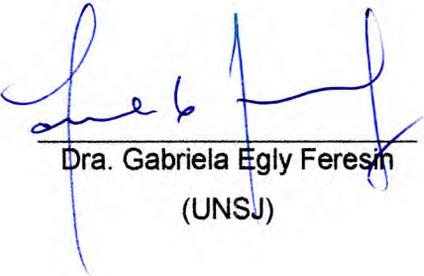


Dr. Daniel A. Wunderlin
Director por UNC

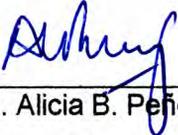


Dr. Alejandro A. Tapia
Director por UNSJ

Miembros de la Comisión:



Dra. Gabriela Egly Feresin
(UNSJ)



Dra. Alicia B. Peñeñory
(UNC)

Dr. Héctor Rubinstein
(UNC)

Este trabajo se desarrolló en los siguientes Institutos y Departamentos

- ✓ Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan.
- ✓ Instituto Superior de Investigación Desarrollo y Servicio en Alimentos, dependiente de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba.
- ✓ Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. España (Dr. Jaume Bastida).
- ✓ Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba (Dr. Damián Maestri).

A2470



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN JUAN

**Estudio de las propiedades
antioxidantes y nutricionales de frutos
de especies autóctonas
de la Provincia de San Juan**

MCs. Lorena Celina Luna

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Directores:

Dr. Daniel A. Wunderlin

UNC

Dr. Alejandro A. Tapia

UNSJ

Febrero, 2014.

trabaja: 12420

lo
obra: Autor

2
sistema

revisión

ción

en

de ingreso: 7/7/2014

/03/08/20

jml		
-----	--	--

A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota.

(Madre Teresa de Calcuta)

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Córdoba y a la Universidad Nacional de San Juan por brindarme la oportunidad de seguir aprendiendo y perfeccionarme.

A CONICET, por las becas doctorales Tipo I y Tipo II.

Al proyecto que financió este trabajo: Préstamo BID PICT 2008 N°0554- Dr. Wunderlin.

Al CICITCA-UNSJ, por el financiamiento de los proyectos que se llevan a cabo en el grupo de trabajo.

A mi director, Dr. Alejandro Tapia, por seguir enseñándome durante esta etapa, por confiar en mí. ¡Gracias!

A mi director, Dr. Daniel Wunderlin, por brindarme siempre una palabra de aliento y de sensatez cuando la necesité, y de humor también. ¡Muchas gracias!

A la Dra. Gabriela Feresin, siempre siendo la persona exigente y capaz de obtener un poco más de cada uno. Gracias por estar siempre en absolutamente todo, en el trabajo, en los detalles, en mi familia... Imposible agradecer tanto, pero igual... ¡¡¡Muchas gracias!!!

Al Dr. Damián Maestri, del IMBIV, muchas gracias por formar parte de esta etapa, por recibirme en el laboratorio, enseñarme y trabajar a mi lado. Muchas gracias.

Al Dr. Jaume Bastida y su equipo de trabajo, la Dra. Natalia Pigni y la Dra. Laura Torras-Claveria; de la Universidad de Barcelona, por trabajar y colaborar con este trabajo de tesis. ¡Gracias!

A la Dra. Alicia Peñeñory y al Dr. Héctor Rubinstein, de la Universidad Nacional de Córdoba, por acompañarme en esta etapa, por su dedicación y compromiso. Sus sugerencias siempre fueron muy constructivas para mí y sirvieron para optimizar este trabajo. Muchas gracias por su disponibilidad.

Al equipo de trabajo del ISIDSA: Verónica Baroni, por estar siempre para todas mis consultas y ser una persona con predisposición para encontrar siempre las soluciones, estaré siempre muy agradecida. A Natalia Podio, por ser parte de mi formación también, gracias por tu tiempo y tu dedicación.

A Magdalena Monferrán, gracias por colaborar con parte de este trabajo.

Al equipo de cátedra de la FCEF de la UNSJ, Ing. María Rosa Belbruno, gracias por enseñarme tanto y todo el tiempo, por exigirme y por creer en mí. A la Ing. Mariela Figueroa y al Bioingeniero Gustavo Pérez, por estar

siempre y trabajar de la manera que nos caracteriza... ¡Muchas gracias por tanto apoyo!

- A la gente de Productos Naturales del IBT: Beatriz, Cecilia, Javier, Belén, Liza, Flavia, Nahimé, Paula, Érica, Sandra y Emiliano. Gracias por ser parte de cada día de trabajo, por los almuerzos, por las risas, por las lágrimas, por todo lo que pasamos juntos.
- A la gente del Instituto de Biotecnología: María Eugenia Toro, Fabio Vazquez, Silvia Gouiric, Martha Vallejo, Cristina Nally, Daniela Vega, Paola Maturano, Emilio Paroldi, Emilce Medina, Virginia Pesce, Leticia Rodríguez, Lucía Martín, Fanny I, Fanny II y Adriana.
- A toda la gente de la FCEFEN de la UNSJ, a los directores de los Dptos. de Geofísica y Astronomía y del Dpto. de Biología. Los que pasaron por las diferentes gestiones durante estos años de doctorado. Gracias por el apoyo.
- A Ana Ferrón y a Sonia Villafañe, personas capaces de enseñar a llevar a cabo cualquier trámite. Gracias a ellas por enseñarme muchas cosas de la parte administrativa y por las charlas de las cuestiones de la vida. ¡Muchas gracias!
- A María Eugenia Chiari y Soledad del Corral, personas maravillosas que conocí y de quienes aprendí mucho en esta etapa. Gracias a ellas pude transitar momentos que incluyeron alojamiento con mucho cariño y mucha terapia de risas. ¡Muchísimas gracias!
- A Laura Tereschuk y Mariela González, las tucumanas que conocí en estos años. Excelentes personas que siempre están para esa simple e importante pregunta: "¿Cómo estás Lore?". ¡Gracias por estar siempre presente!
- A mi familia, en general, que es mucha y diversa, gracias a Dios. Gracias por estar pendientes siempre de mis "cosas", y por ayudarme en todo lo que pueden. Gracias a todos: mis suegros, cuñadas, sobrinos, mis tíos, primos, primas, y demás parte de la flia. Luna y de la flia. Vega.
- A mis amigas: Eli, Vicky, Caro, Sol, Lore R., Pato, Yani y Laura. Gracias por ser las hermanas que elegí tener. Gracias por ser parte de mi vida y dejarme ser parte de la de Uds.
- A mis amigos del alma y hermanos de la vida: Pato y Checho, que junto a sus preciosos hijos: Iván, Lucía y Ramiro, hacen que mi familia sea un poquito más grande. ¡Gracias por todo!
- A mi mamá, porque nada de esto sería posible sin ella. ¡Gracias por estar siempre, a pesar de todo!

- A mi papá, que siempre supo que yo podría. Gracias por enseñarme lo esencial de la vida, siempre, más allá de su “presencia” o “ausencia”.
- A mis hijas, las que cada vez entienden más qué hace su mamá. Gracias Aldana por ser una hermosa persona. Gracias Eloisa por ser la pequeña que siempre arranca una sonrisa.
- A Hugo, el que siempre está, en los detalles técnicos y en los no tan técnicos. Siempre aportando claridad, tranquilidad, apoyo, paciencia y lo esencial, el amor del día a día. ¡Gracias!

Índice General		Pág.
Resumen		1
Capítulo I	Introducción	3
	Actividad biológica de los fitoquímicos	4
	Los compuestos fenólicos y el estrés oxidativo	5
	Los antioxidantes, su química y su rol	7
	Especies Reactivas de Oxígeno	9
	Los Antioxidantes y los beneficios para la salud	10
	El consumo de alimentos o productos ricos en antioxidantes	11
	Alimento funcional	12
	Antioxidantes en la dieta	13
	Los minerales	14
	Los ácidos grasos	14
	Flora de San Juan: frutos autóctonos con potencial fitoquímico que le confieren propiedades funcionales o antioxidantes	16
	Fitoquímicos presentes en los frutos de estas especies	16
	Objetivo General	19
	Objetivos Específicos	19
Capítulo II	Materiales y Métodos	20
	Material vegetal	21
	Frutos de <i>Maytenus viscifolia</i> Griseb. (Celastraceae)	21
	Frutos de <i>Ramorinoa girolae</i> Speg (Fabaceae)	21
	Frutos de <i>Zuccagnia punctata</i> Cav. (Caesalpinieae)	21
	Preparación de extractos	21
	Determinación del contenido de fenólicos totales	23
	Determinación del contenido de flavonoides	25
	Determinación del contenido de antocianinas totales	26
	Análisis de ácidos grasos	28
	Análisis de minerales	28

Identificación y Cuantificación de compuestos, mediante HPLC-MS	29
Ensayos de actividad antioxidante	31
1- Ensayos “in vitro”	31
1.1. Actividad atrapadora del radical DPPH	31
1.2. Ensayo TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox)	33
1.3. Poder antioxidante del ión férrico reducido (FRAP)	35
1.4. Lipoperoxidación en membranas de eritrocitos humanos	36
2- Ensayos “in vivo” en levaduras	38
2.1. Ensayo de sobrevida	40
Análisis estadístico	40

Capítulo III Frutos de *Ramorinoa girolae* Spag. 42

Introducción	43
Resultados y Discusión	44
Determinación del contenido de fenólicos totales y flavonoides	45
Determinación del contenido de ácidos grasos	47
Análisis de Minerales	51
Caracterización de los compuestos fenólicos mayoritarios por CL-ESI-MS/MS y por CL-ESI-TOF-MS	56
Evaluación de la actividad antioxidante	61
1- Ensayos “in vitro”	62
1.1. Actividad atrapadora del radical DPPH	62
1.2. Ensayo del poder reductor del ión férrico (FRAP)	63
1.3. Ensayo de Folin – Ciocalteu	64
1.4. Inhibición de la lipoperoxidación en eritrocitos	65
2- Ensayos “in vivo” en levaduras	66
2.1. Evaluación de la actividad antioxidante frente a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
Ensayo de sobrevida	66
Correlación entre el contenido de FT y F, y la actividad antioxidante	68
Conclusión	70

Capítulo IV	Frutos de <i>Maytenus viscifolia</i> Griseb.	71
	Introducción	72
	Resultados y Discusión	75
	Determinación del contenido de fenólicos totales, flavonoides y antocianinas totales	75
	Evaluación de la actividad antioxidante	77
	1. Ensayos "in vitro"	77
	1.1. Actividad atrapadora del radical DPPH	77
	1.2. Ensayo del poder reductor del ión férrico (FRAP)	78
	1.3. Ensayo TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox)	79
	Correlación entre el contenido de FT y F, y la actividad antioxidante	79
	Caracterización de los compuestos fenólicos mayoritarios por LC-ESI-MS/MS y por LC-ESI-TOF-MS.	80
	Determinación del contenido de ácidos grasos	81
	Contenido Mineral	83
	Conclusión	86
Capítulo V	Frutos de <i>Zuccagnia punctata</i> Cav.	87
	Introducción	88
	Parte A	91
	Resultados y Discusión	92
	Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y antocianinas totales	93
	Caracterización y Cuantificación de compuestos fenólicos por CL-ESI-MS/MS y por CL-ESI-TOF-MS	96
	Parte B	103
	Evaluación de la actividad antioxidante	104
	1. Ensayos "in vitro"	104
	1.1. Actividad atrapadora del radical DPPH	104
	1.2. Ensayo TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox)	105
	1.3. Ensayo del poder reductor del ión férrico (FRAP)	107
	Parte C	110

Determinación del contenido de ácidos grasos	111
Análisis del contenido Mineral	113
Parte D	116
Análisis Estadístico	117
Estadística Multivariada	117
Conclusión	124

Capítulo VI Conclusiones **125**

Semillas de <i>Ramorinoa girolae</i> Speg.	126
Frutos de <i>Maytenus Viscifolia</i> Griseb.	127
Frutos de <i>Zuccagnia punctata</i> Cav.	127

Capítulo VII Bibliografía **130**

Producción científica	143
------------------------------	------------

Índice de Tablas		Pág.
Capítulo III	Frutos de <i>Ramorinoa girolae</i> Speg.	42
	Tabla III-1: Contenido de fenólicos totales y flavonoides de extractos seriados	46
	Tabla III-2: Contenido de minerales en las semillas	52
	Tabla III-3: Componentes mayoritarios del EMeOH	57
	Tabla III-4: Identificación tentativa de los compuestos mayoritarios en el EMeOH	60
	Tabla III-5: Ensayo Folin - Ciocalteu	65
	Tabla III-6: Coeficiente de Correlación de Pearson entre los valores de actividad antioxidante (DPPH y FRAP) y el contenido de FT de las semillas.	69
Capítulo IV	Frutos de <i>Maytenus viscifolia</i> Griseb.	71
	Tabla IV-1: Contenido de fenólicos totales, flavonoides y antocianinas totales en los extractos seriados	76
	Tabla IV-2: Poder reductor del ión Férrico (FRAP) de los EEP, EDCM y EMeOH-H ⁺ de los frutos	78
	Tabla IV-3: Correlación entre la actividad antioxidante, medida con los métodos de DPPH y FRAP, y el contenido de FT	79
	Tabla IV-4: Perfil de ácidos grasos de los frutos de <i>M. viscifolia</i>	82
	Tabla IV-5: Contenido mineral	84
Capítulo V	Frutos de <i>Zuccagnia punctata</i> Cav.	87
	Tabla V-1: Rendimiento porcentual de extractos seriados de los frutos de <i>Zuccagnia punctata</i>	93
	Tabla V-2: Contenido de F y de AT en los extractos según los sitios de colecta.	95
	Tabla V-3: Contenido de los compuestos caracterizados en los extractos de los frutos de <i>Z. punctata</i> .	100
	Tabla V-4: Contenido de los compuestos caracterizados en los extractos de los frutos de <i>Z. punctata</i> (Continuación de Tabla V-3)	101
	Tabla V-5: Composición de ácidos grasos de los EEP de los frutos	112
	Tabla V-6: Contenido de minerales de los frutos de <i>Zuccagnia punctata</i>	114

Índice de Figuras		Pág.
Capítulo I	Introducción	3
	Figura I-1: Clases de compuestos antioxidantes	8
Capítulo II	Materiales y Métodos	20
	Figura II-1: Reacción general de la formación del complejo de un flavonoide con el $AlCl_3$	26
	Figura II-2: Formas estructurales predominantes de antocianinas presentes a diferentes pH.	27
	Figura II-3: Reacción del ensayo de decoloración del radical DPPH	32
	Figura II-4: Reacción del ensayo TEAC	34
	Figura II-5: Reacción del ensayo FRAP	36
	Figura II-6: Reacción de obtención de los TBARS ($\lambda = 530 \text{ nm}$), a partir del MDA y el TBA	37
Capítulo III	Frutos de <i>Ramorinoa girolae</i> Speg.	42
	Figura III-1: Contenido de ácidos grasos	48
	Figura III-2: Contenido de minerales de las semillas de <i>R. girolae</i>	53
	Figura III-3: Cromatograma del EDCM	56
	Figura III-4: Cromatograma del EMeOH	57
	Figura III-5: Estructuras químicas de los compuestos identificados en el EMeOH	59
	Figura III-6: Capacidad de decoloración del radical DPPH de los extractos EP, DCM y MeOH	63
	Figura III-7: Ensayo del poder reductor del ión férrico de los EDCM y EMeOH	64
	Figura III-8: Porcentaje de sobrevida de <i>S. cerevisiae</i> de catequina	67
	Figura III-9: Reacción de Fenton y de Haber-Weiss	68
Capítulo IV	Frutos de <i>Maytenus viscifolia</i> Griseb.	71
	Figura IV-1: Capacidad de captura del radical DPPH de los extractos seriados	77
	Figura IV-2: Composición de ácidos grasos mayoritarios del aceite de los frutos de <i>M. viscifolia</i> .	81

Capítulo V	Frutos de <i>Zuccagnia punctata</i> Cav.	87
<hr/>		
Figura V-1:	Esquema del tratamiento de los frutos de <i>Z. punctata</i>	92
Figura V-2:	Contenido de FT de los EEP, EDCM y EMeOH-H ⁺ de los frutos de Bauchaceta, Hualilán y Ullum.	94
Figura V-3:	Estructura de los compuestos caracterizados en los EEP, EDCM y EMeOH-H ⁺ de los frutos	98
Figura V-4:	% Captura del radical DPPH de los EEP, EDCM y EMeOH-H ⁺ de Bauchaceta, Hualilán y Ullum de los frutos de <i>Z. punctata</i> , a 5 µg/mL.	104
Figura V-5:	Resultados del ensayo TEAC de los EEP, EDCM y EMeOH-H ⁺ de Bauchaceta, Hualilán y Ullum	107
Figura V-6:	Resultados del ensayo FRAP de los EEP, EDCM y EMeOH-H ⁺ de los frutos de Bauchaceta, Hualilán y Ullum	108
Figura V-7:	Análisis de componentes principales de la composición química de los extractos seriados de los frutos de Bauchaceta, Hualilán y Ullum	119
Figura V-8:	Análisis de componentes principales de la actividad antioxidante de los extractos seriados de los frutos de Bauchaceta, Hualilán y Ullum	120
Figura V-9:	Análisis del contenido mineral de los frutos de <i>Z. punctata</i> de Bauchaceta, Hualilán y Ullum	123

Resumen

Los estudios epidemiológicos y clínicos en el campo de la nutrición, han demostrado los beneficios, respecto a la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas, con el incremento en el consumo de frutas y vegetales. La evidencia epidemiológica indica que los antioxidantes contenidos en frutas y verduras pueden ayudar a prevenir el desarrollo de enfermedades.

En la Provincia de San Juan, Argentina, la flora comprende alrededor de 1400 especies que crecen bajo condiciones edáficas y climáticas particulares (amplitud térmica, una elevada radiación, especialmente de rayos UV). El objetivo fue evaluar la actividad antioxidante y el aporte de oligoelementos en frutos autóctonos de la Provincia de San Juan, en vista a su valorización nutricional o a su uso como parte de suplementos dietarios. La actividad antioxidante se evaluó por diferentes métodos, tales como: capacidad de captura del radical DPPH, capacidad antioxidante equivalente a Trolox (ensayo TEAC), poder antioxidante del ión férrico reducido (ensayo FRAP), lipoperoxidación en membranas de eritrocitos humanos y ensayos "in vivo" en levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Los frutos de tres especies *Ramorinoa girolae*, *Maytenus viscifolia* y *Zuccagnia punctata* fueron evaluados en relación al contenido de compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos grasos y el aporte de oligoelementos así como también la actividad antioxidante.

R. girolae: el extracto metanólico (EMeOH) de sus semillas fue el que presentó mayor contenido de compuestos fenólicos totales. Se caracterizaron cinco compuestos fenólicos: derivados del ácido cumárico, (Epi) gallocatequina, catequina-O-glucósido, procianidina B (dímero de catequina) y catequina. Los ácidos grasos insaturados fueron mayoritarios, principalmente ácido oleico. El perfil de los minerales mostró que potasio, magnesio y calcio fueron los principales constituyentes.

M. viscifolia: en estos frutos se el contenido de fenólicos totales, flavonoides y antocianinas totales fue moderado. La actividad antioxidante en los extractos seriados fue baja. Los ácidos linoleico y oleico fueron los ácidos grasos mayoritarios. Mientras que potasio, sodio, calcio, magnesio y zinc, fueron los minerales mayoritarios presentes.

Z. punctata: Los frutos colectados en tres sitios de la provincia de San Juan: Bauchaceta, Hualilán y Ullúm, a 2600, 1800 y 700 metros sobre el nivel del mar respectivamente. Los extractos metanólicos ácidos (EMeOH-H⁺) de Bauchaceta y Hualilán presentaron mayor contenido de fenólicos totales. Tanto los extractos no polares como los polares, para los tres sitios mostraron un elevado contenido de flavonoides. Mientras que respecto al contenido de antocianinas totales, y los EMeOH-H⁺ de Bauchaceta fueron los que presentaron los valores más elevados. Los frutos de los lugares de mayor altura (Hualilán y Bauchaceta), mostraron mayor efecto antioxidante.

Los ácidos grasos mayoritarios fueron los ácidos oleico y palmítico en los tres sitios de colecta. El contenido de minerales presentó como mayoritarios a: potasio, calcio, magnesio, sodio, hierro y zinc. Además, se caracterizaron y cuantificaron 15 compuestos: ácido gálico, catequina, eriodictiol-O-hexósido, isoquercetina, eriodictiol, quercetina, naringenina, apigenina, kaempferol, 7-hidroxi-flavanona, pinocembrina, crisina, galangina, 2',4'-dihidroxi-chalcona y 2',4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona. Todos los compuestos caracterizados se informan por primera vez en estos frutos, y diez de ellos son presentados por primera vez como constituyentes de la especie.

Este trabajo, permitió concluir que es posible asignar un valor adicional a los frutos de especies nativas, que se manifiesta a través del conocimiento de los metabolitos que poseen, y su relación, en este caso, a la capacidad antioxidante, sobre la base de los requerimientos nutricionales para proteger los sistemas vivos del estrés oxidativo, con la consecuente búsqueda constante de nuevas fuentes naturales (de modo sustentable) de moléculas capaces de contrarrestar los efectos nocivos de la vida moderna.

Abreviaturas

- μL : microlitro
- μm : micrómetro
- ABTS \cdot : ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
- AG: ácido gálico
- AlCl_3 : tricloruro de aluminio
- AO: ácido oleico
- CG: cromatografía gaseosa
- CHO: hidratos de carbono
- CRM: material de referencia certificado
- CV: coeficiente de variación
- d.i.: diámetro interno
- DE: desviación estándar
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidracilo
- EAG: equivalente de ácido gálico
- ECV: enfermedades cardiovasculares
- EDCM: extracto diclorometano
- EEP: extracto de éter de petróleo
- EMeOH-H: extracto metanólico
- EMeOH-H $^+$: extracto metanólico ácido
- EQ: equivalentes de quercetina
- F: flavonoides
- FAME: ésteres metílicos de ácidos grasos
- FC: reactivo Folin-Ciocalteu
- FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power
- FT: Fenólicos totales
- g: gramo
- GTP: glutatión peroxidasa
- HCl: ácido clorhídrico
- HO \cdot : radical oxidrilo
- HPLC ESI-MS/MS: High Performance Liquid Chromatography – electrospray tandem mass spectrometry
- IY: índice de yodo

- $K_2S_2O_8$: peroxodisulfato de potasio
- $K_3Fe(CN)_6$: ferricianuro de potasio
- LC-ESI-QTOF-MS: Liquid Chromatography – Electrospray - Mass spectrometry
- LOD: límites de detección
- $LOO\cdot$: radical peroxilo
- LOQ: límites de cuantificación
- LPO: lipoperoxidación
- m.s.n.m.: metros sobre el nivel del mar
- MDA: malondialdehído
- MEAG: metiléster de ácidos grasos
- mg: miligramo
- min: minuto
- mL: mililitro
- mm: milímetro
- mM: milimolar
- MUFA: ácidos grasos monoinsaturados
- nm: nanómetro
- $O\cdot$: oxígeno singlete
- $O_2\cdot^-$: anión superóxido
- $ONOO\cdot$: peroxinitrato
- PBS: buffer fosfato salino
- ppm: partes por millón
- PUFA: ácidos grasos poliinsaturados
- Q: quercetina
- Q-ICPMS: Quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry
- RNA: ácido ribonucleico
- RNS: especies reactivas de nitrógeno
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- SFA: ácidos grasos saturados
- SOD: superóxido dismutasa
- TBA: ácido tiobarbitúrico
- TBARS: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
- TCA: ácido tricloroacético
- TE: transferencia de electrones
- TEAC: Trolox Equivalence Antioxidant Capacity

- UV: Ultravioleta
- WT: Wild Type
- YPD: Yeast Peptone Dextrose
- YPDA: Yeast Peptone Dextrose Agar

Capítulo I

Introducción

Los estudios epidemiológicos y clínicos en el campo de la nutrición han demostrado los beneficios especialmente en lo que respecta a la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas con el incremento en el consumo de frutas y vegetales (Ness y Ponles, 1997; Steinmetz y Potter, 1991, Urquiaga y Leighton, 2000; Liu, 2003; Flora, 2007; Wolfe, K.L. y Liu, R.H., 2007). Estos alimentos, poseen sustancias que le otorgan estas características benéficas para la salud y se conocen como metabolitos bioactivos o secundarios de origen vegetal, que se denominan también fitoquímicos o fitonutrientes (Hannum, 2004). Debido a sus propiedades, efectos biológicos y a sus atributos sensoriales (King y col., 1999 y Belnstein, 2001), actualmente ocupan un área de investigación cada vez más relevante y amplia, con un gran futuro, dada la enorme variedad de alimentos que los contienen. Una clase de estas moléculas, son los compuestos fenólicos, presentes fundamentalmente en las frutas rojas, en las moradas y en los cítricos (Tomás-Barberán, 2003; Waladkhani y Clemens, 1998; Kris-Etherton y col., 2002; Tomás-Barberán, 2000; Rivas-Gonzalo y García-Alonso, 2002). Se incluyen los flavonoides (antocianinas, flavonoles y flavonas, flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, isoflavonas —aunque éstas se encuentran casi exclusivamente en legumbres— y flavanoles), fenilpropanoides (derivados de ácidos hidroxicinámicos, como el cafeico, ferúlico sinápico y *p*-cumárico), estilbenoides (resveratrol y piceatanol) y derivados del ácido benzoico (ácidos gálico y elágico). Respecto a estas sustancias bioactivas, el grupo mayoritario está constituido por los flavonoides, de los que se conocen más de 5.000 compuestos diferentes (Martínez-Navarrete y col., 2008).

Actividad biológica de los fitoquímicos

Existen numerosos estudios (Martínez-Navarrete y col., 2008; Wootton-Beard y col., 2011; Beserra Almeida y col., 2011; Proestos y col, 2013) que apoyan el impacto sobre la salud que aporta el consumo de fitoquímicos, actúan previniendo determinadas enfermedades, tales como son las cardiovasculares, las cerebrovasculares y el

cáncer, además de la enfermedad de Alzheimer, cataratas y algunas disfunciones asociadas a la edad (Wootton-Beard y col., 2011; Beserra Almeida y col., 2011). De los fitoquímicos mencionados anteriormente, los principales responsables de esta capacidad son los polifenoles, que se encuentran presentes en la mayoría de los alimentos y se los reconocen como los antioxidantes naturales. Se ha establecido entonces por diversos autores (Tomás-Barberán, 2003; Martínez-Navarrete y col., 2008, Kaume y col, 2012; Garcia-Salas y col., 2010) desde hace tiempo que la presencia de polifenoles en frutos y vegetales de la dieta contribuye al mantenimiento de un buen estado de salud. Estos compuestos bioactivos poseen actividad antioxidante (Rice-Evans, 2001; Scalbert y col., 2005; Avery, 2011), por lo que tienen un rol muy importante en la prevención de enfermedades como el cáncer (Hertog y col., 1996; Lambert y col., 2005) y enfermedades cardiovasculares (Geleijnse y col., 2002; Vita, 2005). También exhiben acción neuroprotectiva (Youdim y col., 2002, Flora, 2007; Ashraf y Gupta, 2011), antidiabética (Matsui y col., 2002; Tsuda y col., 2003), y contribuyen en la reducción de la obesidad (Tsuda y col., 2003). Su acción es proteger la célula frente al daño oxidativo generado por la sobreproducción de los radicales libres, evitando los efectos del deterioro de los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos celulares (Rice-Evans, 2001; Rice-Evans y col., 1996). También se informó la interacción de los polifenoles con receptores de enzimas que están involucradas en la transducción de señales (Moskaug y col., 2005; Gutteridge y Halliwell, 2010).

Los compuestos fenólicos y el estrés oxidativo

De todas las propiedades mencionadas de los compuestos fenólicos, lo más estudiado son sus propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante (Rivas-Gonzalo y García-Alonso, 2002; Velioglu y col., 1998; Prior y Guohua, 2000; Liu y col., 2002 y Wolfe y col., 2003, Ashraf y Gupta, 2011; Avery, 2011 y Gutteridge y Halliwell, 2010). En términos generales, la respiración en presencia de oxígeno resulta esencial en la vida celular del organismo, pero como consecuencia de

ésta se producen intermediarios reactivos conocidos como radicales libres, que pueden formar parte de diversas reacciones y presentar diferentes consecuencias como producir alteraciones genéticas de determinadas células (con lo que así aumenta el riesgo de tener cáncer), o también reducir la funcionalidad de otras, hecho característico en el envejecimiento.

Las células, en aerobiosis, producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) como consecuencia del metabolismo celular normal. Estas especies también son generadas por células fagocíticas en reacciones inflamatorias controladas, que liberan oxidantes con el objetivo de destruir células infectadas por bacterias o virus, formando parte de la defensa inmunitaria del organismo. Además, el hombre está sometido permanentemente a la acción de radicales libres externos por exposición a diferentes factores ambientales, como son las radiaciones ionizantes, los rayos UV, el consumo de tabaco (genera RNS), la radiación gamma, etc. (Elsayed, 2001).

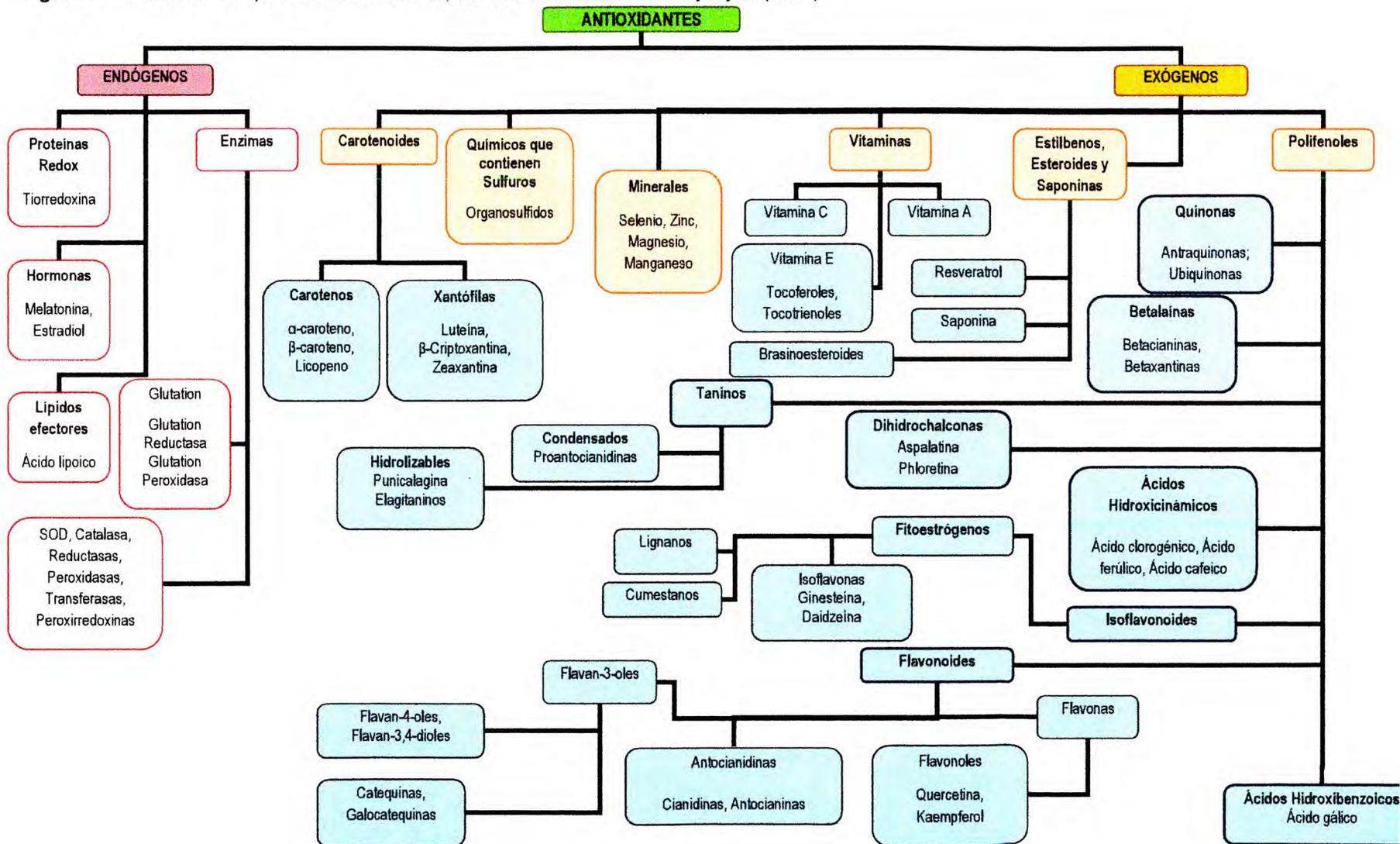
La generación en exceso de estas especies reactivas puede conducir a un “estrés oxidativo”, definido como un incremento en la producción de ROS, tales como el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical oxidrilo (HO^{\bullet}), etc. (Gozin y col., 1999), produciendo un desequilibrio en el estatus antioxidante/oxidante del cuerpo humano. Estas especies son capaces de dañar o destruir la función de otras macromoléculas, como por ejemplo lípidos de membranas celulares produciendo la peroxidación lipídica, como así también las proteínas, enzimas, ADN y pueden conducir a la muerte celular (apoptosis). Cuando el equilibrio redox de la célula se modifica por un estímulo oxidante externo, se produce una respuesta al estrés redox. Los organismos aeróbicos han desarrollado múltiples formas de descomponer las ROS a través de un aumento (*up-regulation*) en enzimas de detoxificación (ej. catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa) y moléculas captadoras de radicales libres como el glutatión y la tioredoxina (Di Paola y col., 2006; Monferrán y col., 2007, 2008 y Monferrán y col., 2009). Esta situación está asociada con los cambios en la

dieta y el estilo de vida, como por ejemplo las dietas ricas en grasas, bajo consumo de frutas y verduras, sedentarismo, hábito de fumar y la contaminación ambiental. Este sistema de defensa endógeno puede ser reforzado por los antioxidantes provenientes de la dieta, ayudando a mantener el estatus antioxidante en el organismo.

Los antioxidantes, su química y su rol

Halliwell (1990) define a los antioxidantes biológicos como "moléculas que, cuando están presentes en concentraciones pequeñas, en comparación con las biomoléculas que se supone deben proteger, pueden prevenir o reducir el alcance de la destrucción oxidativa de biomoléculas". El término "antioxidante" abarca una amplia gama de sustancias que se dividen en antioxidantes endógenos y exógenos (Wootton-Beard y Ryan, 2011) como se muestra en el esquema a continuación. Los antioxidantes difieren en su eficacia frente a diferentes sustratos, es decir que algunos son potentes captadores de radicales libres, mientras que otros como por ejemplo, los carotenoides son particularmente eficaces en la inhibición de la oxidación causada por el oxígeno singlete (Niki y Noguchi, 2000). Además, algunos antioxidantes reaccionan oxidándose a sí mismos, cumpliendo así un papel de limitante de la velocidad de las etapas de iniciación, propagación y terminación de las reacciones en las que un "radical antioxidante" resultante es menos reactivo. A su vez, es ampliamente aceptado que muchos compuestos tradicionalmente considerados como antioxidantes tienen funciones no antioxidantes importantes, como son las que incluyen el mantenimiento del equilibrio redox (Forman y col., 2002), como así también la estimulación del elemento de respuesta antioxidante y varios actúan en el rol de señalización de reacciones (Hensley y col., 2000), así como también presentan cierto impacto en la oxidación de lípidos, proteínas y ADN (Valko y col., 2007). Algunos ejemplos de estos compuestos son los polifenoles, la vitamina C, el α -tocoferol y los carotenoides; ya que su capacidad antioxidante o pro-oxidante depende tanto de la concentración como de la especie con la que reaccione (Wootton-Beard y Ryan, 2011).

Figura I-1: Clases de compuestos antioxidantes, tomado de Wootton-Beard y Ryan (2011).



Se ha sugerido además, que algunas moléculas que se cree tradicionalmente que actúan como antioxidantes, tales como los polifenoles, también pueden tener efectos pro-oxidantes en ciertos tejidos (Azam y col., 2004). Y ante esta posición es que en diversos trabajos se plantea que si los antioxidantes dietéticos actúan de manera más beneficiosa como antioxidantes o como moléculas pro-oxidantes, en el mantenimiento de un nivel óptimo de ROS para la salud (Wootton-Beard y Ryan, 2011).

Especies Reactivas de Oxígeno

El oxígeno molecular es el principal promotor de la formación de los radicales libres en las células. La configuración electrónica de la molécula de oxígeno en su estado fundamental (oxígeno triplete) contiene dos electrones desapareados, por lo que la molécula de oxígeno puede aceptar electrones de uno en uno. El radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) se forma por adquisición de un electrón en el sistema de transporte de electrones mediante un aporte energético exterior y el oxígeno puede aparear uno de sus electrones libres adquiriendo una carga negativa como primer estadio de la reducción monovalente del oxígeno molecular. El electrón no apareado en la capa de valencia del radical superóxido hace que sea reactivo y que posteriormente reacciona con otras moléculas para formar radicales secundarios, como el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), peroxinitrato ($ONOO^{\bullet}$) y el radical peroxilo (ROO^{\bullet}), que se puede dividir para formar oxígeno singlete (O^{\bullet}), como así también especies reactivas de oxígeno no radicalarias tales como el peróxido de hidrógeno. En los organismos aerobios, el origen de los electrones necesarios para estos procesos está en la cadena respiratoria, ya que el oxígeno molecular actúa como aceptor final de los electrones liberados durante el metabolismo oxidativo. También se generan radicales libres durante la actuación de ciertas enzimas como la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa y la monoaminoxidasa. En condiciones normales la eliminación de ROS puede estar regulada por enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GTP) y la catalasa (como se muestra en el Esquema anterior), haciendo que el

consumo de antioxidantes adicional sea importante. Sin embargo, en períodos de exceso de la producción de ROS, o de baja-regulación de las enzimas antioxidantes inducidas por la presencia de enfermedades cardiovasculares (Van't Berkel y col., 2003), por ejemplo; se propone que el aumento de la ingesta de antioxidantes puede resultar beneficioso para mantener un equilibrio óptimo de ROS en el organismo (Wootton-Beard y Ryan, 2011).

Los Antioxidantes y los beneficios para la salud

La evidencia epidemiológica sigue siendo la base de la suposición de que los antioxidantes contenidos en frutas y verduras pueden ayudar a prevenir o afectar el desarrollo de enfermedades (Wootton-Beard y Ryan, 2011). Además, existen diversas pruebas *in vitro* que tienen funciones sobre todo en enfermedades cardiovasculares (ECV), neurológicas, cáncer y también pueden tener un papel en la regulación de la diabetes tipo 2. La relación entre las ECV y los antioxidantes se estableció por el papel como limitantes de la velocidad de los éstos durante la peroxidación de lípidos (Griendling y FitzGerald, 2003). Para el caso del cáncer, se sabe que la proliferación de células cancerosas puede ser iniciada por daños celulares mediados a su vez por ROS, disfunción inmune, y la regulación de la expresión génica. Fundamentalmente, debe haber una alteración en uno de los dos tipos de genes que regulan tanto el crecimiento y como la diferenciación celular (oncogenes y genes supresores de tumores) con el fin de que una célula se convierta en cancerosa (Croce, 2008). También es sabido que la deficiencia de una serie de micronutrientes puede causar o contribuir a esta enfermedad (Wootton-Beard y Ryan, 2011).

Asimismo, en cuanto a las enfermedades neurológicas, Berr y col. (2000), llegaron a la conclusión de que el estrés oxidativo y la deficiencia de antioxidantes podrían clasificarse como factores de riesgo para este tipo de enfermedades. En general se acepta que las ROS pueden contribuir a la progresión patológica de la disminución

neurológica en los ancianos y que los antioxidantes podrían revertir estos efectos (Mattson, 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS), se refiere a la diabetes tipo 2 y menciona que se caracteriza por hiperglucemia causada por un defecto en la secreción de insulina, por lo común acompañado de resistencia a esta hormona (OMS, 2006). Además, la insulina es responsable de glucogénesis después de la eliminación de la glucosa de la sangre por las células del hígado y los músculos. Recientemente, se ha propuesto que los antioxidantes pueden jugar un papel importante, ya sea en el aumento de la sensibilidad a la insulina o la modulación del aumento de la glucosa en sangre, seguido por el consumo de hidratos de carbono (CHO) a través de su interacción con las enzimas digestivas (Bryans y col., 2007).

Una forma de prevenir o disminuir el efecto de estas enfermedades es la terapia con antioxidantes o la incorporación de los mismos a través de la dieta (Urquiaga y Leighton, 2000). Por esto es que la mayor atención de los trabajos de investigación se enfocan en la administración oral de capturadores de radicales libres o la incorporación en los alimentos de extractos ricos en polifenoles, los que podrían generar mayores beneficios para la salud, más allá de los atribuidos a las funciones nutricionales básicas (Netzel y col., 2006). Es así que existe una demanda considerable de nuevas fuentes de antioxidantes no tóxicos, derivados de productos naturales, activos en sistemas lipofílicos e hidrofílicos con posible aplicación como sustitutos de preservantes sintéticos en alimentos, en cosmética o en productos farmacéuticos (Peschel y col., 2006).

El consumo de alimentos o productos ricos en antioxidantes

El concepto clásico de “nutrición adecuada” que aporta los nutrientes suficientes (hidratos de carbono, proteínas, grasas, vitaminas y minerales) para satisfacer las necesidades orgánicas tiende a ser sustituido por el de “nutrición óptima”, que incluye, además, la potencialidad de los alimentos para promocionar la salud, mejorar el

bienestar y reducir el riesgo de desarrollar enfermedades. En este ámbito es donde, desde finales del siglo XX, aparecen los alimentos funcionales.

Alimento funcional

Una dieta equilibrada debe garantizar una salud óptima, reduciendo los riesgos de enfermedades carenciales y de enfermedades crónicas-degenerativas, sin dejar de ser satisfactoria para el paladar (Gonzalvo-Heras y col., 2006). Nuestro estilo de vida actual ha ido cambiando los hábitos de consumo alimentario, exigiendo una mayor calidad en los productos naturales. Debido a esta demanda, surge la creación de nuevos alimentos aplicando nuevos conocimientos científicos y tecnológicos que permitan desarrollar productos destinados a mejorar la salud. La definición de alimento del International Life Science Institute (ILSI) en 2004, establece que éste puede ser considerado funcional si en su forma natural o procesada contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional. Estos efectos positivos deberán justificar que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable, si se ha demostrado de forma satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales y que es relevante para la mejora de la salud, el bienestar y la reducción del riesgo de enfermar (ILSI, 2004). Los alimentos funcionales, en la medida que implican nuevos nutrientes o proporciones diferentes de los mismos, pueden considerarse nuevos alimentos, según la clasificación establecida por la Unión Europea y por el Comité Científico de la Alimentación Humana (Knudsen, 1999).

Algunos ejemplos de alimentos funcionales son los enriquecidos con determinadas vitaminas, minerales, fibra alimenticia o ácidos grasos y los alimentos a los que se les han añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos y otros antioxidantes. Actualmente, ya están disponibles en el mercado de diferentes países

unos 200 productos de este tipo, sobre todo pan, cereales, lácteos, zumos y sal. Esto se debe a que la industria alimentaria, puede proveer alimentos con composición físico-química controlada o modificada, según el objetivo que se desea obtener con su ingesta, basada en el principio del beneficio para la salud.

Aunque la oferta de alimentos funcionales en el mercado argentino es creciente, actualmente no se dispone de normas específicas para regular su comunicación al consumidor y se rige por las disposiciones generales del Código Alimentario Argentino. (Millone y col., 2011).

Esto abre grandes perspectivas tanto en investigación respecto a la prevención de ciertas enfermedades, y el impacto de diversos nutrientes en patologías como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurológicas, como para la industria farmacéutica en la utilización de fitoquímicos para el desarrollo de nuevos fármacos.

Así es que tanto la intensa actividad biológica de los fitoquímicos, junto con el rol que cumplen algunos micronutrientes, hacen que ambos tipos de compuestos contribuyan a la denominación de determinados alimentos como funcionales (Martínez-Navarrete y col., 2008). El surgimiento del estudio y de la promoción de los alimentos funcionales surge en el momento en que el consumidor muestra su interés y su necesidad por contribuir a mantener un buen estado de salud a través, principalmente, de la alimentación.

Antioxidantes en la dieta

En el ámbito de la ciencia de los alimentos, los antioxidantes tienen un alcance más amplio, en el que se incluyen componentes que impiden que las grasas de éstos se tornen rancias, así como los antioxidantes dietéticos son aquellos considerados como sustancias que disminuyen significativamente los efectos adversos de las especies reactivas (ROS y RNS), sobre la función fisiológica normal en humanos, considerado así también por la medicina. Al igual que las otras definiciones, esta definición no

proporciona limitación en el o los mecanismo/s de acción antioxidante. Por lo tanto, un antioxidante dietético puede reaccionar con las especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS) para detener reacciones en cadena de radicales libres, o puede inhibir los oxidantes reactivos que se formen en el primer lugar, logrando así una acción preventiva. Es decir, que los antioxidantes de la dieta, en términos generales, incluyen aquellos que son inhibidores de la reacción en cadena de radicales libres, como así también a los quelantes de metales, los inhibidores de enzimas oxidativas, y los cofactores de enzimas antioxidantes.

Los minerales

Por otra parte ciertos elementos como Cr, Co, Cu, Fe, Mn y Zn, entre otros, son considerados esenciales para el hombre. Éstos son sustancias que intervienen como reguladores en las funciones respiratoria, digestiva, neurovegetativa y muscular y como tal deben estar presentes en la alimentación. Por ejemplo, Zn es un elemento traza muy importante en la nutrición humana ya que interviene en las funciones bioquímicas del metabolismo, actúa como factor activador de varias enzimas (anhidrasa carbónica, fosfatasa alcalina y otras enzimas que intervienen en la síntesis de ácidos nucleicos) y estabilizando la estructura del RNA. Su deficiencia produce retardo en el crecimiento, diarrea, interferencias en las funciones cerebrales y disminución en la respuesta inmune. El Cu, también cumple numerosas funciones bioquímicas, forma parte de varias metaloenzimas, tal como la superóxido dismutasa citosólica, implicada en el sistema de defensa antioxidante celular. El Mn es un constituyente y activador de varias enzimas; mejora la función neurológica y también es un oligoelemento que posee efecto antioxidante (Pombo y col., 2001). La determinación de metales mayoritarios y oligoelementos contribuye al conocimiento de estos frutos en vista a su valorización para la dieta, o su uso como suplementos dietarios.

Los ácidos grasos

Las grasas y los aceites son mezclas de triésteres de glicerol de origen natural. Los ácidos grasos (AG) son ácidos carboxílicos obtenidos por hidrólisis de grasas y aceites. La mayoría de los AG en la naturaleza poseen un número par de átomos de carbono (entre 12 y 20) y una cadena de carbonos no ramificada. Cuando presentan enlaces dobles, casi siempre son *cis*. Pocos AG con enlaces dobles *trans* (ácidos grasos *trans*) se encuentran de forma natural, pero la fuente principal de estas grasas es la hidrogenación parcial de aceites vegetales, como en la preparación de la margarina. A diferencia de los aceites vegetales poliinsaturados, que tienden a reducir las concentraciones de colesterol en el suero, las grasas *trans* producidas por hidrogenación parcial tienen efectos de aumento de colesterol semejantes a los de las grasas saturadas. Se pueden agrupar a los AG en tres amplios grupos: los ácidos grasos saturados (SFA), los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Esta clasificación se basa en la química, pero está claro que los distintos ácidos grasos incluidos en dichos grupos poseen propiedades biológicas diferentes (FAO, 2008).

El análisis de ácidos grasos procedentes de muestras biológicas o alimentos implica generalmente la consecución de tres pasos: extracción de lípidos, conversión de los lípidos extraídos a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y análisis de los FAME mediante cromatografía gaseosa (CG) para la determinación del perfil de los ácidos grasos. A partir del estudio del perfil de los AG se obtienen algunos parámetros que permiten caracterizar un aceite, como son el índice de yodo (IY) y la relación O/L. En el caso del IY es un indicador del grado de insaturación del aceite (a mayor grado de insaturación, mayor IY), aunque no brinda información sobre la composición de AG. A veces suele aplicarse una clasificación de los aceites en base al IY, la que los califica como: IY < 100: Aceites no secantes; IY entre 100 y 150: Aceites semisecantes; IY > 150: Aceites secantes.

Algunos de los SFA más comunes de la dieta, provenientes principalmente de grasas animales y lácteas, son: ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido araquídico (C20:0), ácido behénico (C22:0). Algunos MUFA *cis* presentes en grasas y aceites son: el ácido oleico (OA), que es el MUFA más común y está presente en cantidades considerables en fuentes tanto de origen animal como vegetal; como así también el ácido palmitoleico. Los PUFA naturales, con dobles enlaces separados por un metileno y de configuración *cis* pueden dividirse en 12 familias diferentes: pueden comprender entre dobles enlaces situados en la posición n-1 hasta la n-12 (Gunstone, 1999). Las familias más importantes, por lo que se refiere al grado de frecuencia, la salud y la nutrición humanas, son la n-6 y la n-3. El ácido linoleico (LA) es el ácido graso esencial primario o generador de la familia n-6. El ácido α -linolénico (ALA) es el ácido graso esencial primario o generador de la familia n-3, el que además es uno de los más importantes a nivel nutricional. El LA y el ALA se encuentran en todas las grasas de la dieta y presentan mayores proporciones en la mayoría de los aceites vegetales (White, 2008). Algunos PUFA n-6 importantes a nivel nutricional son: ácido linoleico (LA) y ácido araquidónico (AA), entre otros (FAO, 2008).

Flora de San Juan: frutos autóctonos con potencial fitoquímico que le confieren propiedades funcionales o antioxidantes

En la Provincia de San Juan, Argentina, la flora comprende alrededor de 1400 especies que crecen bajo condiciones edáficas y climáticas particulares, como son una gran amplitud térmica, una elevada radiación, especialmente de rayos UV, y zonas de gran altura. La tradición recoge un elevado número de especies, que por sus propiedades medicinales fueron y siguen siendo empleadas para tratar diferentes afecciones es por esto que existe una necesidad de constatación de la utilidad real de las mismas. En este trabajo de tesis, se focaliza el estudio de los frutos de especies autóctonas de la Provincia de San Juan, para que a partir del conocimiento de las

propiedades que éstos presenten, fomentar su uso sustentable y así lograr un aprovechamiento de los recursos naturales.

De este modo, la evaluación sistemática de los efectos y la posibilidad de conocer las estructuras de sus componentes activos en frutos de especies autóctonas, es de importancia relevante ya que éstos pueden constituirse en nuevos modelos de sustancias bioactivas y/o servir de base para la realización de modificaciones estructurales para la mejora de su índice terapéutico. Un relevamiento exhaustivo de estas especies, *in situ*, permitió observar una elevada producción de frutos, los que no son aprovechados, a excepción de *Ramorinoa girolae* Speg., cuyos frutos son consumidos tostados como alimento y como sustitutos de café.

Fitoquímicos presentes en los frutos de estas especies

Los frutos de *Zuccagnia punctata* Cav. y *Maytenus viscifolia* Griseb. no son comestibles, por lo que tampoco son aprovechados, a pesar de que presentan una elevada producción. En cambio, en estudios etnobotánicos y en la documentación etnohistórica (Spegazzini, 1924), se indica que el consumo de semillas de *R. girolae* tuvo un rol importante en la alimentación de los Amerindios durante los períodos pre-inca y prehispánicos. Los habitantes de pequeñas poblaciones rurales cercanas a los "chicales" (zonas en las que crece la especie), las consumen aún hasta nuestros días. Con las semillas de estos frutos se preparan tostadas y se consumen de manera similar al maní y también como sustitutos de café. Ésta es la única información disponible, ya que en la literatura no existen reportes de las propiedades, ni de la composición de las semillas de la especie *R. girolae*.

Maytenus viscifolia es una especie con amplia distribución geográfica que comprende las provincias de Catamarca, Córdoba, Jujuy, La Rioja, Salta, Santiago del Estero, San Juan y Tucumán. Los frutos presentan color rojizo y no existen reportes de que sean

aprovechados. En este estudio se realizó la evaluación de los mismos para un potencial uso y aprovechamiento de acuerdo a sus propiedades.

La especie *Zuccagnia punctata* presenta una amplia distribución geográfica principalmente en el noroeste argentino, y crece en zonas de llanuras y montañas desde los 700 a los 2700 m.s.n.m. Existen diversos y numerosos trabajos (Pederiva y col., 1975; Pederiva y Giordano, 1984; Svetaz y col., 2004; Zampini y col., 2005; Agüero y col., 2010; Morán Vieyra y col., 2009; Quiroga y coll.,2001; etc.), que demuestran las diferentes propiedades que presentan tanto los extractos de la planta, como así también sus compuestos puros. Pero no hay datos de las propiedades y/o composición de estos frutos. Además, la planta presenta una producción considerable de frutos, ya que florece desde el mes de Agosto hasta Marzo, y fructifica desde Noviembre hasta Abril (Ulibarri, 2005). Por esto, es que en este trabajo de tesis se evaluaron las propiedades y composición que presentan los frutos de *Z. punctata* con el fin de otorgarle un valor agregado para su potencial uso como por ejemplo, en suplementos dietarios o en la industria cosmética.

Sobre la base de lo expresado se propone, mediante un estudio sistemático, determinar la composición química y actividad antioxidante, con especial énfasis en los polifenoles, de los frutos de cinco especies autóctonas que crecen en la provincia de San Juan. Estos frutos podrían utilizarse como fuente alternativa de polifenoles con efecto antioxidante de origen natural y posible aplicación como sustitutos de preservantes sintéticos en alimentos, en cosmética o en productos farmacéuticos.

Objetivo General:

Evaluar la actividad antioxidante y el aporte de oligoelementos en frutos autóctonos de la Provincia de San Juan, en vista a su valorización nutricional o a su uso como parte de suplementos dietarios.

Objetivos Específicos:

- ✚ Recolectar los frutos de las especies seleccionadas de la flora autóctona de la Provincia de San Juan a distintas alturas para evaluar la incidencia de la radiación UV B sobre la producción de compuestos fenólicos.
- ✚ Preparar extractos seriados (éter de petróleo, diclorometano y metanol) y metanólicos ácidos a partir de esos frutos.
- ✚ Evaluar la actividad antioxidante de los extractos mediante un panel de ensayos estandarizados para tal fin.
- ✚ Aislar, purificar y cuantificar los metabolitos presentes en los extractos activos, particularmente compuestos fenólicos, flavonoides y antocianos, caracterizando los metabolitos bioactivos mediante estudios espectroscópicos.
- ✚ Evaluar tipo y cantidad de elementos inorgánicos (mayoritarios, minoritarios y oligoelementos) presentes en las muestras, estableciendo el aporte nutricional de los frutos.
- ✚ Contribuir a validar o a desalentar el uso de los frutos de las especies seleccionadas en función de la capacidad antioxidante que se evidencie, estableciendo las bases para futuras explotaciones sustentables de los recursos naturales tendiendo a la conservación de la biodiversidad de la provincia de San Juan.

Capítulo II

Materiales y Métodos



Material vegetal

Frutos de *Maytenus viscifolia* Griseb. (Celastraceae)

Los frutos de *M. viscifolia* se recolectaron en durante el período de floración, en el mes de Diciembre de 2008, en el Departamento de Caucete de la provincia de San Juan.

Frutos de *Ramorinoa girolae* Speg (Fabaceae)

Los frutos de *R. girolae* se recolectaron (tres muestras elegidas al azar) en los llamados "chicales" (lugares donde crece esta especie) de Caucete, provincia de San Juan, Argentina, en marzo de 2008, éstos fueron identificados por la Dra. Gloria Barboza, IMBIV CONICET (Universidad Nacional de Córdoba). Un ejemplar de herbario fue depositado en el Museo Botánico de Córdoba (CORD 9833).

Frutos de *Zuccagnia punctata* Cav. (Fabaceae)

Los frutos de *Z. punctata* se recolectaron de tres zonas en la provincia de San Juan, diferenciadas por la altura. Para el estudio, se colectaron tres muestras independientes: en Ullum (700 m.s.n.m.), en Hualilán, que es una localidad del departamento Ullum (1800 m.s.n.m.) y en la localidad de Bauchaceta, departamento Iglesia (2600 m.s.n.m.), en el mes de enero de 2009. Todas las muestras se almacenaron a -20°C hasta su procesado.

Preparación de extractos

De las tres muestras independientes de los frutos de *Maytenus viscifolia* Griseb. (5 g de frutos c/u), se obtuvieron extractos seriados con éter de petróleo (EEP), diclorometano (EDCM) y metanol ácido (EMeOH-H⁺), se utilizaron aproximadamente 250 mL de cada solvente en cada extracción.

Para extraer las antocianinas (que le dan el color pardo rojizo a los frutos de esta especie) se utilizó MeOH al 0,1 % con HCl, y se obtuvo el extracto metanol ácido (EMeOH-H⁺).

Todos los extractos se obtuvieron mediante extracción en Soxhlet (3 veces con cada solvente). Luego se concentraron en un evaporador rotatorio a presión reducida hasta peso constante. Los rendimientos se expresaron como porcentaje (media ± desviación estándar) en términos del peso inicial de frutos. Los frutos restantes se mantuvieron al abrigo de la luz a -20 °C para los posteriores análisis.

Los frutos de *Ramorinoa girolae* Speg.: Se presentan de forma ovalada, con una cubierta dura e indehiscente que contiene entre 3 y 7 semillas cada uno. Las semillas de los frutos fueron retirados mediante la ruptura mecánica de su cubierta. Se molieron 20-50 g de semillas, utilizando un mortero de porcelana hasta que las partículas fueron de un tamaño homogéneo. A partir de 5 g de este material molido proveniente de las semillas, se prepararon los extractos seriados utilizando solventes de polaridad creciente por triplicado (3 veces con 250 mL de cada solvente), en Soxhlet. Luego fueron evaporados en un rotavapor hasta peso constante. Se obtuvieron los extractos seriados éter de petróleo (EEP), diclorometano (EDCM) y metanol (EMeOH) El rendimiento de cada extracción (media ± desviación estándar) se calculó como porcentaje de material de partida. El resto de los frutos se mantuvieron al abrigo de la luz a -20 °C para los posteriores análisis de los mismos.

Los frutos de *Zuccagnia punctata* Cav.: A partir de 10 g de los frutos de cada muestra se obtuvieron los extractos seriados de EP y DCM en equipo de Soxhlet, utilizando 250 mL de cada solvente por extracción (3 x 250 mL). Luego de agotados los frutos se extrajeron con MeOH-H⁺ (MeOH al 0,1 % con HCl), al abrigo de la luz mediante sonicación y agitación durante 12 h. En todos los casos se hicieron tres extracciones con 50 mL de

cada solvente. Posteriormente se evaporaron a presión reducida, hasta peso constante. El rendimiento porcentual se expresó respecto al peso seco del material de partida.

La caracterización y cuantificación se llevó a cabo con los extractos metanólicos globales ácidos (EGMeOH-H⁺) de los frutos, los que se obtuvieron por sonicación durante 30 minutos a 25 °C, con MeOH acidificado al 0,1 % con HCl. Esta metodología se usó a partir de 100 mg de frutos/mL de MeOH-H⁺. El sobrenadante se filtró y se inyectó en el sistema de LC-ESI-QTOF-MS para el análisis de polifenoles (Seeram y col., 2006).

Determinación del contenido de fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales (FT) de los extractos se determinó mediante el método de Folin Ciocalteu de acuerdo a Heldrich (1990) y Scalbert y col. (1988-1989), con algunas modificaciones, como estándar para realizar la curva de calibración se usó ácido gálico a concentraciones de 0, 25, 50, 100, 125, 250 ppm. La reacción se realizó sobre los extractos de los frutos preparados a una concentración de 1 mg/mL con el reactivo Folin-Ciocalteu, y se neutralizó con carbonato de sodio. Luego de 30 min, se midió la absorbancia a 765 nm. El contenido de FT se determinó utilizando la curva de calibración del ácido gálico y se calcularon, los mg de equivalentes de AG por 100 g de extracto. Según el rendimiento de los extractos se expresó en contenido de compuestos FT en mg EAG/100 g semillas. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, los resultados se muestran como la media ± desviación estándar.

Fundamento

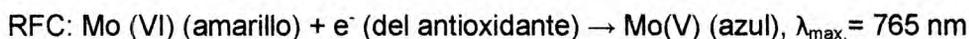
Este método, junto a otros como TEAC (Trolox Equivalence Antioxidant Capacity) y FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) por ejemplo, implican dos componentes en la mezcla de reacción, los antioxidantes y los oxidantes. Estos ensayos se basan en la

siguiente reacción de transferencia de electrones, la que se expresa en forma general por Huang y col., 2005), como sigue:



Tomado de: Review "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", D. Huang, B. Ou, y R. Prior, 2005, pág.1848.

En la solución, la reacción se produce entre el oxidante que es el que abstrae un electrón desde el antioxidante (en este caso proveniente de los extractos de los frutos estudiados), causando cambios de color en la solución original. El grado del cambio de color es proporcional a la concentración de los antioxidantes en la muestra. El cambio de absorbancia se representa frente a la concentración de un antioxidante conocido para dar una curva lineal, en este caso se utilizó ácido gálico. La pendiente de la curva refleja la capacidad reductora del antioxidante, que se expresa como la equivalencia del compuesto de referencia utilizado, y se expresa en función de éste, como equivalente de ácido gálico (EAG). El reactivo de Folin Ciocalteu (RFC) no es específico de los compuestos fenólicos, ya que se puede reducir por muchos compuestos no fenólicos (por ejemplo, vitamina C, Cu (I), etc); y los compuestos fenólicos reaccionan con el RFC sólo bajo condiciones básicas (por lo que se ajusta a pH= 10 mediante una solución de carbonato de sodio). La disociación de un protón fenólico conduce a un anión fenolato, que es capaz de reducir el RFC. Esto es lo que apoya la noción de que la reacción se produce a través del mecanismo transferencia de electrones, de acuerdo con la siguiente ecuación:



El RFC es un heteropoliácido molibdofosfowolfrámico, el que tiene como sitio activo hipotético al Mo (VI) (Apak y col., 2007).

A pesar de la naturaleza de la reacción química del RFC aún no se conoce por completo, pero, el ensayo de fenólicos totales mediante este reactivo es conveniente,

simple y reproducible. Entonces, el método de Folin-Ciocalteu es un ensayo basado en la transferencia de electrones (TE) y brinda información de la capacidad de reducción, aunque normalmente se expresa como contenido de fenólicos. El mecanismo básico de este ensayo es una reacción de oxidación/reducción, por lo que puede ser considerado como un método para el análisis de la actividad antioxidante (Prior y col, 2005). Aún cuando el nombre del ensayo es "Ensayo de fenólicos totales", sobre la base de lo expresado por Huang y col. (2005) donde la capacidad de reducción de una muestra es un parámetro importante que refleja un aspecto de su capacidad antioxidante, este ensayo indica capacidad de reducción/antioxidante, por lo que en este trabajo se presentan los resultados del ensayo de Folin-Ciocalteu, no sólo como cuantificación de los compuestos fenólicos totales presentes en los extractos obtenidos a partir de los frutos, sino además como una medida de la capacidad antioxidante de los mismos.

Determinación del contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides (F) en los extractos seriados de los frutos de las especies se determinó por el método colorimétrico del $AlCl_3$ de acuerdo con la metodología de Chang y col. (2002), con algunas modificaciones. Como estándar para la curva de calibración se utilizó quercetina (Q). La absorbancia de la reacción se midió a 415 nm.

Fundamento

El principio de este método es que el $AlCl_3$ forma un complejo ácido estable con el C4 del grupo ceto y su C3 o C5 del grupo hidroxilo de las flavonas y flavonoles. Además, el tricloruro de aluminio forma complejos ácidos lábiles con los grupos ortohidroxilos en los anillos A o B de los flavonoides (Chang y col., 2002). El contenido de flavonoides se calculó a partir de la curva de calibración como equivalentes de quercetina (EQ) por 100 g de extracto de frutos, y calculado a partir del rendimiento de los extractos se expresan los resultados en mg EQ/100 g de semillas. Los datos por triplicado se

informan como media \pm desviación estándar (DE). En general la reacción que se lleva a cabo es como sigue:

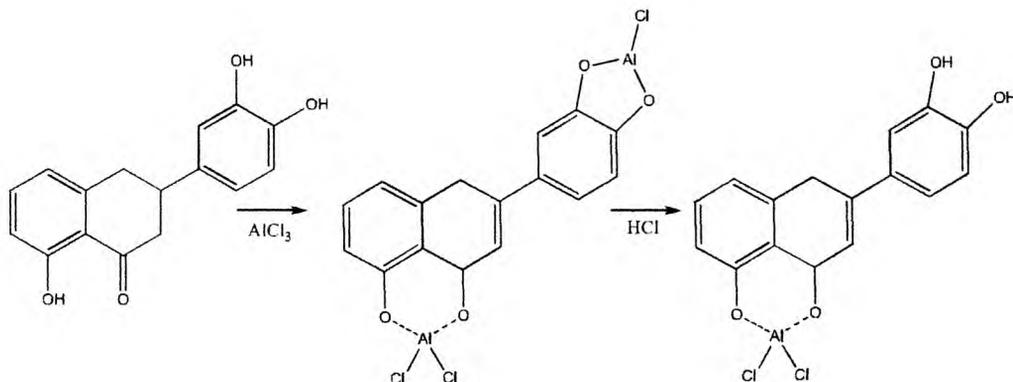


Figura II-1: Reacción general de la formación del complejo de un flavonoide con el AlCl_3 .

Determinación del contenido de antocianinas totales

Para determinar el contenido de antocianinas totales, en los extractos metanólicos ácidos, se utilizó el método por espectrofotometría a pH diferencial. La cuantificación se realizó mediante el método diferencial entre pH 1,0 y pH 4,5.

Fundamento

Las antocianinas sufren transformaciones estructurales reversibles con un cambio de pH, lo que se manifiesta con diferentes espectros a diferentes absorbancias (510 y 700 nm). La forma oxonio de color predomina a pH 1,0 y la forma hemicetal incolora a pH 4,5. El método pH - diferencial se basa en esta reacción, y permite la medición precisa y rápida de las antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos degradados polimerizados y otros compuestos de interferencia es proporcional al contenido de antocianinas, de acuerdo con Meyers y col. (2003).

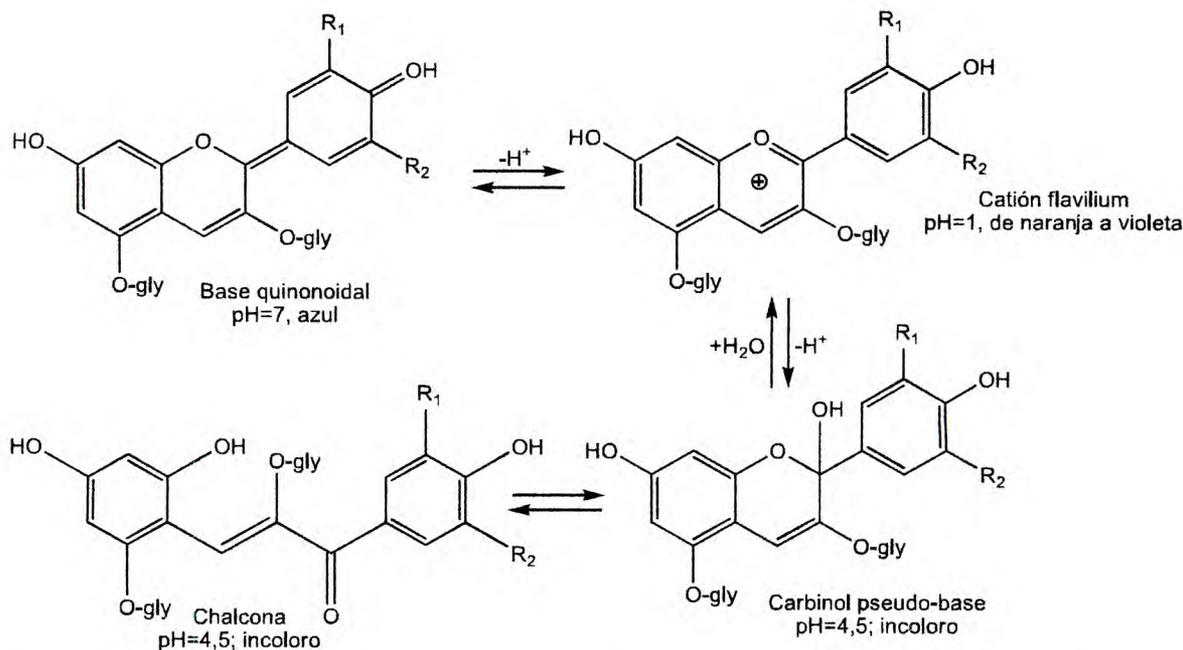


Figura II-2: Formas estructurales predominantes de antocianinas presentes a diferentes pH (Giusti y Wrolstad, 2001).

La absorbancia de cada muestra se calculó como sigue:

$$A = \left[(A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5} \right]$$

Luego esas absorbancias fueron convertidos a mg de antocianinas totales (AT), expresado como mg de cianidina 3-glucósido/100 g de EMeOH-H⁺ (mg cian-3-glu/100g EMeOH-H⁺), utilizando el coeficiente de extinción molar de 26900.

$$\%AT(\text{mg cian-3-glu} / 100\text{g EMeOH-H}^+) = \frac{\text{Abs}}{26900 \cdot l} \cdot \text{PM}_{\text{antoc}} \cdot \text{FD} \cdot \frac{V_{\text{inic.}}}{\text{Peso mtra}(\text{mg})} \cdot 100$$

Abs: absorbancia de cada una de las muestras a los diferentes pH

PM: 449,2; corresponde a la Masa Molar de la cianidina-3-glucósido

FD: factor de dilución

V_{inic.}: volumen inicial de cada muestra

Peso mtra.: Cantidad de muestra pesada para preparar las soluciones a ambos pH (mg)

Análisis de ácidos grasos

Para determinar la composición ácidos grasos, se sometió una porción del EEP de cada muestra de semillas (0,5 g) a saponificación alcalina por reflujo (45 min) usando 30 mL de KOH 1N en metanol. La parte insaponificable se extrajo con *n*-hexano (3 veces x 30 mL). Los metiléster de los ácidos grasos (MEAG) de los lípidos totales se obtuvieron usando 50 mL de H₂SO₄ 1 N en metanol, en reflujo y luego se analizaron por cromatografía gaseosa (CG) de acuerdo con Maestri y Guzmán (1993). Este análisis se llevó a cabo en un equipo de CG (Perkin-Elmer Clarus 500, New Haven, CT, EE.UU.) utilizando una columna capilar de sílice fundida (30 m x 0,25 mm de diámetro x 0,25 µm de espesor de film) CP Wax 52 CB (Varian, Walnut Creek, CA, EE.UU.); con N₂ como gas portador a 1 mL/min; y la temperatura de la columna programada de 180 °C (5 min) a 240 °C a razón de 4 °C/min; en inyector y el detector de temperatura a 250 °C. La identificación de los MEAG se llevó a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención con los de los compuestos de referencia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).

Además se determinó el índice de yodo (IY) sobre la base de los valores porcentuales de los ácidos grasos insaturados de acuerdo a Maestri y col. (1998) utilizando la siguiente ecuación:

$$IY = (\% \text{ Palmitoleico} \times 1,001) + (\% \text{ Oleico} \times 0,899) + (\% \text{ Linoleico} \times 1,814) + (\% \text{ Linolénico} \times 2,737)$$

Análisis de minerales

El contenido mineral total para los 29 elementos se analizó de acuerdo a Di Paola-Naranjo y col. (2011). Una fracción de las muestras de los frutos de las especies estudiadas (0,5 g aproximadamente) se pulverizaron en mortero de cerámica hasta tener un tamaño uniforme de partículas. Las muestras, en polvo (0,2 g), se introdujeron en recipientes de cuarzo, y se les agregaron 8 mL de ácido nítrico

concentrado, se sellaron mediante tapones de politetrafluoroetileno (PTFE, conocido comúnmente como Teflón) para dejarlos eliminar los vapores por 2 – 3 h, luego se mineralizaron en horno de microondas (Anton Paar 3000) con un calentamiento de acuerdo a una secuencia de encendido; a partir de una diferencia de 15 minutos hasta llegar a 600 W, durante 45 minutos (Temperatura máxima = 169 °C, máxima presión = 75 bar). Las muestras mineralizadas se transfirieron cuantitativamente a matraces de 25 mL, completando el volumen con agua ultrapura, luego se filtraron utilizando filtros de 0,45 µm. También se prepararon muestras enriquecidas, mediante la adición de cantidades variables de soluciones estándar individuales (1000 mg/L en ácido nítrico al 1%), duplicando la concentración de partida para cada elemento. El resto del procedimiento fue el mismo utilizado para las muestras no enriquecidas. Todas las recuperaciones fueron entre 84 y 116%. Se analizó un material de referencia certificado (CRM: NIST 2548, dieta típica), utilizando el mismo procedimiento para el control de calidad. La recuperación de metales medidos en este trabajo de CRM fue entre el 80 y el 110% de los valores certificados.

Para el análisis se utilizó un equipo de Q-ICPMS, Agilent Tecnología 7500cx, equipado a su vez con inyector automático ASX-500 (Tecnología CETAC, Omaha, NE). El sistema de introducción de la muestra consistió en microflujo concéntrico con nebulizador, mediante cámara de nebulización Peltier, con antorcha de inyector con 1,5 mm de d.i.

El contenido de minerales de los frutos son expresados en µg/g como la media ± desviación estándar (n = 3), de la misma manera se expresan los datos de los límites de detección (LOD) y los de cuantificación (LOQ).

Identificación y Cuantificación de compuestos, mediante HPLC-MS

El perfil y la identificación de los compuestos fenólicos en los extractos de los frutos estudiados, se realizó mediante técnicas de HPLC ESI-MS/MS, utilizando un sistema

de HPLC (Varian Prostar Dinamax 24), equipada con una bomba de gradiente binario, desgasificador de disolvente (Metachem Technologies, EE.UU.) y el muestreador automático (Varian, Prostar 410). La separación cromatográfica se realizó en una columna Luna (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.), C18 (5 μm , 250 mm, 4,60 mm d.i.). La fase móvil que se utilizó estuvo formada por 0,5 mL de ácido fórmico/100 mL agua (disolvente A) y metanol (disolvente B), comenzando con 20% de B y el cambio a 50% de B a lo largo de 3 min, el que se mantiene 5 min, seguido de una segunda rampa a 80% de B a lo largo de 5 min, mantenido 17 min, tercera rampa a 20% de B en 1 min, manteniéndose en esta última condición durante 10 min antes de la siguiente ejecución. La velocidad de flujo se fijó en 0,4 mL/min, inyectando 10 μL . Este sistema de HPLC se acopló a un Varian 1200 espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI), que operó en modo negativo; con tensión capilar de -40 V; utilizando un voltaje de la aguja de -3.800 V; con un escudo de tensión de 175 V, la temperatura de secado de gas (nitrógeno) de 350 °C. Se utilizaron gases de nebulización y de colisión, aire (grado 5.0, Pureza \geq 99,999%) y argón (grado 5.0, Pureza \geq 99,999%), respectivamente. Se utilizó como software para la adquisición y procesamiento de datos, MS Varian (versión 6.6).

Para el análisis cuantitativo de los polifenoles, se hizo funcionar el EM en el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MMR). Se utilizaron los siguientes iones producidos: $m/z = 125$ para el ácido gálico, $m/z = 245$ para (+)-catequina y (-)-epicatequina, $m/z = 135$ para el ácido cafeico, $m/z = 134$ para el ácido ferúlico, $m/z = 119$ para el ácido p-cumárico, $m/z = 185$ para el trans-resveratrol, $m/z = 178$ para miricetina, $m/z = 179$ para la quercetina y $m/z = 285$ para el kaempferol. La cuantificación de los polifenoles se realizó por regresión lineal, utilizando las áreas de los picos de los iones producidos durante la fragmentación. Se realizaron varias pruebas de validación para evaluar la exactitud, la precisión, la linealidad, el rango analítico, el LOD y el LOQ (ICH, 2005). El rango analítico lineal fue entre 0,015 y 7,00

mg/mL ($r^2 > 0,98$). El coeficiente de variación (CV) fue inferior al 10%. El límite de detección varió desde 0,003 hasta 0,050 mg/L, mientras que el LOQ varió desde 0,009 hasta 0,185 mg/L. La precisión y los efectos de matriz se verificaron mediante muestras enriquecidas de la siguiente manera: tres muestras se enriquecieron al doble de la concentración de partida de polifenoles, se prepararon y se analizaron de la misma manera, y la obtención de porcentajes de recuperación que van desde 88 hasta 110%. Las muestras se analizaron después de llegar a la dilución apropiada con metanol, cuando fue necesario se filtró (filtro de 0,45 μm) y luego se inyectó en el sistema HPLCESI-MS/MS. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Ensayos de actividad antioxidante

1- Ensayos “in vitro”

1.1. Actividad atrapadora del radical DPPH

El radical 2, 2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) es utilizado ampliamente para evaluar rápidamente la capacidad de los polifenoles, ya que reacciona con agentes reductores capaces de transferir átomos de H lábiles a los radicales. Esta capacidad de reducción del radical inducida por los antioxidantes, se determina por la disminución de su absorbancia a 517 nm (Jamuna y col., 2010). Los resultados generalmente se informan en términos de porcentaje de captura del radical y cuanto mayor es éste, más alto es el poder antioxidante (Brand-Williams y col., 1995).

Este ensayo se fundamenta en que el radical DPPH (Aldrich), de color violeta intenso, al ser capturado pierde su color característico. Es posible cuantificar la capacidad de captura de radicales libres que poseen distintos extractos y/o compuestos, mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una solución metanólica del radical. Para lo que se preparó una solución metanólica fresca del radical DPPH, a una

concentración de 20 mg/L. También se prepararon soluciones metanólicas de los extractos y/o compuestos a ensayar a concentraciones de 100, 50, 10 y 5 µg/mL. Las soluciones de DPPH y diluciones metanólicas de los extractos y/o compuestos se mezclaron y midieron a 517 nm cinco minutos después de la mezcla. Los datos de absorbancia para los extractos y/o compuestos ensayados fueron reemplazados en la fórmula:

$$\% \text{ Decoloración de DPPH} = \left[1 - \left(\frac{\text{Absorbancia Muestra} - \text{Absorbancia Blanco Muestra}}{\text{Absorbancia DPPH}} \right) \right] \times 100$$

Absorbancia Muestra: absorbancia de la muestra al reaccionar con la solución del radical DPPH

Absorbancia Blanco Muestra: absorbancia del Blanco de cada muestra

Absorbancia DPPH: absorbancia de la solución de DPPH

A partir del porcentaje de decoloración se determinó la capacidad de captura de radicales libres. Un valor igual a 100 (cien) corresponde a la máxima capacidad de captura de radicales libres, mientras que un valor cercano a 0 (cero) indica que dicha capacidad es reducida o nula. El grado de decoloración se relaciona con el potencial de la solución ensayada, de atrapar radicales libres en procesos de estrés oxidativo.

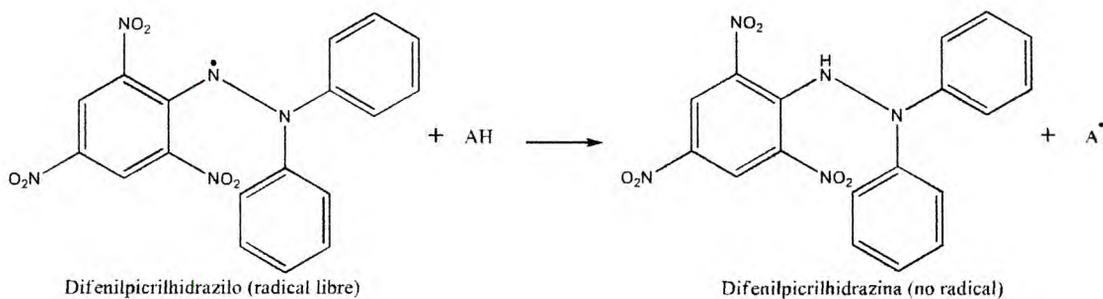


Figura II-3: Reacción del ensayo de decoloración del radical DPPH. Tomado de: Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, Md. Nur Alam, Nusrat Jahan Bristi, Md. Rafiquzzaman. Saudi Pharmaceutical Journal (2013) 21, 143–152.

1.2. Ensayo TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox)

El ensayo de la capacidad antioxidante equivalente Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxílico), TEAC, es un método utilizado para la evaluación de la capacidad de un extracto o compuesto para capturar el radical libre coloreado $ABTS^{\bullet+}$ (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)). En las condiciones en que se realiza el ensayo, la reacción se lleva a cabo entre la mayoría de los antioxidantes y el radical $ABTS^{\bullet+}$, convirtiéndose en un producto decolorado (Arts y col. 2004).

Fundamento

El método TEAC mide la capacidad de un compuesto para captar el radical coloreado $ABTS^{\bullet+}$. Este radical posee una coloración verde-azulada y químicamente es muy estable, soluble en medio acuoso y etanólico. Este método originalmente fue diseñado por Rice-Evans y Miller (1994), basándose en la reducción del radical ferrilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia del precursor ABTS, para producir el radical catión ($ABTS^{\bullet+}$), en presencia o ausencia de antioxidantes. Esto fue criticado teniendo en cuenta que algunos antioxidantes que reaccionan más rápido también podrían contribuir a la reducción del radical ferrilo de mioglobina. Por esto, es que se utiliza una técnica mejorada para la generación del $ABTS^{\bullet+}$, que implica la producción directa del cromóforo azul verdoso a través de la reacción entre el ABTS y el peroxodisulfato de potasio ($K_2S_2O_8$). Una vez preformado el catión radical, se agregan los antioxidantes que lo reducen convirtiéndolo en un producto decolorado. Los resultados se expresan con relación a la actividad antioxidante de un compuesto de referencia como el Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E con capacidad antioxidante conocida, bajo las mismas condiciones. Una ventaja de este método, consiste en que la generación

del radical se produce antes de la adición de la muestra, lo que evita que los componentes de la misma puedan reaccionar con los reactivos. Por otro lado, este método es aplicable al estudio de antioxidantes tanto hidrosolubles como liposolubles, de compuestos puros y de extractos de alimentos. La reacción que se produce en este ensayo se muestra a continuación:

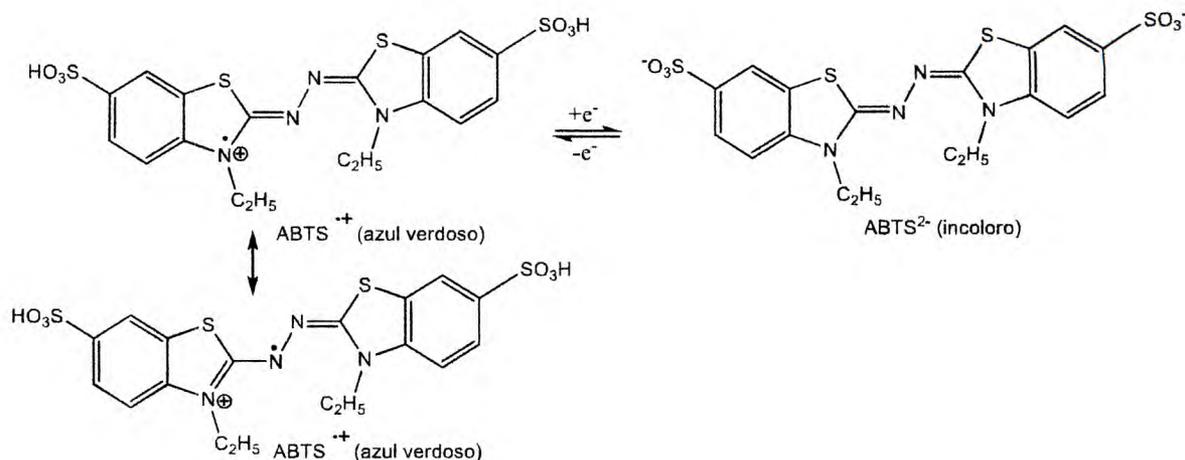


Figura II-4: Reacción del ensayo TEAC. Tomado de Branchi y col., 2005.

El reactivo de trabajo se preparó diariamente utilizando una solución de ABTS 7 mM en agua milliQ, a la que se le agregó peroxodisulfato de potasio a una concentración final de 2,45 mM, para generar el catión radical $ABTS^{\bullet+}$. A esta solución se la protegió de la luz y se la dejó estabilizar durante 12-16 horas, a temperatura ambiente, antes de ser utilizada. Para la medida de la actividad antioxidante se tomaron 200 μ L del reactivo de trabajo (radical $ABTS^{\bullet+}$) en una microplaca y se midió su absorbancia a 734 nm (A_0). Posteriormente se añadieron 5 μ L de la muestra problema, con previa agitación en el equipo, se midió la absorbancia a los 6 minutos exactos (A_1) a 734 nm. Luego se calculó el ΔAbs ($A_0 - A_1$) para cada determinación. Se analizaron las muestras de los extractos de los frutos a distintas concentraciones (10, 50, 100, 500 y 1000 μ g/mL), con el objetivo de ver la respuesta del método frente a la concentración. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Junto a la medición de la actividad antioxidante de las muestras se realizó el análisis de la capacidad antioxidante del Trolox, utilizado como compuesto de referencia. Para expresar los resultados se define el valor TEAC como la concentración de Trolox (mM) que tiene la misma actividad antioxidante que una concentración 1 mM de la sustancia en estudio (Van den Berg y col., 1999). Entonces, se construyó una curva de calibración con diferentes concentraciones de Trolox (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 y 1 mM) frente a las correspondientes variaciones de absorbancia del radical (ΔAbs). Se utilizó una solución madre de Trolox disuelta en PBS pH 7,4, de concentración 1 mM, que se conservó fraccionada y congelada a -20° C hasta el momento de su utilización. Todas las concentraciones de Trolox se analizaron por triplicado. Esta curva se realizó cada vez que se preparó reactivo de trabajo.

Los resultados obtenidos, en este ensayo, y de acuerdo con el rendimiento de cada uno de los extractos de los distintos frutos estudiados, se expresaron como mg de equivalente de Trolox por cada 100 g de fruto (mg ET/100 g fruto).

1.3. Poder antioxidante del ión férrico reducido (FRAP)

El ensayo FRAP también se basa en reacciones de transferencia de electrones, en la que una sal férrica, Fe (III) (2,4,6-tripiridil-s-triazina)₂Cl₃, se utiliza como oxidante. El potencial redox de esta sal de Fe (III) (~ 0,70 V) es comparable a la de ABTS•⁻ (0,68 V). Por lo tanto, esencialmente, no hay mucha diferencia entre estos dos ensayos, excepto que el ensayo TEAC se lleva a cabo a pH neutro y el ensayo FRAP en condiciones ácidas (pH = 3,6).

Fundamento

El ensayo FRAP se basa determinar la habilidad de un extracto o compuestos fenólicos para reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺. El poder reductor de los extractos de frutos en

estudio se determinó de acuerdo al método descrito previamente por Oyaizu, 1986. Se mezclaron 200 μL de los extractos de frutos, a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) así como ácido gálico, utilizado como estándar (a 10, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/mL}$), se añadió a 500 μL de buffer fosfato (0,1 M pH= 6,6) y 500 μL de ferricianuro de potasio $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1%, p/v). Posteriormente, la mezcla se incubó a 50 $^\circ\text{C}$ durante 20 minutos, pasado ese tiempo, a la mezcla se le agregaron 500 μL de ácido tricloroacético (TCA al 10%, p/v), y se agita. Una alícuota de 1 mL de esta solución se mezcló con 1 mL de agua destilada y 200 μL de FeCl_3 (0,1%, p/v). Después de 30 min de incubación, se leyó la absorbancia a 700 nm. La reacción que se produce es la que se muestra a continuación:

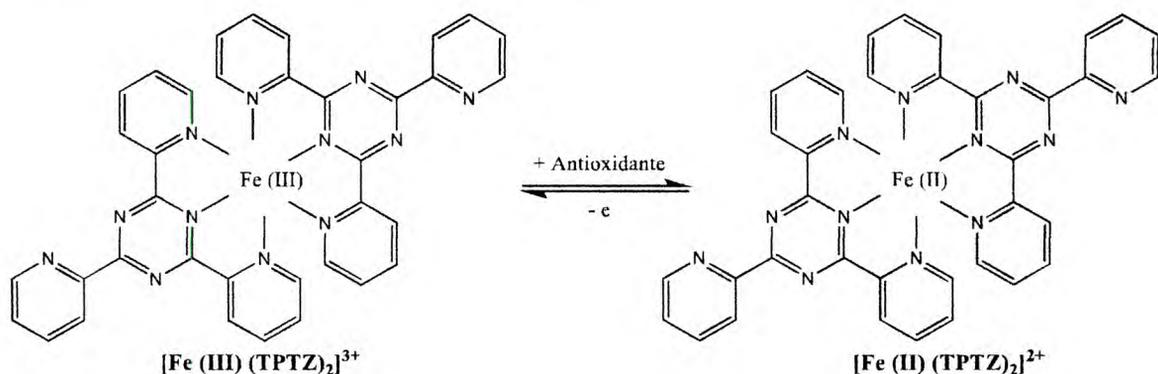


Figura II-5: Reacción del ensayo FRAP. Tomado del Review "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", D. Huang, B. Ou, y R. Prior, 2005, pág.1849.

El análisis las muestras se realizó por triplicado, se informa la media \pm la desviación estándar. Los resultados se expresaron, en función del estándar utilizado y del rendimiento de cada extracto, en mg de equivalentes de ácido gálico cada 100 g de fruto (mg EAG/100 g fruto).

1.4. Lipoperoxidación en membranas de eritrocitos humanos

Un mecanismo muy importante por el que los radicales libres de oxígeno son capaces de producir lesión celular, es mediante la peroxidación lipídica de su membrana. La lipoperoxidación (LPO) se produce debido a la acción de los radicales libres sobre los

ácidos grasos poliinsaturados. Estas modificaciones en la estructura de la membrana celular provocan cambios en sus propiedades fisicoquímicas, con un aumento de su permeabilidad y pérdida progresiva de sus funciones, que pueden llevar a la consiguiente muerte celular. El nivel global de peroxidación de un sistema lipídico puede ser determinado mediante la cuantificación del producto principal de oxidación de los fosfolípidos, el malondialdehído (MDA), que combinado con el ácido tiobarbitúrico (TBA) produce sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), las que se pueden medir a 530 nm (**Figura II-4**). La medida de estas sustancias producidas constituyen un buen método para determinar la capacidad de distintos antioxidantes para inhibir la peroxidación lipídica.

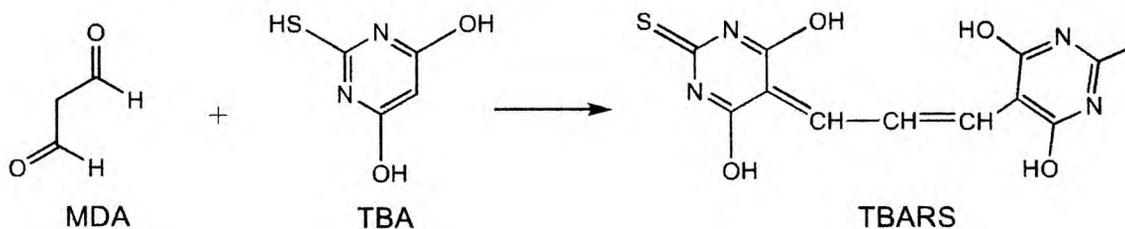


Figura II-6: Reacción de obtención de los TBARS ($\lambda = 530$ nm), a partir del MDA y el TBA

En este trabajo la evaluación de la peroxidación de los lípidos en los eritrocitos humanos se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito anteriormente por Tapia y col. (2004), con modificaciones menores.

Fundamento

Las células rojas de la sangre, obtenidas de individuos adultos sanos no fumadores después de consentimiento informado, se lavaron tres veces en frío con buffer fosfato salino (PBS) por centrifugación a 3500 rpm. Después de este lavado, las células se suspendieron en PBS y la regulación de la densidad de la hemoglobina se mantuvo a 1mM en cada tubo de reacción. Las células suspendidas se incubaron con diferentes concentraciones de los extractos a ensayar y se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y PBS durante 10 minutos a 37 °C. La concentración final de muestras y los

controles en DMSO fue del 1%. Después de la incubación, las células se expusieron con *tert*-butilo (1 mM) durante 15 min a 37 °C bajo agitación vigorosa. Luego, la peroxidación lipídica se determinó indirectamente por la formación de TBARS. Como compuesto de referencia se utilizó catequina (100 µg/mL). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación en comparación con los controles. Cada determinación se realizó por cuadruplicado.

2. Ensayos “in vivo” en levaduras

Este ensayo se llevó a cabo para completar la evaluación del efecto antioxidante por los métodos *in vitro*, de los frutos en estudio, utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como un modelo simple que permita correlacionar la actividad antioxidante en los sistemas vivos. Este ensayo se realizó de acuerdo con Baroni y col (2012), con algunas modificaciones. Se evaluó el efecto antioxidante utilizando los compuestos puros (catequina, epicatequina y quercetina) identificados en los frutos en este estudio.

Fundamento

Este ensayo mide la capacidad de atenuar el estrés oxidativo provocado por el prooxidante H₂O₂ en cepas control de *Saccharomyces cerevisiae*. La investigación sobre este ensayo ha proporcionado considerable información sobre el estrés oxidativo y los mecanismos empleados por las células en respuesta a un aumento de ROS (Amari y col, 2008). Los ensayos en los que se utilizan células vivas han demostrado ser útiles para las pruebas de rutina de diversos productos, y se logra producir resultados fiables en términos de la identificación de las actividades biológicas, incluyendo la capacidad antioxidante (Belinha y col, 2007; Wilmsen y col, 2005). Las células de *Saccharomyces cerevisiae* han sido ampliamente estudiadas, incluyendo la secuencia genética y diversas cuestiones bioquímicas. Por esto es que esta levadura se utiliza ampliamente en pruebas o ensayos para la detección de

propiedades biológicas. Por otra parte, se utiliza una célula eucariota como modelo, lo que permite el estudio de los mecanismos moleculares asociados con el envejecimiento celular y mecanismos de defensa después de la exposición al estrés oxidativo (Herrero y col., 2008).

Se utilizaron medios de cultivo nutritivos para el estudio de la sobrevida: YPD (Yeast Peptone Dextrose) e YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar), los que se detallan a continuación: Medio nutritivo líquido YPD: 1% extracto de levadura (Difco, US Biological, Cleveland, USA), 2% peptona (Difco, US Biological, Cleveland, USA) y 2% glucosa (Sigma, St. Louis, USA). Medio nutritivo sólido YPDA: YPD y 2% agar (Difco, US Biological, Cleveland, USA). Se trabajó con una cepa control de levadura *S. cerevisiae* ATCC36900 (American Type Culture Collection), la cual se conservó en medio nutritivo sólido YPDA en freezer a -80 °C hasta el momento de su utilización. Las levaduras fueron cultivadas en medio nutritivo líquido YPD, en shaker (Shaking Incubator, modelo SI 600, Lab Companion), bajo agitación a 28°C, hasta la fase exponencial de crecimiento, es decir cuando $N = 2 \times 10^7$ células/mL, mediante el cálculo en la Cámara de Neubauer.

Tratamientos:

Se partió de cultivos de levaduras en la fase exponencial, como se indicó anteriormente, y parte de las muestras celulares se expusieron en medio nutriente, según lo detallado, a las concentraciones de:

- a) Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): se utilizó H_2O_2 a una concentración final de 0,75 mM, sin estabilizantes.
- b) Muestras de compuestos: se analizaron los compuestos, catequina, epicatequina y quercetina; a diferentes concentraciones (10 y 50 $\mu\text{g/mL}$). Para esta exposición se colocó el cultivo de células con la dilución correspondiente 15 min antes que exponerlos con H_2O_2 . Es decir que la exposición de éstos fue

de células Wild Type (WT) + COMPUESTOS (10 o 50 $\mu\text{g/mL}$) + H_2O_2 . Los respectivos controles sin tratamiento se analizaron en paralelo.

Además de estos tratamientos detallados, se realizó un control de células (WT, levaduras sin tratamiento) y un control con H_2O_2 solamente (WT + H_2O_2). Luego de 1 h de tratamiento, bajo agitación a 28 °C, se tomó una alícuota del control de células (WT) para realizar un nuevo cálculo de N, para determinar el volumen necesario para sembrar en medio YPDA y luego contar el número de colonias.

2.1. Ensayo de sobrevivida

Luego de dilución apropiada, las muestras celulares se sembraron en medio nutriente sólido YPDA (50 μL /placa, aproximadamente) e incubadas por 72 horas a 28 °C. Posteriormente, se realizó el recuento de las colonias expresando los resultados como % de sobrevivida, siendo el 100 % de sobrevivida el número de colonias que se observó en la placa control (WT). Se realizaron 3 ensayos independientes, cada uno por duplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza de una sola variable. El coeficiente de correlación de Pearson (R) y p -valor se utilizaron para mostrar correlaciones y su significación (SPSS 16.0 para Windows, SPSS Inc., IL, EE.UU.). Los valores de probabilidad de $p < 0,05$ y $p < 0,01$ fueron considerados estadísticamente y extremadamente significativa, respectivamente.

También se utilizó Análisis Multivariado de Componentes Principales, el que permite analizar la interdependencia de variables métricas y encontrar una representación gráfica óptima de la variabilidad de los datos de una tabla de n observaciones y p columnas o variables. El análisis de componentes principales (ACP) trata de encontrar, con pérdida mínima de información, un nuevo conjunto de variables (componentes

principales) no correlacionadas que expliquen la estructura de variación en las filas de la tabla de datos.

Capítulo III

FRUTOS DE

***Ramorinoa girolae* Speg.**



INTRODUCCIÓN

Los frutos comestibles de plantas nativas de Argentina, como por ejemplo aquellos de los árboles de *Prosopis* spp, *Geoffroea decorticans*, *Ziziphus mistol* Griseb, *Ramorinoa girolae* o *Cactaceae* spp., se consumen ampliamente, en diferentes formas y en las diversas comunidades rurales argentinas como suplementos dietarios. Estos cumplen además un rol importante en los hábitos alimenticios de los pobladores de las zonas rurales.

Ramorinoa girolae Speg. (Fabaceae), comúnmente llamada "chica", es una especie endémica de Argentina perteneciente al género monotípico de Fabaceae, cuya distribución geográfica comprende las laderas montañosas del centro-oeste de Argentina (San Juan, San Luis y La Rioja). En la provincia de San Juan existen bosques extensos de *R. girolae* llamados "chicales", principalmente localizados en los departamentos de Caucete y Valle Fértil (San Juan). Existe evidencia de que las semillas de *R. girolae* formaron parte de la alimentación desde épocas pre-hispánicas (Spegazzini, 1924). Estas semillas aún son consumidas por los habitantes de pequeñas poblaciones rurales cercanas a los "chicales". Estas comunidades utilizan como suplemento alimenticio las semillas de *R. girolae* como así también las vainas de algunas especies de *Prosopis*. En estas zonas rurales, las actividades humanas de subsistencia se basan en la agricultura, el pastoreo de cabras, que les permiten obtener carne y productos lácteos, así como también la comercialización de otros productos naturales, generalmente asociados con la flora nativa. Todas estas actividades se basan en un sistema de producción sostenible, para aprovechar las propiedades medicinales o nutricionales de su entorno (Agüero y col., 2011). El efecto de los componentes de las plantas sobre los organismos generalmente se basa en el conocimiento popular del uso tradicional y repetitivo (da Silva Nunes y col., 2011).

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, recientemente han cobrado especial relevancia, especialmente por su actividad antioxidante y su capacidad de captura de radicales libres, y sus posibles beneficios en prevención y mantenimiento de condiciones saludables. En este contexto, varios autores (Wootton-Beard y Ryan, 2011; Martínez-Navarrete y col, 2008; Peschel y col., 2006; Tomás-Barberán, 2003) han demostrado que los componentes de este tipo, presentes en los alimentos, protegen contra el daño oxidativo y también pueden contribuir a la prevención de numerosas patologías, como las enfermedades cardiovasculares, el envejecimiento y el cáncer, a consecuencia de esto se incrementó el interés por el conocimiento de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos, respecto a su utilización para una nutrición saludable y preventiva.

Para explotar las funcionalidades de los alimentos (autóctonos) disponibles a nivel local, culturalmente aceptables y económicamente viables, es importante centrar la atención en sus compuestos bioactivos, con el fin de promover la salud. Recientemente, Vadivel y col., (2011) indicaron que entre las diversas sustancias bioactivas, los compuestos fenólicos son los más abundantes antioxidantes presentes en alimentos de origen vegetal de consumo habitual.

El objetivo principal de este estudio fue a partir de las semillas de *Ramorinoa girolae* caracterizar el perfil de compuestos fenólicos, su actividad antioxidante, el contenido de minerales y la composición de ácidos grasos.



Determinación de:

Fenólicos Totales

Flavonoides

Ácidos grasos

Minerales



Caracterización de compuestos fenólicos mayoritarios

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a lo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos, se prepararon los extractos seriados a partir de 5 g de semillas y se obtuvieron los extractos éter de petróleo (EEP), diclorometano (EDCM) y metanol (EMeOH), los rendimientos respecto del material de partida fueron $34,10 \pm 4,48$ %; $2,37 \pm 2,17$ % y $9,54 \pm 2,06$ %, respectivamente. Estos extractos se usaron para la determinación de compuestos fenólicos totales, la determinación de flavonoides, el perfil de ácidos grasos sobre los extractos de éter de petróleo (EEP) y la actividad antioxidante. El contenido de minerales se realizó a partir de las semillas. El resto de los frutos se mantuvieron al abrigo de la luz a -20 °C para los posteriores análisis.

Determinación del contenido de fenólicos totales y flavonoides

En los EDCM y EMeOH de las semillas, se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales y de flavonoides. El contenido de compuestos fenólicos totales expresados como mg EAG/100 g de semillas de *R. girolae*, y el contenido de los flavonoides, expresados como mg EQ/100 g semillas del fruto, se presentan en la **Tabla III-1**.

El mayor contenido de fenólicos totales y de flavonoides lo mostró el EMeOH de las semillas, con valores mayores a 1000 mg EAG/100 g de semillas, en ambos casos. Estos resultados son mayores a los reportados por Fabani y col. (2013) para los extractos metanólicos de pistachos cultivados en la Provincia de San Juan. Para el caso del contenido de fenólicos y flavonoides del EDCM, fueron considerablemente menores. De acuerdo con estos datos, las semillas de *R. girolae* son ricas en compuestos fenólicos, incluyendo flavonoides; los que son útiles para bloquear la

acción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el organismo, por lo que pueden proporcionar una protección significativa contra la oxidación de macromoléculas biológicas esenciales

Tabla III-1: Contenido de fenólicos totales y flavonoides de extractos seriados de las semillas de *Ramorinoa girolae*

Extracto	Compuestos Fenólicos Totales (mg EAG/100g semillas)	Flavonoides (mg EQ/100g semillas)
EP	n.d.	n.d.
DCM	54,67 ± 22,77	31,00 ± 18,60
MeOH	1548,18 ± 710,52	1047,57 ± 183,83

EAG: equivalente de ácido gálico; EQ: equivalente de quercetina. Cada valor se expresa como la media ± la desviación estándar (DE) ($n=3$).

Determinación del contenido de ácidos grasos

El análisis de la composición del contenido de ácidos grasos en las semillas de *R. girolae* se realizó en los EEP, utilizando cromatografía gaseosa como se describió en el capítulo de Materiales y Métodos. Este análisis mostró que las semillas de los frutos de *Ramorinoa girolae* poseen un 34 % de aceite, donde un 86 % aproximadamente está representado por ácidos grasos insaturados y 14 % de ácidos grasos saturados. Del contenido de ácidos grasos insaturados, el 71 % corresponde a ácido oleico (AO) y 15 % de ácido linoléico. Si se compara con el contenido de AO (45 %) en el aceite de maní (*Arachis hypogaea* L.), la cantidad es considerablemente mayor. La composición de ácidos grasos de las semillas de *R. girolae* es comparable con el contenido de, por ejemplo AO, de la variedad de maní alto oleico, que posee un 80% de este ácido graso y un 2 – 3 % de ácido linoleico, lo que los hace resistentes a la oxidación, por lo que

muestra una mayor estabilidad química y sensorial, durante el almacenamiento con respecto a la variedad de maní normal (Nepote y col., 2009).

Además, los aceites con alto contenido de AO han demostrado tener un efecto beneficioso en la salud humana. Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) como el ácido oleico, ofrecen protección contra las enfermedades cardiovasculares mediante la reducción de los niveles de la lipoproteína de baja densidad LDL (Light Density lipoprotein) conocido comúnmente como el colesterol "malo", mientras que eleva los niveles de lipoproteína de alta densidad HDL (High Density Lipoprotein) conocido como colesterol "bueno" (Nepote y col., 2009; FAO, 2012).

A continuación, en la **Figura III-1** se presenta el perfil de ácidos grasos presentes en las semillas de *R. girolae* y sus respectivos porcentajes.

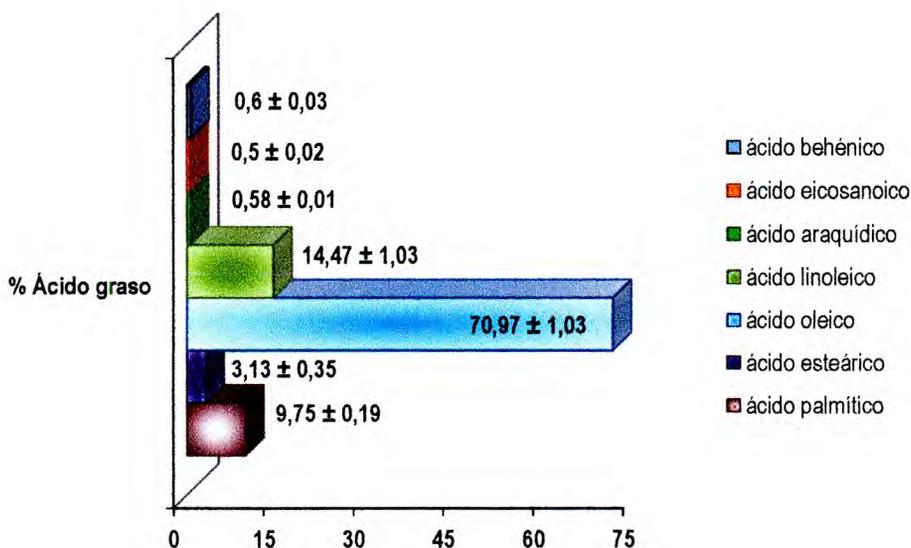


Figura III-1: Porcentaje de ácidos grasos de las semillas de *R. girolae* determinados por CG mediante comparación de los tiempos de retención con compuestos de referencia. Los valores se presentan como la media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

En el EEP de las semillas de *R. girolae* se identificaron siete ácidos grasos. La principal característica del perfil de ácidos grasos de estas semillas, fue la presencia de

elevadas cantidades (alrededor de un 71%) de AO. El contenido de AO presente en las semillas del fruto bajo estudio también es comparable con el contenido informado para los aceites vegetales de algunas variedades de aceite de oliva reportado por Torres y Maestri, (2006).

En el aceite de las semillas estudiadas, los ácidos grasos poliinsaturados están representados por un 14,47 % del ácido linoléico (9,12-octadecadienoico, 18:2). Los ácidos grasos saturados fueron: ácido hexadecanoico (9,75 %, palmítico, 16:0) y ácido octadecanoico (3,13 %, esteárico, 18:0). Mientras que los ácidos: eicosanoico (araquídico, 20:0), eicosaenoico (galodeico, 20:1) y docosanoico (behénico, 22:00) se detectaron en pequeñas cantidades (0,58, 0,50 y 0,60 %, respectivamente). El contenido de ácidos grasos permitió calcular otros parámetros utilizados para predecir la vida útil y la estabilidad del aceite, tales como la relación oleico/linoleico (O/L), la relación de ácidos grasos saturados e insaturados (S/I) y el índice de yodo (IY). El grado de insaturación es inversamente proporcional a la calidad de la fracción grasa, incluyendo el aumento de la rancidez oxidativa, asociada con altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados. Los valores obtenidos con aceite de semillas de *R. girolae* fueron: O/L = 4,93; IY = 90,05 y S/I = 0,164, e indican que el aceite de estas semillas podría tener una mayor estabilidad oxidativa que el aceite de la variedad normal de maní, que presenta IY mayor (111,88) y O/L considerablemente menor (1,33) (Nepote y col, 2009).

Los efectos más notables que tienen los ácidos grasos monoinsaturados y el ácido oleico en particular, provienen de estudios en los que se han sustituido las grasas saturadas por este ácido graso. Se ha estimado que la reducción del riesgo de enfermedad coronaria en un 20 – 40 %, producido principalmente a través de la reducción de LDL-colesterol, se puede lograr por la sustitución isocalórica de alrededor

del 5 % de energía procedente de ácidos grasos saturados por ácido oleico (Kris-Etherton, 1999). También se han informado otros efectos beneficiosos sobre otros factores de riesgo en las enfermedades cardiovasculares, tales como los factores relacionados con la trombogénesis, la susceptibilidad de la oxidación de LDL y la sensibilidad a la insulina, *in vitro* (Kris-Etherton, 1999; Vessby y col, 2001, Wahrburg, 2004;).

Como la ingesta de grasas saturadas en muchos países es más elevada que los niveles recomendados, el aumento en la ingesta de ácido oleico puede ser beneficioso, ya que limita el consumo de grasas saturadas. Esto puede lograrse al cambiar los hábitos alimentarios, como por ejemplo, el uso de aceite de oliva en lugar de manteca, o mediante el uso de la tecnología de los alimentos para modificar el perfil de ácidos grasos en los alimentos naturalmente ricos en ácidos grasos saturados en favor del ácido oleico (López-Huertas, 2010). Varias líneas de investigación al respecto, expresan y apoyan los efectos protectores del AO en contrarrestar la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurológicos. Recientemente, Cardoso y col., 2011 propusieron que el AO puede modular la respuesta inflamatoria e inmunológica en las lesiones cutáneas que produce la reparación diferencial de la herida y sugiere que el AO puede ser una herramienta útil para el tratamiento de las heridas cutáneas, especialmente en aquellos casos de quemaduras y úlceras diabéticas o de presión.

De acuerdo con el perfil de ácidos grasos presente en el aceite de las semillas de *Ramorinoa girolae*, su consumo contribuye con las necesidades nutricionales, lo que es importante ya que son ampliamente utilizadas por la población que vive en las cercanías de los "chicales".

Análisis de Minerales

El análisis del perfil de minerales se realizó a partir de las semillas de *R. girolae* pulverizadas, además se analizaron estas muestras enriquecidas en cada elemento y también se utilizó un material de referencia certificado, de acuerdo a lo descrito en el capítulo de Materiales y métodos. En la **Tabla III-2** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla III-2: Contenido de minerales en las semillas de *R. girolae*, expresado en $\mu\text{g/g}$

Mineral	Concentración	LOD ^a	LOQ ^b
Potasio	8174,76 ± 767,91	4,913	9,801
Magnesio	3085,00 ± 249,55	1,720	3,732
Calcio	2320,16 ± 136,21	41,385	110,082
Sodio	48,25 ± 12,20	1,195	2,183
Hierro	35,15 ± 2,97	0,588	3,292
Zinc	31,47 ± 2,64	1,126	2,626
Boro	25,86 ± 3,18	0,823	1,871
Cobre	18,86 ± 1,28	0,010	0,031
Manganeso	14,98 ± 1,64	0,019	0,045
Aluminio	8,82 ± 2,90	0,281	0,720
Estroncio	5,57 ± 0,30	0,037	0,094
Rubidio	2,65 ± 0,84	0,003	0,008
Molibdeno	2,06 ± 0,17	0,065	0,068
Berilio	0,38 ± 0,02	0,010	0,031
Vanadio	<LOD	0,005	0,008
Cromo	<LOD	0,559	0,619
Cobalto	<LOD	0,010	0,031
Níquel	<LOD	0,397	1,091
Litio	<LOD	0,010	0,309
Arsénico	<LOD	0,031	0,051
Selenio	<LOD	0,033	0,079
Teluro	<LOD	0,074	0,327
Talio	<LOD	0,441	1,373
Bismuto	<LOD	0,010	0,031
Galio	<LOQ	0,006	0,021
Plata	<LOQ	0,002	0,017
Cadmio	<LOQ	0,010	0,031
Bario	<LOQ	0,042	0,126
Plomo	<LOQ	0,010	0,031

Valores expresados como la media ± desviación estándar ($n = 3$, $\mu\text{g/g}$). ^aLOD: límite de detección y ^bLOQ: límite de cuantificación.

Se evaluaron veintinueve minerales, de los cuales: Li, V, Cr, Co, Ni, Ga, As, Se, Cd, Ag, Te, Ba, Tl, Pb y Bi estuvieron por encima de límite de detección. El análisis de los

resultados obtenidos respecto al perfil de minerales muestra que K, Mg y Ca fueron los minerales mayoritarios identificados, mientras que Na, Fe, Zn, B, Cu, Mn, Al, Sr, Rb, Mo y Be, están presentes en pequeñas proporciones. En cuanto a la composición, el potasio fue el mineral mayoritario y representó el 59% del contenido total de los minerales, con una concentración de 8 g/kg. El magnesio y el calcio están presentes en cantidades moderadas, con un 22% y el 17% respectivamente, respecto al total.

Los minerales tienen numerosas funciones en el organismo humano. El sodio, el potasio y el cloro están presentes como sales en los líquidos corporales, donde tienen la función fisiológica de mantener la presión osmótica (FAO, 2002). Es importante destacar que algunos minerales como Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Mo y Mn; presentes en estas semillas estudiadas, están a su vez, incluidos por el Código Alimentario Argentino (CAA) en los requerimientos nutricionales de la ingesta diaria de nutrientes de casi todos los individuos. En la **Figura III-2** se muestra el contenido de minerales respecto de 100 g de semillas de frutos. Éste refleja el aporte nutricional que representa el consumo de una porción de las mismas.

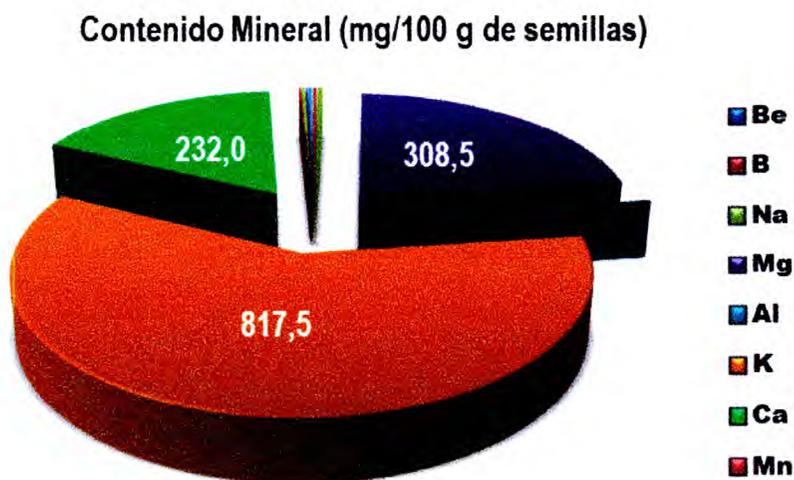


Figura III-2: Contenido de minerales de las semillas de *R. girolae* expresado en mg de mineral que aporta el consumo de 100 g de semillas (mg/100 g semillas).

El potasio es un nutriente esencial necesario para el mantenimiento del volumen total de fluido corporal, el ácido y el equilibrio de electrolitos, y la función normal de las células. El aumento de la ingesta de potasio reduce la presión sistólica y diastólica en adultos (OMS, 2012). La OMS recomienda un aumento en la ingesta de potasio de los alimentos para reducir la presión arterial y el riesgo de enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular y enfermedad coronaria en los adultos. La ingesta sugerida de potasio es de al menos 90 mmol/día (3510 mg/día) para los adultos.

El magnesio (Mg) es el cuarto catión más abundante en el cuerpo y el segundo catión intracelular predominante. En cuanto a su rol fisiológico, el Mg es esencial para diversas reacciones enzimáticas que lo utilizan como cofactor (Rude y Gruber, 2004). Si se consideran los valores de Ingesta Diaria Recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas y minerales para los individuos de los distintos grupos poblacionales, tomando como referencia las últimas recomendaciones por la FAO/OMS (Human Vitamin and Mineral Requirements, FAO/OMS, 2002 y Dietary Reference Intake, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies Press, 2002-2005), que para el caso del Mg es de 260 mg/día, se sugiere que el consumo de estas semillas induce al beneficio con respecto a este mineral. La cantidad de magnesio presente en las semillas de *R. girolae* proporcionaría 308,5 mg por cada 100 g de semillas que se consuman, cantidad que es superior a la requerida por las Ingesta Diaria Recomendada (IDR).

Las sales de calcio proporcionan rigidez al esqueleto y los iones de calcio tienen un rol importante en la mayoría de los procesos metabólicos. Muchas funciones celulares neuromusculares dependen del mantenimiento de la concentración de calcio ionizado en los fluidos extracelulares. El equilibrio del calcio en el organismo se determina por la relación entre la ingesta de calcio, su absorción y la excreción del mismo (OMS, 2002).

La ingesta diaria recomendada para los adultos es de 1000 mg/día, de acuerdo a la FAO/OMS, 2002. Con respecto al contenido de este mineral en las semillas de *R. girolae*, el consumo de éstas puede aportar una cantidad considerable y ser beneficioso para la salud. Por otra parte, el cobre (Cu) actúa como cofactor de varias enzimas, algunas de las cuales son esenciales para el metabolismo del hierro. Las deficiencias de Cu son poco frecuentes, pero varios estudios han informado de una correlación directa entre proporción Zn/Cu en la dieta y la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Cabrera y col., 2003). La ingesta diaria recomendada de cobre para los adultos es de 900 mg (OMS, 2002). La contribución de cobre a partir del consumo de semillas de *R. girolae*, es de 1900 mg por cada 100 g de semillas. Por otro lado, las enzimas que necesitan zinc como cofactor, participan en una amplia variedad de procesos metabólicos, como son la síntesis o degradación de los carbohidratos, lípidos y proteínas. El Zn no sólo es necesario para la síntesis del ácido desoxirribonucleico y ribonucleico, sino que también tiene un rol importante en la estabilización de la membrana plasmática. Además, es reconocido como un cofactor de la enzima superóxido dismutasa, la que está implicada en la protección de los procesos oxidativos. La entrega neta de Zn a un organismo es una relación directa de la cantidad total de este elemento presente en los alimentos y de su biodisponibilidad. El consumo diario recomendado de zinc para adultos es de 7,0 mg (OMS, 2002). El consumo de 100 g de semillas de *R. girolae* aportan 3,15 mg de zinc, lo que representa el 45% de la dosis diaria requerida.

Caracterización de los compuestos fenólicos mayoritarios por CL-ESI-MS/MS y por CL-ESI-TOF-MS

Se analizaron los EDCM y EMeOH (obtenidos según se describió en materiales y métodos) mediante variantes de la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

Para confirmar la identidad de los compuestos se realizó un análisis utilizando la técnica HPLC/ESI-TOF-MS, sobre la base de la masa exacta de los compuestos. El cromatograma correspondiente al EDCM, mostró la ausencia de señales correspondientes a compuestos fenólicos en la zona esperada del cromatograma

Figura III-3:

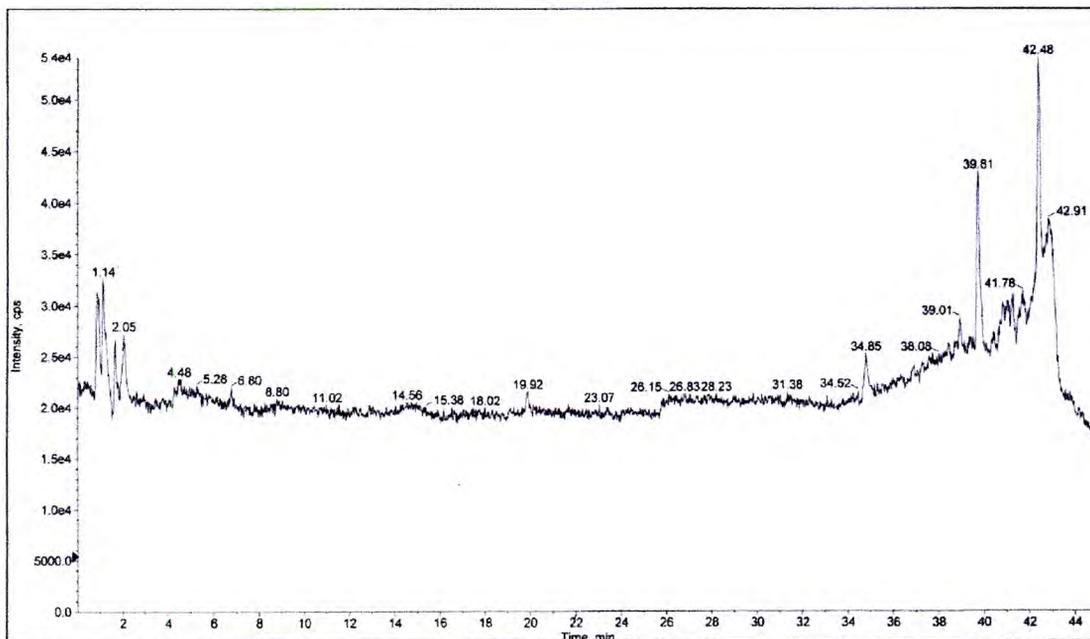


Figura III-3: Cromatograma del EDCM

A continuación, en la siguiente **Figura III-4**, se presenta el cromatograma correspondiente al EMeOH, se observa la presencia señales que posiblemente correspondan a los flavonoides.

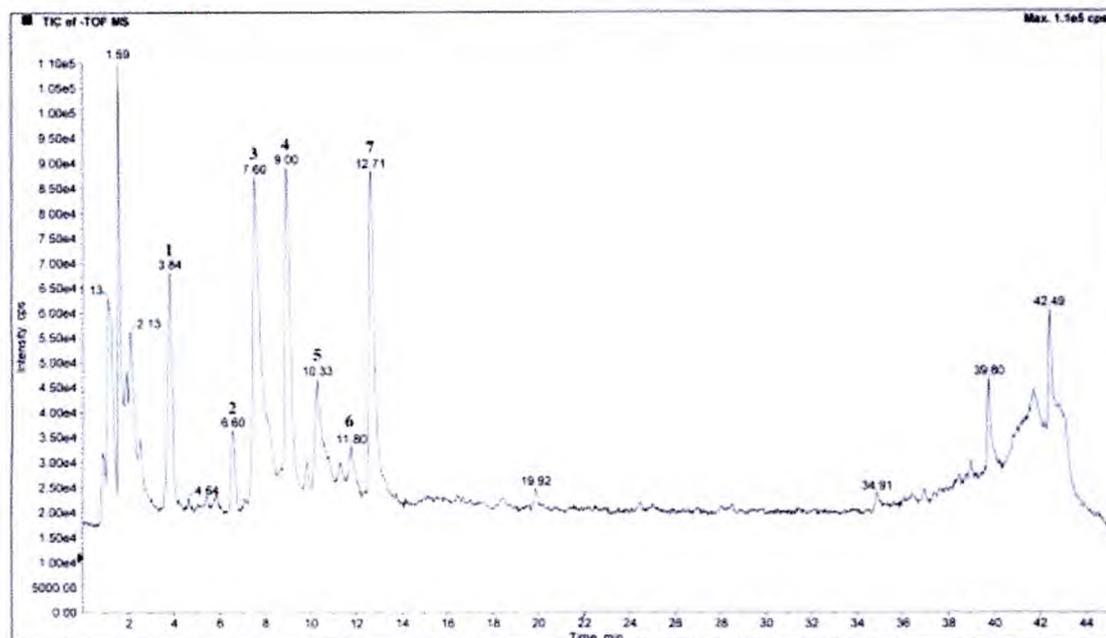


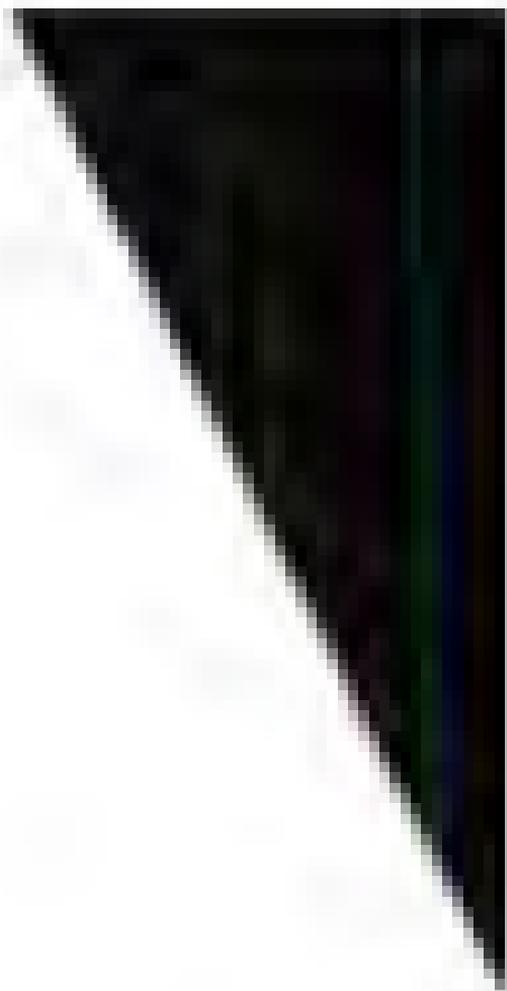
Figura III-4: Cromatograma del EMeOH

En la **Tabla III-3**, se presentan los componentes caracterizados en el EMeOH y las fórmulas tentativas de los componentes caracterizados. Las fórmulas corresponden a las de máxima coincidencia según la masa exacta de los iones principales (valor abs. del error < 2 mDa/5 ppm).

Tabla III-3: Componentes mayoritarios del EMeOH.

Señal	t_r	Compuesto	Masa exacta	Fórmula [M-H] ⁻	Error (mDa)	Error (ppm)
1	3.84	Derivado de Ác. cumárico	309.1121	C ₁₉ H ₁₇ O ₄	-1.13	-3.66
2	6.60	n.d.	296.1530	C ₂₃ H ₂₀	0.15	0.50
3	7.60	n.d.	255.0524	C ₁₁ H ₁₁ O ₇	1.37	5.38
4	9.00	Epigallocatequina	305.0682	C ₁₅ H ₁₃ O ₇	1.52	4.99
5	10.33	Catequina-O-Glucósido	451.1261	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₁	1.51	3.36
6	11.80	Procianidina B (Dímero catequina)	577.1356	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	0.45	0.78
7	12.71	Catequina	289.0730	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	1.24	4.28

n.d.: no determinado



Los cuatro derivados de catequina, correspondientes a las señales identificadas como **4, 5, 6 y 7 (Figura III-4, Tabla III-3)** presentan patrones de fragmentación coincidentes con los reportados en la bibliografía (Del Río y col., 2004; Touriño y col., 2008 y Zywicki y col., 2007). Además, los perfiles observados para catequina y procianidina B, coinciden con los de la base de datos MassBank (www.massbank.jp).

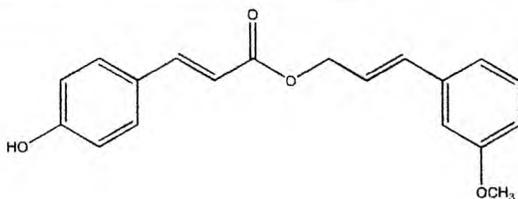
La estereoquímica de los compuestos identificados no ha sido determinada aún, ya que los patrones de fragmentación de los isómeros suelen ser similares. Si bien es posible diferenciarlos mediante la comparación de sus índices de retención, para ello es necesario disponer de patrones que puedan inyectarse en las mismas condiciones metodológicas que las muestras, lo que aún no se pudo llevar a cabo.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, el compuesto **4** podría corresponder tanto a gallocatequina como a epigallocatequina; y con respecto al compuesto **5**, la unión del azúcar con la molécula de catequina podría ser distinta a la mostrada en la figura; la procianidina B podría corresponder a cualquiera de los diferentes isómeros del dímero, etc. En la tabla anterior se muestran las fórmulas tentativas que concuerdan con la masa exacta de cada ion. Aunque los tres primeros compuestos de la lista no se han podido identificar completamente, en el caso del compuesto **1**, se plantea la posibilidad de que sea un derivado del ácido cumárico, debido a la presencia de sus iones característicos, m/z 163 y m/z 119 (Regos y col, 2009). En la siguiente figura (**Figura III-5**) se muestran las estructuras de los compuestos identificados, junto con la estructura tentativa del compuesto **5**, que coincide con los datos mostrados.

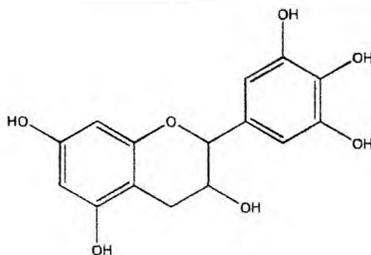


Figura III-5: estructuras químicas de los compuestos identificados en el EMeOH de las semillas de *R. girolae*

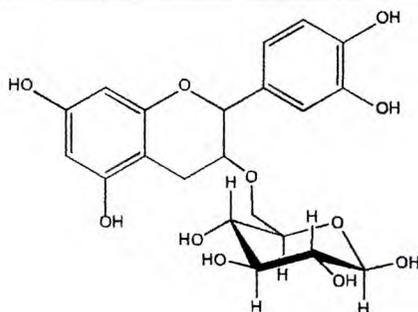
Compuesto 1: Derivado del ácido cumárico



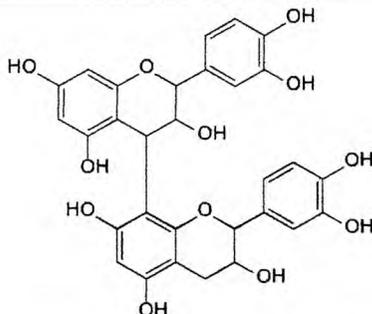
Compuesto 4: Epigallocatequina



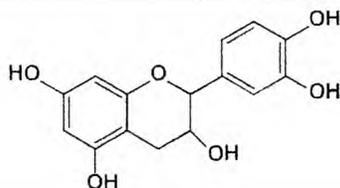
Compuesto 5: Catequina-O-glucósido



Compuesto 6: Procianidina B



Compuesto 7: Catequina



La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados, en la que se citan los iones característicos de cada compuesto.

Tabla III-4: Identificación tentativa de los compuestos mayoritarios detectados en el EMeOH.

Señal	Compuesto	t_R	Masa detectada $m/z [M - H]^-$	Masa teórica $m/z [M - H]^-$	Iones MS/MS
1	Derivado de Ác. Cumárico	3,84	309,1121	309,1132	180,072 / 163,047 / 128,044 / 119,055
2	N.d.	6,60	296,1530	-	222,124 / 195,074 / 177,065 / 149,074 / 133,072 / 118,054
3	N.d.	7,60	255,0524	-	219,869 / 201,855 / 195,037 / 165,066 / 149,071 / 123,052
4	Epigallocatequina	9,00	305,0682	305,0666	219,068 / 179,037 / 139,041 / 125,024
5	Catequina-O-Glucósido	10,33	451,1261	451,1245	289,076 / 245,0898
6	Procianidina B (Dimero catequina)	11,80	577,1356	577,1351	451,122 / 425,099 / 407,089 / 289,084 / 245,081
7	Catequina	12,71	289,0730	289,0717	245,084 / 205,057 / 123,054

n.d.: no determinado



Actividad antioxidante

Ensayo de decoloración de DPPH

Ensayo del poder reductor del ión férrico (FRAP)

Inhibición de la lipoperoxidación en membranas de eritrocitos

Evaluación de la actividad antioxidante frente a *S. cerevisiae*

Evaluación de la actividad antioxidante

1. Ensayos “in vitro”

1.1. Actividad atrapadora del radical DPPH

Se determinó la capacidad de captura de radicales libres de los extractos seriados obtenidos a partir de las semillas de *R. girolae*, a diferentes concentraciones (5, 10, 50 y 100 µg/mL), utilizando el radical difenilpicrilhidracilo, DPPH. Esto se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos. Se utilizaron catequina (C) y quercetina (Q) como compuestos de referencia, en las mismas concentraciones. Los resultados del ensayo de decoloración del radical DPPH se presentan en la **Figura III-6**. El EMeOH fue el que mostró una mayor capacidad de captura (> 90 % a 50 µg/mL) con respecto a los demás extractos ensayados, y a su vez es equivalente a la capacidad de la quercetina utilizada como estándar (> 90 % a 50 µg/mL). Esta propiedad de captura del radical DPPH por parte del EMeOH de las semillas de *R. girolae* se debe a la presencia de los compuestos dadores de hidrógeno, como los compuestos fenólicos (EMeOH; 1548,18 ± 710,52 mg EAG/100g semillas), los cuales con mayor frecuencia se encuentran presentes en los extractos polares (Middleton y col., 2005).

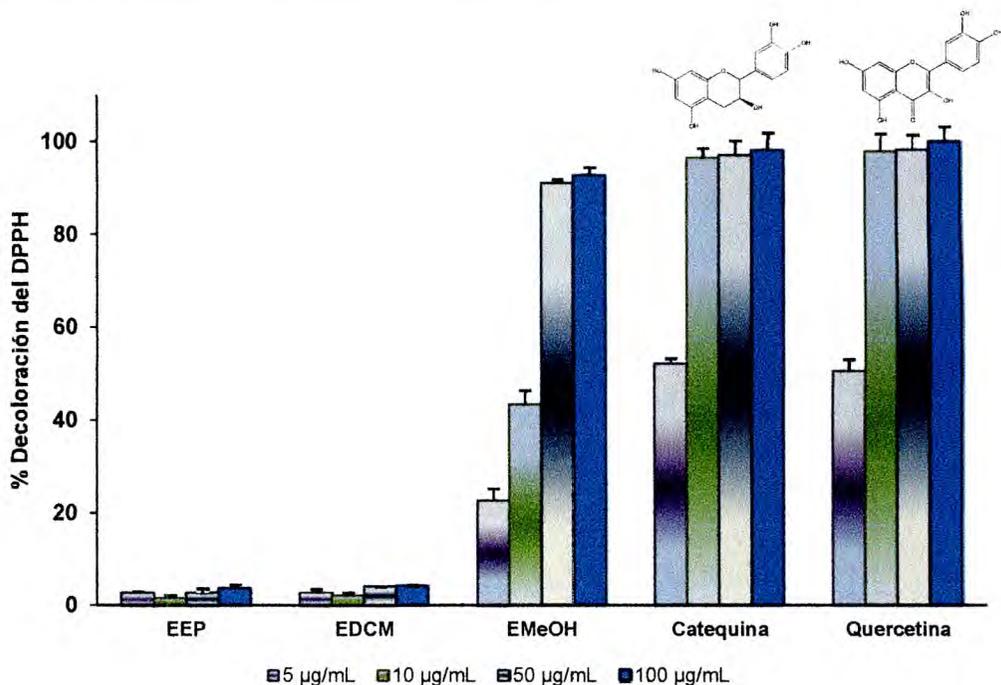


Figura III-6: Porcentaje de decoloración del radical DPPH de los extractos EP, DCM y MeOH a 5, 10, 50 y 100 µg/mL. Catequina y Quercetina se ensayaron como estándares. Los valores se presentan como la media ± desviación estándar ($n = 3$).

1.2. Ensayo del poder reductor del ión férrico (FRAP)

Se determinó el poder reductor de los EDCM y EMeOH de las semillas de este fruto, a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/mL), de acuerdo a metodología descrita en el capítulo de Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como mg EAG/100 g de semillas y se muestran en la siguiente **Figura III-7**. El EMeOH fue el que mostró mayor poder reductor, en todas las concentraciones ensayadas, comparado con el EDCM. A su vez, tanto a 200 como a 500 µg/mL se presenta la mayor capacidad de este extracto para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . Esto se debe a que en el EMeOH, más polar, se encuentran los compuestos con mayor capacidad para actuar en reacciones de transferencia de electrones, y así reducir el ión férrico.

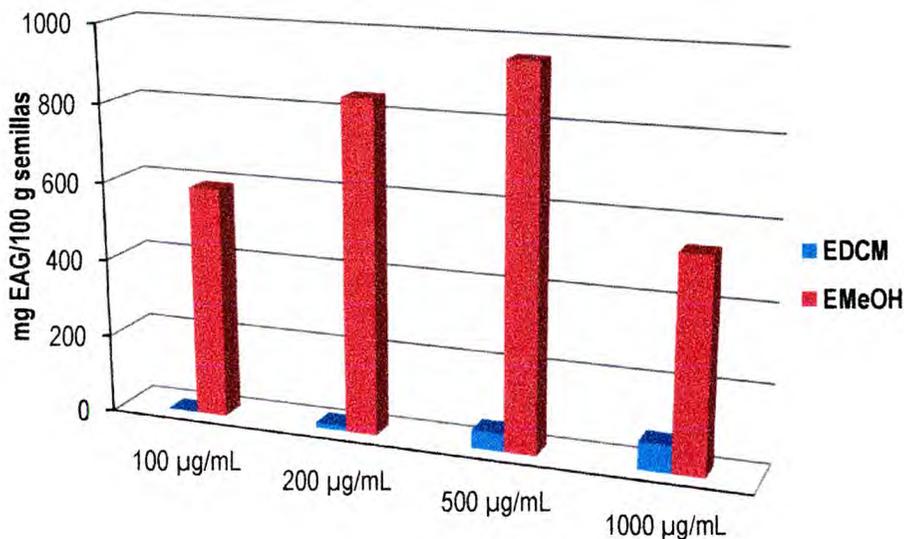


Figura III-7: Ensayo del poder reductor del ión férrico de los EDCM y EMeOH a 100, 200, 500 y 1000 µg/mL; expresado en mg EAG/ 100 g semillas. Se utilizó ácido gálico como estándar para realizar la curva de calibración.

Ensayo de Folin – Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu (FC) para determinar el contenido de fenoles totales (FT) es un ensayo basado en la transferencia de electrones (TE) y a su vez, brinda información de la capacidad reductora del antioxidante, debido a que el mecanismo básico es una reacción de oxidación/reducción. A pesar de que normalmente se expresa como contenido de fenólicos, puede ser considerado como un método para el análisis de la actividad antioxidante (Prior y col., 2005).

Esta determinación se llevó a cabo para los extractos de media y elevada polaridad, utilizando el ácido gálico (AG) como compuesto de referencia, para realizar la curva de calibración, por lo que los resultados se expresan como mg equivalentes a AG por cada 100 g de semillas, como se muestra a continuación. Se presentan los valores en

Tabla III-5.

Extracto	mg EAG/100 g semillas
EDCM	54,67 ± 22,77
EMeOH	1548,18 ± 710,52

Tabla III-5: Los valores se expresan como mg EAG/100g semillas y se presentan como la media ± desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos muestran que el EMeOH de las semillas de *R. girolae*, presenta mayor capacidad de reducción, por lo que tendría mayor capacidad antioxidante. Esto está de acuerdo a los resultados obtenidos en los demás ensayos, como FRAP por ejemplo, que mostró que el extracto EMeOH una mayor capacidad para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , para todas las concentraciones ensayadas. El valor obtenido para este extracto (> 1548 mg EAG/100 g semillas) es considerablemente mayor que el reportado para el EMeOH de pistachos cultivados en la Provincia de San Juan, por Fabani y col., (2013) (360 – 463 mg GAE/100 g peso seco).

1.3. Inhibición de la lipoperoxidación en eritrocitos

Los eritrocitos humanos se utilizaron como un modelo basado en células para dilucidar la importancia biológica de las actividades antioxidantes de los extractos de las semillas de *R. girolae*. Éste se llevó a cabo de acuerdo con lo que se describió en Materiales y Métodos.

La mayor actividad la presentó el EMeOH a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, con una inhibición de la lipoperoxidación en eritrocitos mayor al 92%. Catequina (a 100 $\mu\text{g/mL}$) se utilizó como compuesto de referencia y mostró más de 72 % de inhibición, valor que coincide con el reportado por Tapia y col., 2004.

El EMeOH evita la hemólisis que proviene de la ruptura de las membranas celulares, inducidas por la peroxidación lipídica. Además, la inhibición de la peroxidación lipídica que producen los compuestos antioxidantes es fundamental para mitigar la inducción y/o propagación de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Mendes y col., 2011). Los lípidos son los componentes principales de la membrana celular y por lo tanto su peroxidación afecta casi directamente a las células, ya que se produce un daño oxidativo celular irreversible. La elevada capacidad de inhibir la peroxidación lipídica del extracto más polar de *R. girolae* puede ser un indicador de su gran potencial terapéutico.

2. Ensayos “in vivo” en levaduras

2.1. Evaluación de la actividad antioxidante frente a *Saccharomyces cerevisiae*

Ensayo de sobrevida

Se realizó este ensayo para evaluar la capacidad de protección de ciertos compuestos frente al daño oxidativo, mediante un ensayo “in vivo” que utiliza el modelo de célula eucariota de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta evaluación se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo de Materiales y Métodos. Ya se ha demostrado que los ensayos con células vivas son útiles dentro de los análisis de rutina para diversas muestras, ya que producen resultados fiables en términos de la identificación de la diversidad de las actividades biológicas, incluida la capacidad antioxidante (Belinha y col., 2007.; Wilmsen y col., 2005). Es importante verificar si los compuestos que son conocidos por sus propiedades antioxidantes *in vitro*, también funcionan en ensayos *in vivo*, y además, evaluar la posibilidad de relacionar esta actividad en los sistemas vivos (Baroni y col., 2012).

La capacidad del compuesto catequina, identificado en el EMeOH de las semillas de *R. girolae*, se evaluó para proteger las células contra el daño de *S. cerevisiae*, después de inducir el estrés oxidativo con H_2O_2 , determinando la viabilidad celular con o sin la presencia del compuesto, a diferentes concentraciones (10 y 50 $\mu\text{g/mL}$). Las células de levadura mostraron sensibilidad al daño producido por H_2O_2 0,75 mM y sólo el 33 ± 13 % de las células fue capaz de sobrevivir a la agresión oxidativa provocada. Como se ve en el **Figura III-8**, el tratamiento con catequina a las concentraciones ensayadas suprimió parcialmente el daño producido por el oxidante. La mayor concentración de catequina protegió en mayor medida a las células de levaduras frente al daño oxidativo (mostró un 11 % más de protección, aproximadamente).

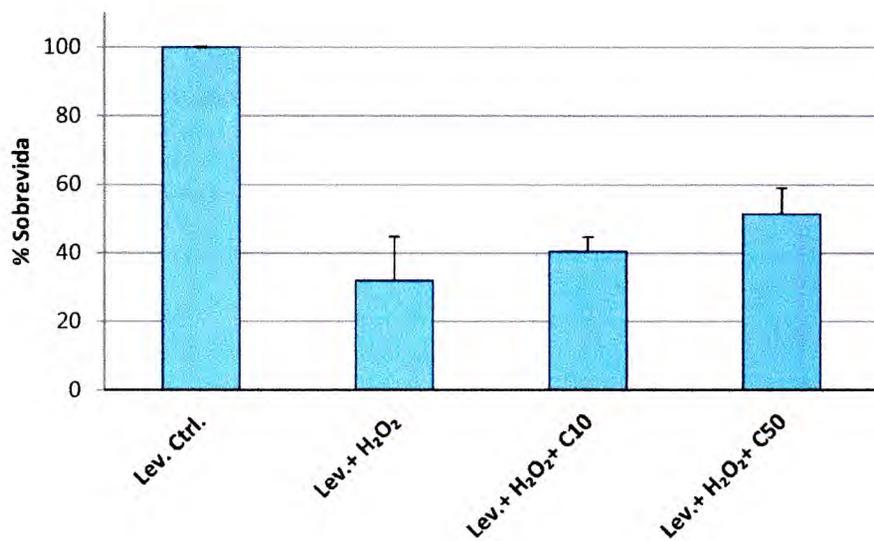


Figura III-8: porcentaje de sobrevivida de *S. cerevisiae* tratadas con catequina a 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ (Lev.+H₂O₂+C10 y Lev.+H₂O₂+C50) y células dañadas sin tratar (Lev.+H₂O₂), comparadas con el control (Lev. Ctrl.). Los resultados se informan como la media \pm DE ($n = 3$).

Estos resultados muestran que el tratamiento previo con un antioxidante conocido, como es catequina, aumentaría la tolerancia de las células al estrés oxidativo. El estrés oxidativo generado por el peróxido de hidrógeno, provoca daños en las células debido a la producción de radicales hidroxilo, mediante la reacción de Heber-Weiss/Fenton. El

H_2O_2 difunde con mayor velocidad dentro y entre las células *in vivo*, causando daños en las membranas, organelos, y también en el núcleo celular (Wilmsen y col., 2005). En la **Figura III-9** se representa el mecanismo para el caso del Fe^{2+} , que es capaz de descomponer al peróxido de hidrógeno en un radical hidroxilo y un anión hidroxilo (Reacción de Fenton). Esta reacción se combina con la reducción del Fe^{3+} por el radical superóxido, que regenera el Fe^{2+} . Además se muestra en la figura otra de las reacciones que producen este tipo de radical, como es la Reacción de Haber-Weiss.

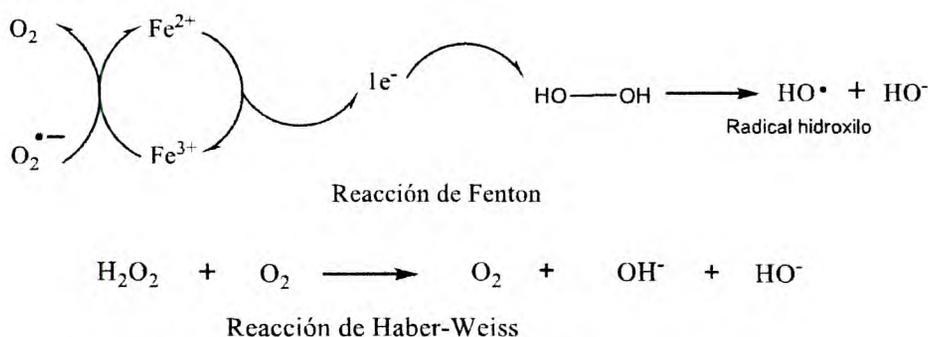


Figura III-9: Reacción de Fenton y de Haber-Weiss, tomado de Menéndez, 1993.

Correlación entre el contenido de Fenoles Totales (FT) y Flavonoides (F), y la actividad antioxidante

Con los resultados del contenido de FT, F y los de actividad antioxidante (Ensayo de decoloración de DPPH y FRAP), se analizó el coeficiente de correlación de Pearson utilizando SPSS (Statistical Product and Service Solutions). Se obtuvieron valores interesantes para la correlación entre los FT del EMeOH de las semillas y la actividad antioxidante evaluada por el método de captura del radical DPPH y el ensayo FRAP. No se observó correlación entre los valores de estos ensayos y los valores de flavonoides (F), es decir que la capacidad antioxidante determinada por estos ensayos no se debe a los compuestos flavonoides, sino a los compuestos fenólicos presentes

en el extracto de mayor polaridad. Los valores del coeficiente de correlación de Pearson obtenidos se muestran en la **Tabla III-6**:

Tabla III-6: Coeficiente de Correlación de Pearson entre los valores de actividad antioxidante (DPPH y FRAP) y el contenido de FT de las semillas.

Fenólicos Totales (mg EAG/100 g semilla)	
DPPH (50 µg/mL)¹	0,890*
FRAP (500 µg/mL)²	0,959*

*Significativo a $p = 0,01$; ^{1,2}Valores de actividad antioxidante expresados en: % Decoloración de DPPH y en mg EAG/100 g semillas (FRAP)

La elevada y significativa correlación positiva que muestra el coeficiente de Pearson obtenido, entre el contenido de FT y la actividad antioxidante evaluada por medio de los ensayos de DPPH y FRAP a las concentraciones mostradas, lo que está de acuerdo con lo planteado por Prior y col., (2005) y Huang y col., (2005); y sugiere que los compuestos fenólicos podrían ser los responsables de la considerable actividad antioxidante que mostraron los extractos de las semillas de esta especie.

CONCLUSIÓN

Sobre la base de los resultados obtenidos, se concluye que las semillas de los frutos de *Ramorinoa girolae* Speg., presentan una composición química que incluye compuestos fenólicos conocidos, como un compuesto derivado del ácido cumárico, epigallocatequina, catequina-O-glucósido, procianidina B (dímero de catequina) y catequina, los que presentan actividad antioxidante, así como también el rol beneficioso para la salud que ellos poseen.

El perfil de ácidos grasos del aceite de estas semillas, sumado al contenido mineral, demuestra que el consumo de este alimento contribuye a un estado saludable, por lo tanto es importante fomentar y estimular su consumo. Las semillas de *Ramorinoa girolae* constituyen un buen suplemento alimentario.

Finalmente, este trabajo contribuye a la promoción de la utilización de estas semillas para la nutrición humana como fuente de compuestos antioxidantes, ácidos grasos y minerales.

Capítulo IV

FRUTOS DE

***Maytenus viscifolia* Griseb.**



INTRODUCCIÓN

La demanda del consumo de frutas y verduras sufrió un incremento en todo el mundo, numerosos estudios epidemiológicos y nutricionales informan la relación positiva entre el aumento del consumo de estos productos y la disminución en la incidencia de enfermedades degenerativas, tales como problemas cardiocirculatorios, enfermedad de Alzheimer, cáncer, entre otras. Los principales responsables de la mejora del estado saludable con el consumo de vegetales, son la vitamina C, los carotenoides, los polifenoles (como antocianinas, flavonoles), éstos por su capacidad para capturar radicales libres, son capaces de neutralizar los efectos nocivos de la peroxidación de lípidos o daños en el ADN (Santacruz y col., 2012). Saura-Calixto y Goñi, 2006, indicaron que las capacidades antioxidantes de las frutas varían en relación a su contenido en vitamina C, vitamina E, carotenoides, flavonoides y otros polifenoles. La capacidad antioxidante se relaciona con los compuestos capaces de proteger el sistema biológico frente a los efectos potencialmente nocivos de los procesos o reacciones que implican especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS).

En los últimos años, ha habido un creciente interés en los alimentos funcionales, es decir, alimentos que pueden proporcionar no sólo los requisitos nutricionales y energéticos básicos, sino también un beneficio fisiológico adicional (Šavikin y col., 2009). Por lo general, la funcionalidad de un alimento está relacionada con algunos de sus ingredientes, los consumidores prefieren cada vez más aquellos ingredientes de origen natural, presentes en las plantas, subproductos de alimentos u otras fuentes naturales (Egea J.M., 2010). Entre los ingredientes funcionales, el grupo más ampliamente estudiado es la familia de los antioxidantes.

Los principales antioxidantes presentes en las frutas son los compuestos fenólicos, ascorbato y carotenoides (Martínez Navarrete y col., 2008; Kaume y col., 2012). Además de los ácidos fenólicos y sus derivados, los frutos contienen miembros de uno o más grupos de flavonoides, tales como flavonas, flavonoles glicosilados, flavanona, antocianinas, proantocianidinas, como los principales componentes fenólicos (Peschel y col., 2008). Las diversas combinaciones en las que se encuentran estos compuestos presentes en los vegetales, sumado a la interacción entre ellos, tienen un importante efecto antioxidante. Se ha encontrado que para algunas combinaciones de antioxidantes, el efecto general es mayor, comparado con el efecto esperado a partir de una simple adición de los antioxidantes individuales, esto es lo que se conoce como sinergismo antioxidante (Becker y col., 2004).

La familia Celastraceae, tiene una amplia distribución mundial, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, constituida por alrededor de 55 géneros, compuestos por unas 850 especies de árboles, arbustos y algunas enredaderas. El género *Maytenus* es el que posee la mayor cantidad de especies (unas 255); en Argentina hay 11 especies. Desde la época del antiguo Perú el género *Maytenus* fue usado como planta medicinal, por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas, diuréticas y afrodisíacas. Posee numerosos estudios científicos en relación a su química, toxicidad aguda, gastroprotección, actividad analgésica, antiinflamatoria, antipirética y los efectos farmacológicos sobre la presión arterial (hipotensora) (Vilegas y col., 1994, 1995, 1998; Souza-Formigoni y col., 1991; Gonzalez F.G. y col. 2001, Martins y col. 2003). En referencia a los sesquiterpenos dihidro-beta-agarofuranos, contenidos en las hojas de especies de la familia Celastraceae, del género *Maytenus* más usados en siglos por la medicina tradicional en varios países del mundo, son los principios activos con una diversidad estructural enorme y un amplio rango de

actividades biológicas, tales como: insecticidas naturales, antibióticos, supresores de tumores, antiinflamatorios y citotóxicos (González A. y col. 2000; Orabi KY y col. 2001; Jorge RM y col. 2004). *M. viscifolia* y *M. vitis-idaea* son especies que poseen aptitud tintórea, forrajera, alimenticia y en menor grado maderera por las escasas dimensiones de sus troncos (Giménez y col. 2010).

Maytenus viscifolia, conocida popularmente como “sombra de toro” en la Provincia de San Juan, habita en suelos salobres, su distribución se extiende desde el noroeste argentino hasta Córdoba y La Rioja, en San Juan es frecuente en el Departamento de Valle Fértil (Kiesling, R. 2003). El fruto de *M. viscifolia* es una cápsula sésil, elipsoidea, roja anaranjada, con 1 o 2 semillas, elipsoideas o semielipsoideas, íntegramente cubiertas por un arilo amarillento. Se diseminan por autocoria, es decir que al madurar caen directamente al suelo, y también como zoocoria, ya que sus semillas se encuentran provistas de excrecencias carnosas como arilos que atraen a agentes de dispersión bióticos como las hormigas por contener ácidos grasos libres insaturados volátiles (Roth, 1987). En la literatura no hay reportes, del uso de esta especie o el uso de alguna parte de la planta con algún fin benéfico.

En este trabajo se propuso el estudio integral de los frutos de la especie *M. viscifolia*, se incluye la capacidad antioxidante, el contenido mineral y de ácidos grasos, como así también los compuestos fenólicos y flavonoides presentes. Con el objetivo de conocer las propiedades de estos frutos para el aprovechamiento sustentable de la especie a través del uso de sus frutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos seriados de los frutos de *Maytenus viscifolia* se prepararon como se describió en el capítulo de Materiales y Métodos. De esta manera, se obtuvieron los extractos éter de petróleo (EEP), diclorometano (EDCM) y metanol ácido (EMeOH-H⁺). Los rendimientos porcentuales con respecto al material de partida fueron de $5,10 \pm 0,16$ %; $0,35 \pm 0,07$ % y $12,02 \pm 0,46$ %, respectivamente. Sobre estos extractos se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos totales, de flavonoides y la actividad antioxidante. En el extracto metanólico ácido (EMeOH-H⁺) se determinó el contenido de antocianinas totales (estos frutos presentan color rojizo). Adicionalmente se analizó el perfil de ácidos grasos en el EEP. El contenido de mineral se determinó en los frutos. Los frutos se mantuvieron al abrigo de la luz a -20 °C para los posteriores análisis.

Determinación del contenido de fenólicos totales, flavonoides y antocianinas totales

En los EEP, EDCM y EMeOH-H⁺ de los frutos, se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (FT) y de flavonoides (F). Respecto al contenido de antocianinas totales (AT), se midió en el EMeOH-H⁺. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla IV-1**. El contenido de FT se expresó en mg EAG/100 g frutos, el de F, en mg EQ/100 g frutos y el de AT, en µg cianidina-3-glucósido/100 g de frutos.

Tabla IV-1: Contenido de fenólicos totales, flavonoides y antocianinas totales en los extractos seriados de los frutos de *Maytenus viscifolia*

Extracto	FT (% mg EAG/100 g frutos)	F (% mg EQ/100 g frutos)	AT (μ g cian-3-glu/100 g frutos)
EEP	0,043 \pm 0,001	0,410 \pm 0,019	n.d.
EDCM	0,003 \pm 0,0004	0,032 \pm 0,008	n.d.
EMeOH-H ⁺	0,406 \pm 0,022	0,146 \pm 0,022	5,925 \pm 0,666

EAG: equivalente de ácido gálico; EQ: equivalente de quercetina; cian-3-glu: cianidina-3-glucósido. Cada valor se expresa como la media \pm la desviación estándar (DE) ($n=3$).

Los resultados mostraron que el mayor contenido de FT se presentó en el EMeOH-H⁺, el valor fue menor al 0,5 %, y casi diez veces mayor que el contenido en el EEP (< 0,05 %). El contenido de F fue mayor en el EEP (0,4 % aproximadamente), mientras que en el EMeOH-H⁺ el contenido fue menor (tres veces aproximadamente) (0,15 %). El análisis de estos resultados indica que el contenido de compuestos fenólicos, se presentan por debajo del 1 %, éstos se expresaron en términos de mg/100 g de frutos. Esto indica que los frutos de *M. viscifolia* no son ricos en polifenoles.

El contenido de AT fue de 6 μ g cian-3-glu/100 g de frutos, que representa un valor considerable de antocianinas. Estos parámetros se informan por primera vez en los frutos de esta especie, y constituyen un resultado relevante puesto que no hay datos en la literatura de esta especie.

Evaluación de la actividad antioxidante

1. Ensayos “in vitro”

1.1. Actividad atrapadora del radical DPPH

Se evaluó la actividad antioxidante mediante la capacidad de captura de radicales libres de los extractos seriados obtenidos a partir de los frutos de *M. viscifolia*, a diferentes concentraciones (5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$), utilizando el radical difenilpicrilhidracilo, DPPH. La metodología llevada a cabo se describió en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en el Gráfico IV-1.

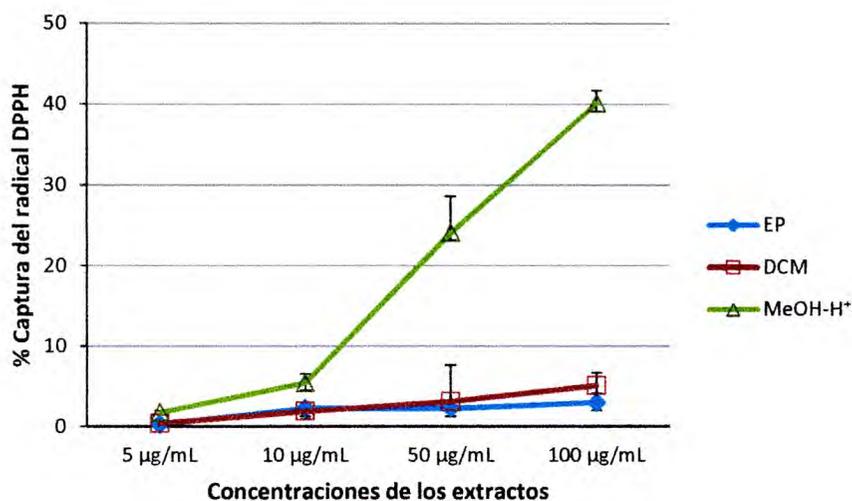


Figura IV-1: Porcentaje de captura del radical DPPH de los extractos seriados de los frutos de *M. viscifolia*, a diferentes concentraciones.

Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar de las mediciones realizadas por triplicado.

Los extractos de polaridad baja y media (EEP y EDM, respectivamente) presentaron un porcentaje $\leq 5\%$ a la mayor concentración ensayada (100 $\mu\text{g/mL}$). El EMeOH-H⁺

mostró mayor capacidad de captura del radical DPPH, aunque a la máxima concentración mostró un 40 % de actividad frente al radical.

Estos resultados muestran que los extractos seriados de los frutos de *M. viscifolia* presentaron una leve capacidad de captura de radicales libres.

1.2. Ensayo del poder reductor del ión férrico (FRAP)

El poder reductor en los EEP, EDCM y EMeOH-H⁺ de los frutos de *M. viscifolia* se determinó a concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 µg/mL. Los resultados se expresan como mg EAG/100 g de frutos y se presentan en la **Tabla IV-2**.

Tabla IV-2: Poder reductor del ión Férrico (FRAP) de los EEP, EDCM y EMeOH-H⁺ de los frutos de *M. viscifolia*, para concentraciones de 500 y 1000 µg/mL.

Extracto	500 µg/mL	1000 µg/mL
	mg EAG/100 g frutos	
EEP	0	0
EDCM	0,60 ± 0,20	3,09 ± 0,47
EMeOH-H ⁺	120,80 ± 24,13	169,48 ± 24,92

Los valores se presentan como la media ± desviación estándar ($n = 3$) y se expresan en mg Equivalentes a Ácido Gálico por cada 100 g de frutos (mg EAG/100 g frutos)

Este ensayo se realizó a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/mL), en la **Tabla IV-2** se muestra la capacidad para reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺ de los extractos seriados solo a 500 y 1000 µg/mL, para las restantes los resultados no presentaron actividad. Los EMeOH-H⁺ fueron más activos, el poder de reductor del ión férrico se presentó entre 120 y 169 mg EAG/100 g frutos para 500 y 1000 µg/mL respectivamente.

1.3. Ensayo TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox)

Este ensayo se llevó a cabo en los extractos seriados de los frutos de *M. viscifolia*, a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/mL) y se compararon con una curva de calibración realizada con Trolox (análogo de la vitamina E). Ninguno de los extractos evaluados presentó actividad frente al radical ABTS•⁺ utilizado en este ensayo.

Correlación entre el contenido de FT y F, y la actividad antioxidante

Con los resultados del contenido de FT, F y los de actividad antioxidante (Ensayo de decoloración de DPPH y FRAP), se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson utilizando SPSS. Los valores obtenidos se muestran en la siguiente **Tabla IV-3**.

Tabla IV-3: Correlación entre la actividad antioxidante, medida con los métodos de DPPH y FRAP, y el contenido de FT de los frutos de *Maytenus viscifolia*.

	FT (mg EAG/100 g frutos)
DPPH (100 µg/mL) ¹	0,989 [*]
FRAP (500 µg/mL) ²	0,964 [*]
FRAP (1000 µg/mL) ²	0,976 [*]

*Significativo a p=0,01

^{1,2}Valores de actividad antioxidante expresados en: % Decoloración de DPPH y mg EAG/100 g frutos (FRAP)

El coeficiente de correlación de Pearson es una medida de asociación lineal. Por esto es que a partir de los valores cercanos a uno que se obtienen en este análisis se puede decir que los compuestos fenólicos que componen los frutos de *M. viscifolia* son los responsables de la actividad antioxidante mostrada, ya que todos los coeficientes de correlación de Pearson resultaron mayores a 0,95. El análisis de correlación entre la

actividad antioxidante y los F, no presentó valores que relacionen linealmente estas variables.

Existen trabajos en la literatura en los que se evidencia la presencia de metabolitos con posibles propiedades biológicas presentes en hojas de *Maytenus* spp, principalmente flavonoides, triterpenos, y sesquiterpenos. También se ha demostrado la presencia de varios tipos de flavonoles 3-O-glucósidos, como rutina, quercitrina, hiperósido, isoquercitrina y kaempferol, además, mono-, di-, tri- y tetra-glucósidos de quercetina (Vilegas et al, 1999; Leite et al, 2001). También se han aislado compuestos fenólicos de *M. senegalensis* (Hussein et al, 1999), se han identificado flavonoles en hojas de *M. ilicifolia* y *aquafolium* (Tiberti et al, 2007). Por otro lado, en trabajos recientes se muestra una actividad antioxidante significativa, evaluada por diferentes ensayos, en comparación con el antioxidante estándar ácido ascórbico, de las hojas de *Maytenus emarginata* (Gupta y Sharma, 2012).

De acuerdo con esta información, la especie *Maytenus viscifolia* presentaría una actividad antioxidante moderada, con respecto a las otras especies de *Maytenus*.

Caracterización de los compuestos fenólicos mayoritarios por CL-ESI-MS/MS y por CL-ESI-TOF-MS.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis de contenido de FT, F y AT, como así también, la actividad antioxidante moderada que mostraron los frutos de *M. viscifolia*, es que se consideró innecesaria la caracterización de los compuestos fenólicos mayoritarios.

Determinación del contenido de ácidos grasos

El contenido de ácidos grasos se analizó en el EEP y para su análisis se aplicó CG como se describió en el capítulo II Materiales y métodos. El análisis mostró que estos frutos poseen un 5 % de aceite, del cual un 75 % está representado por ácidos grasos insaturados (UFA). Mientras que aproximadamente el 44 % son ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), principalmente ácido linoléico (42,9 %), un 31 % está constituido por ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), mayoritariamente por ácido oleico (30,9 %). El contenido de ácidos grasos saturados (SFA) fue del 25 % aproximadamente, fue mayoritario el ácido palmítico (20,5 %). El contenido de ácidos grasos mayoritarios se presenta en el **Gráfico IV-2**, en la **Tabla IV-4** se muestra el perfil completo de ácidos grasos en los frutos de *Maytenus viscifolia*.

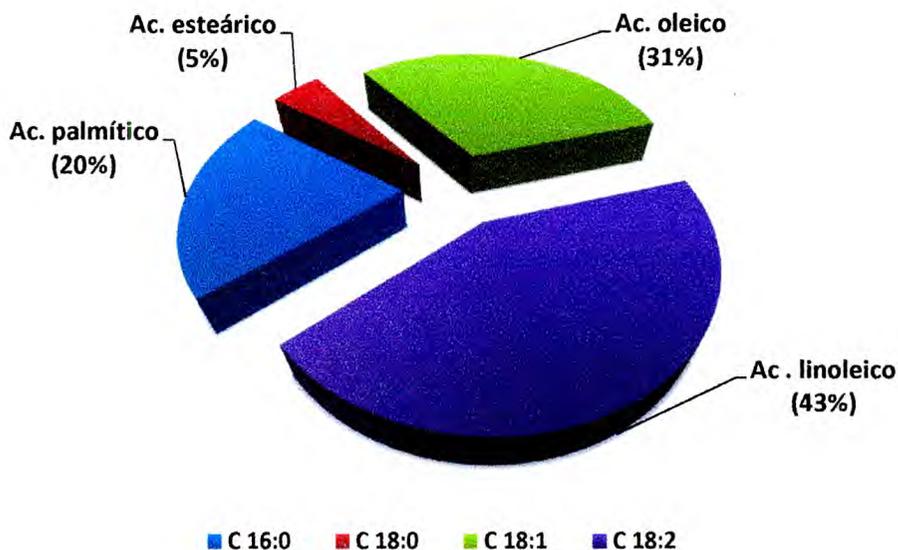


Figura IV-2: composición de ácidos grasos mayoritarios del aceite de los frutos de *M. viscifolia*, determinados por CG por comparación de los tiempos de retención (TR) con compuestos de referencia.

ÁCIDO GRASO	%
ácido palmítico (C 16:0)	20,47 ± 2,24
ácido margárico (C 17:0)	0,05 ± 0,09
ácido esteárico (C 18:0)	4,67 ± 1,10
ácido araquídico (C 20:0)	0,09 ± 0,16
ácido palmitoleico (C 16:1)	0,08 ± 0,08
ácido oleico (C 18:1)	30,88 ± 1,24
ácido galodeico (C 20:1)	0,08 ± 0,13
ácido linoleico (C 18:2)	42,92 ± 2,51
ácido linolénico (C 18:3)	0,76 ± 0,23

Tabla IV-4: Perfil de ácidos grasos de los frutos de *M. viscifolia*. Los valores se expresan como % (media ± desviación estándar de tres repeticiones).

A partir de los resultados obtenidos, se obtuvo la relación oleico/linoleico (O/L), ésta fue igual a 0,72; el índice de yodo (IY) igual a 107,78, mientras que la relación de ácidos grasos polinsaturados/saturados (S/I) fue igual a 1,73. Estos parámetros son indicadores de la estabilidad de un aceite, por lo tanto con los resultados obtenidos, el aceite de frutos de *M. viscifolia* se clasificaría como un aceite “semisecante”, por su IY >100 (107,78). Este valor junto con el valor de PUFA/SFA (1,73), muestran que el grado de insaturación es mayor que en otro tipo de aceites con características de secantes. Además, el valor de O/L (<1) indica que el contenido de ácido oleico es mayor, por lo que la estabilidad del aceite de estos frutos sería baja.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en un estudio publicado en 2012, acordó que la sustitución de SFA por PUFA

disminuye el riesgo de enfermedad coronaria (CHD); basándose en los datos obtenidos en estudios epidemiológicos y ensayos clínicos controlados sobre la morbilidad y mortalidad en la CHD (utilizando accidentes cardiovasculares y muerte). Además, en la misma publicación convinieron que la sustitución de hidratos de carbono por MUFA aumenta la concentración del colesterol de las HDL (colesterol “bueno”).

El perfil de los ácidos grasos de los frutos de *M. viscifolia*, que muestra como mayoritarios a los PUFA y MUFA, indica que resultarían promisorios para ser utilizados como aditivos alimentarios, y aportar efectos saludables.

Contenido Mineral

Los frutos de *M. viscifolia* pulverizados se utilizaron para analizar el contenido mineral. Como control, se utilizó un material de referencia certificado, como se describe en el capítulo II, Materiales y métodos. Los resultados se presentan en la **Tabla IV-5** y se expresan en $\mu\text{g/g}$ de fruto.

Tabla IV-5: Contenido mineral en los frutos de *M. viscifolia*, expresado en $\mu\text{g/g}$ de fruto.

Mineral	$\mu\text{g/g}$ fruto	<LOD	<LOQ
K	23941,23 \pm 2428,15	3,785	11,286
Na	4446,44 \pm 611,08	5,414	15,452
Ca	3251,18 \pm 409,25	0,118	0,355
Mg	1305,83 \pm 162,65	3,27	9,809
Zn	837,86 \pm 807,33	0,018	0,076
Fe	71,03 \pm 19,74	0,413	1,24
Sr	27,83 \pm 2,63	0,0005	0,003
B	18,32 \pm 3,32	0,393	1,232
Cu	12,59 \pm 0,90	0,020	0,075
Mn	9,73 \pm 0,77	0,041	0,12
Pb	6,10 \pm 0,74	0,002	0,005
Ni	4,24 \pm 3,92	0,073	0,101
Rb	3,65 \pm 0,26	0,002	0,007
As	2,85 \pm 1,25	0,052	0,154
Li	2,31 \pm 0,14	0,018	0,067
Ba	1,26 \pm 0,25	0,015	0,048
Ag	0,11 \pm 0,04	0,005	0,008
Cd	0,07 \pm 0,02	0,003	0,004
Al	< LOQ	10,585	31,756
V	< LOQ	0,119	0,356
Cr	< LOQ	0,048	0,144
Co	< LOQ	0,062	0,186
Ga	< LOQ	0,074	0,222
Se	< LOQ	0,047	0,121
Mo	< LOQ	0,045	0,116
Tl	< LOQ	0,003	0,004
Be	< LOD	0,008	0,01
Bi	< LOD	0,003	0,007

Valores expresados como la media \pm desviación estándar ($n=3$). LOD y LOQ ($\mu\text{g/g}$)

Se evaluaron veintiocho minerales, de los cuales, dieciocho estuvieron por encima del límite de detección: K, Na, Ca, Mg, Zn, Fe, Sr, B, Cu, Mn, Pb, Ni, Rb, As, Li, Ba, Ag y Cd. Los minerales mayoritarios obtenidos a partir de estos frutos fueron: K, Na, Ca, Mg, Zn y Fe. La composición de K fue considerablemente mayor con respecto a los demás minerales su concentración fue $> 23900 \mu\text{g/g}$, y representa un 70,5 % del contenido total de minerales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el aumento de la ingesta de potasio reduce la presión sistólica y diastólica en adultos. Además, una mayor ingesta de potasio se asocia con un menor riesgo de accidente cerebrovascular (OMS, 2012), por lo que se sugiere una ingesta de potasio de al menos 90 mmol/día (3510 mg/día) para los adultos. Los frutos de *M. viscifolia* presentan un contenido considerable de K (aproximadamente 24000 mg/100 g de frutos), lo que los categoriza como una potencial fuente de este mineral, para ser utilizados como aditivos alimentarios.

El sodio y el calcio están presentes en cantidades menores, 13,1 y 9,6 %, respectivamente, respecto del total. En menor cantidad se presentaron magnesio, cinc e hierro; sus valores representan 3,8; 2,5 y 0,21 %, respectivamente, respecto al contenido mineral total. La presencia de Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, y Mn, es relevante, estos minerales son considerados como importantes dentro de los requerimientos nutricionales en la ingesta diaria por el Código Alimentario Argentino (CAA). Estos resultados indican que los frutos de *M. viscifolia* serían una buena fuente de minerales desde el punto de vista nutricional, lo que podría otorgarles un valor agregado para ser utilizados como aditivos alimenticios.

CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que los frutos de *Maytenus viscifolia* Griseb., presentan una composición moderada de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas. Asimismo, presentaron una actividad antioxidante limitada, para los métodos aplicados.

El perfil de ácidos grasos del aceite de estos frutos y el contenido mineral, obtenidos en este estudio de los frutos de *M. viscifolia*, son los parámetros que aportarían más beneficios en el caso de utilizarlos como aditivos alimentarios, de esta manera generar el uso sustentable de esta especie.

Este trabajo contribuye a otorgar valor agregado a frutos de especies autóctonas de la Provincia de San Juan, tendiendo a hacer uso responsable de la flora con fines beneficiosos para la salud del ser humano.

Capítulo V

FRUTOS DE

***Zuccagnia punctata* Cav.**



INTRODUCCIÓN

El uso de drogas vegetales para curar males y enfermedades, o bien para reducir los síntomas y trastornos que algunas provocan, no es un hecho reciente, sino que, muy por el contrario, su uso se remonta a la prehistoria y sin duda ha sido una alternativa ampliamente difundida a través del tiempo y muy presente en la mayoría de las culturas. La industria farmacéutica actual, apoyada por los avances tecnológicos, se ha basado con frecuencia en estos usos y conocimientos tradicionales a la hora de elaborar y sintetizar parte de los fármacos que se producen. Este proceso continúa vigente actualmente, con nuevos aportes y aplicaciones de utilidad en el tratamiento de patologías nuevas o preexistentes (Vicente-Herrero y col., 2013).

Newman y Cragg (2012), en su revisión sobre nuevos medicamentos provenientes de productos naturales en los últimos 30 años, indican que casi el 50% de los nuevos medicamentos, introducidos durante este período, tiene su origen en un producto natural. En el área del tratamiento contra el cáncer, por ejemplo, desde la década de 1940 hasta la fecha, de las 175 moléculas pequeñas, 131 son de origen totalmente sintético y 85 son productos naturales directamente o derivados de ellos.

Las principales fuentes de los antioxidantes naturales estudiados son las frutas y verduras, semillas, cereales, vino, té, bulbos, aceite de oliva y hierbas aromáticas. Además, se ha prestado especial atención a la identificación y la evaluación del efecto antioxidante en los productos agrícolas, los productos étnicos y tradicionales, té de hierbas, aceites de semillas prensados en frío, exudado de resinas, productos de hidrólisis, y otras materias primas ricas en polifenoles antioxidantes que tienen importancia nutricional y/o potenciales aplicaciones para la promoción de la salud y la prevención contra los daños causados por los radicales libres (Dimitrios, 2006). Las últimas décadas se han caracterizado por un creciente interés de los consumidores, la

industria alimentaria y los investigadores, en la evaluación de las diferentes formas de mejorar la salud humana, principalmente mediante el consumo de alimentos, ya sea naturales o de origen humano. Hasta ahora, el desarrollo de alimentos funcionales, nutracéuticos, alimentos de diseño, alimentos terapéuticos, súper alimentos o alimentos medicinales parecen tener un rol importante en los hábitos alimentarios actuales (Fabani y col., 2013).

Los aspectos antes mencionados, y la necesidad de nuevas fuentes de compuestos antioxidantes de origen natural, así como también el aprovechamiento de los recursos renovables disponibles, llevaron a realizar este trabajo, y estudiar las propiedades y presencia de compuestos naturales con efecto antioxidante en los frutos de la especie *Zuccagnia punctata* Cav. hasta ahora inexplorados, que es usada como medicinal y crece naturalmente en una amplia región geográfica del noroeste argentino, tanto en llanuras como montañas desde los 700 a los 2700 m.s.n.m, aproximadamente.

Esta especie ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional en Argentina para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas, el asma, la artritis y el reumatismo (Ratera y Ratera, 1981; Toursarkissian, 1980). Además, existen diversos trabajos en los que se informan sus propiedades antioxidantes (Morán Vieyra y col., 2009), antibacterianas (Zampini y col., 2005), antifúngicas (Quiroga y col., 2001; Svetaz y col., 2004, 2007; Agüero y col., 2010); antiulcerosas (De la Rocha y col., 2003) y antígenotóxicas (Zampini y col., 2008). Además se han identificado los constituyentes presentes en hojas y tallos de *Z. punctata*, los que incluyen moléculas tales como los flavonoides (flavonas, flavanonas, chalconas) y ésteres de cafeoilo (Pederiva y col., 1975; Pederiva y Giordano, 1984; Svetaz y col., 2004; Agüero y col., 2010).

Zuccagnia punctata Cav., es una especie monotípica de la flora xerófila de la Provincia Biogeográfica del Monte (Salta, Tucumán, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza,

San Luis y tal vez Jujuy). Crece en cerros y llanos entre los 700 – 2700 m. s. n. m. Florece desde agosto a marzo y fructifica de noviembre a abril (Ulibarri, 2005). Por su extensa distribución fitogeográfica, anualmente, se producen miles de toneladas de frutos que no son explotados ni aprovechados, al mismo tiempo que hasta la actualidad no se encontraron estudios sobre sus propiedades como antioxidantes y/o la composición de ellos.

Todo lo expuesto anteriormente, justifica la propuesta para evaluar el potencial antioxidante y la composición química que los frutos de *Z. punctata* podrían presentar, con el fin de otorgarle un valor agregado, para su potencial uso como suplementos dietarios, en la industria alimenticia o en la industria cosmética.

Parte A

Determinación de:

Fenólicos Totales

Flavonoides

Antocianinas Totales

Caracterización y Cuantificación de compuestos fenólicos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para presentar los resultados obtenidos a partir de los frutos de *Z. punctata* se muestra a continuación, un esquema a modo general de la metodología que se utilizó para el tratamiento de los frutos:

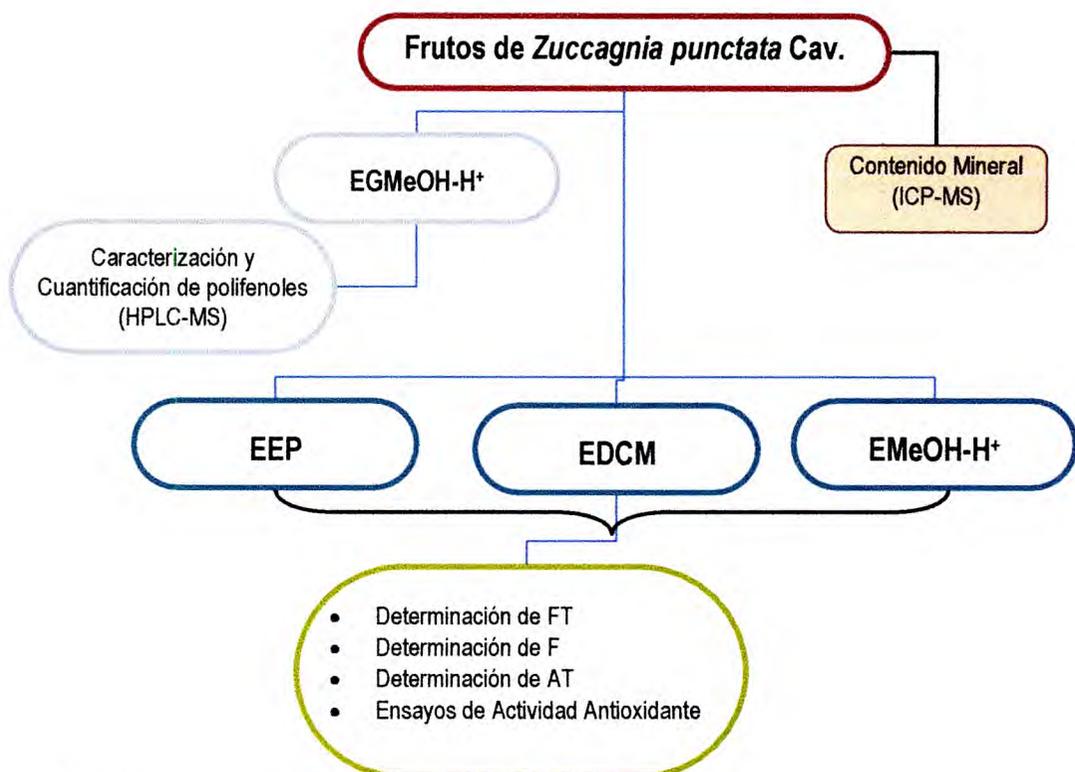


Figura V-1: Esquema del tratamiento de los frutos de *Z. punctata*

Los extractos seriados de los frutos de cada sitio de colecta se prepararon de acuerdo a lo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. Se obtuvieron los extractos éter de petróleo (EEP), diclorometano (EDCM) y metanol ácido (EMeOH-H⁺). En estos extractos se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos totales, de flavonoides, y la actividad antioxidante. Adicionalmente se analizó el perfil de ácidos grasos en los extractos de éter de petróleo (EEP). Con el extracto metanólico ácido (EGMeOH-H⁺), obtenido directamente a partir de los frutos se utilizó para identificar y cuantificar los

compuestos fenólicos. Los rendimientos respecto al material de partida se presentan en la **Tabla V-1**.

Tabla V-1: Rendimiento porcentual de extractos seriados de los frutos de *Zuccagnia punctata*

Lugar de colecta	Rendimiento % (g extracto/100 g fruto)		
	EEP	EDCM	EMeOH-H ⁺
Bauchaceta	1,50 ± 0,96 ^a	1,08 ± 0,03 ^a	18,41 ± 1,67 ^a
Hualilán	1,20 ± 0,30 ^a	0,93 ± 0,87 ^a	21,06 ± 4,90 ^a
Ullum	1,71 ± 0,81 ^a	1,00 ± 0,08 ^a	17,32 ± 2,45 ^a

Los rendimientos se presentan como la media ± desviación estándar ($n = 3$)

El EMeOH-H⁺ fue el que presentó el mayor rendimiento porcentual para los tres sitios de colecta (17,32 a 21,06 % g extracto/100 g fruto). Los otros extractos mostraron rendimientos del orden del 1 % aproximadamente para las tres zonas de colecta.

Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y antocianinas totales

En los EEP, EDCM y EMeOH-H⁺ de los frutos de *Z. punctata*, se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (FT) y de flavonoides (F). Por otra parte, el contenido de antocianinas, expresadas como antocianinas totales (AT), se determinó en el EMeOH-H⁺. En el siguiente gráfico (**Figura V-1**), se presentan los resultados expresados como mg de Equivalentes de Acido Gálico (EAG) por cada 100 g de frutos, en los extractos seriados de los frutos para los tres sitios de colecta.

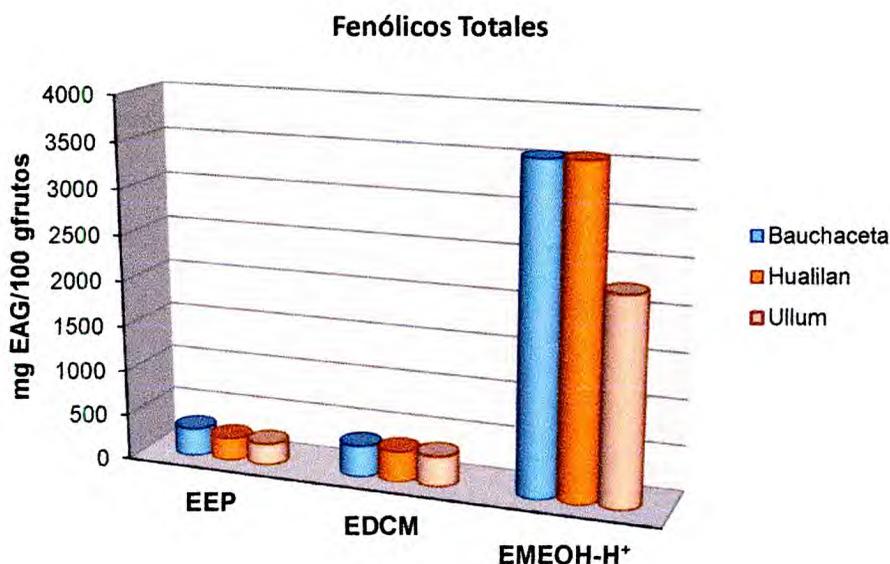


Figura V-2: Contenido de FT de los EEP, EDCM y EMeOH-H⁺ de Bauchaceta, Hualilán y Ullum, expresados en mg EAG/100 g de frutos de *Z. punctata*. Los datos se presentan como la media de tres réplicas.

El análisis estadístico de los datos obtenidos, mediante el test de Tukey ($p < 0,05$), indicó que en los extractos de los tres sitios de colecta no se presentaron diferencias significativas. Los EMeOH-H⁺ mostraron mayor contenido de FT. Los correspondientes a Bauchaceta y Hualilán fueron mayores que los de Ullum, pero no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores obtenidos fueron entre 2,20 y 3,60 g EAG/100 g de frutos. El elevado contenido de polifenoles en estos frutos, por encima de 2 g cada 100 g de frutos, los categoriza como un producto de importancia, considerando que este tipo de compuestos puede participar en el sistema de defensa antioxidante, sumado a que se considera que los polifenoles tienen un rol preponderante para la prevención y el tratamiento de enfermedades crónicas y degenerativas (Fabani y col., 2013). Si se comparan estos resultados con el contenido

de compuestos fenólicos informados por Zhao y Hall (2008) en extractos de pasas de uva (375 – 367 mg EAG/100 g), otro tipo de fruto comestible, que se recomienda en las dietas para prevenir y mantener un estado saludable, los resultados obtenidos indican que los frutos de *Z. punctata* son una fuente de polifenoles independientemente del sitio de colecta y constituyen un recurso renovable de antioxidantes naturales de interés.

Con respecto al análisis del contenido de flavonoides para las muestras estudiadas, a continuación, en la **Tabla V-2** se presentan los resultados obtenidos.

Tabla V-2: Contenido de F y de AT en los extractos de los frutos de *Z. punctata* según los sitios de colecta.

Sitios	F (mg EQ/100 g frutos)			AT (mg cian. 3-gluc/100 g extracto)
	EEP	EDCM	EMeOH-H ⁺	EMeOH-H ⁺
	Bauchaceta	201,33 ± 27,70 ^a	125,39 ± 9,85 ^a	121,44 ± 13,15 ^b
Hualilán	300,81 ± 53,60 ^a	180,09 ± 18,44 ^b	231,05 ± 46,89 ^a	0,21 ± 0,07
Ullum	243,38 ± 91,57 ^a	165,22 ± 25,68 ^a	204,25 ± 18,78 ^c	0,02 ± 0,01

Los resultados se expresan como la media ± DE (desviación estándar) de tres determinaciones, **F**: en mg de Equivalentes de Quercetina (EQ) por 100 g de frutos y **AT**: en mg de cianidina 3-glucósido por 100 g de EMeOH-H⁺. Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas ($n = 3$, Tukey $P < 0,05$).

El contenido mayor de flavonoides se presentó en los EEP, para los tres sitios de colecta (200 – 300 mg EQ/100 g frutos) y no se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$), a continuación el contenido de flavonoides en EMeOH-H⁺ con concentraciones de 121 a 231 mg EQ/100 g frutos, en este extracto, se presentaron diferencias significativas según el sitio de colecta. Por último, en el extracto de polaridad media, EDCM, se presentó el menor contenido F, cuando se compararon respecto a los sitios de colecta, los frutos colectados en Hualilán presentaron diferencias significativas respecto a Ullum y Bauchaceta.

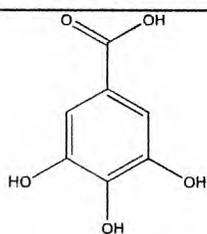
Los frutos maduros de *Z. punctata* presentan color pardo rojizo, en los EMeOH-H⁺ se cuantificó el contenido de antocianinas totales (AT) según se describe en el Capítulo II. Los frutos de Bauchaceta presentaron el mayor contenido de AT con valores de 0,41 ± 0,04 (expresado en mg cianidina 3-glucósido/100 g EMeOH-H⁺), comparados con los otros sitios de colecta. Estos valores fueron el doble que los encontrados en los frutos de Hualilán y veinte veces mayor que en los frutos de Ullum. Los frutos estudiados se colectaron de tres zonas de la provincia de San Juan, claramente diferenciadas por la altura: Ullum (700 m.s.n.m.), Hualilán (1800 m.s.n.m.) y Bauchaceta (2600 m.s.n.m.) incluidas las condiciones edáficas y climáticas particulares (precipitaciones, radiación, amplitud térmica). La variación del contenido de AT, podría tener relación con la diferencia de altura o la influencia de las condiciones climáticas en cada sitio, mayor altura, mayor radiación, temperaturas extremas, que probablemente podrían inducir cambios fisiológicos en la planta que generan una respuesta de este tipo. Al respecto Larson (1988) sugiere que la concentración de compuestos fenólicos incrementa con la altitud, como así también que especies que poseen coloración rojiza presentan alta resistencia a la radiación UV-B en ciertos ecosistemas. Además, estos resultados son de importancia, ya que las antocianinas son flavonoides que presentan actividad antioxidante, por lo que desempeñan un papel vital en la prevención de enfermedades con implicancia neuronal y cardiovascular, cáncer y diabetes, entre otras (Konczak y Zhang, 2004).

Caracterización y Cuantificación de compuestos fenólicos por CL-ESI-MS/MS y por CL-ESI-TOF-MS

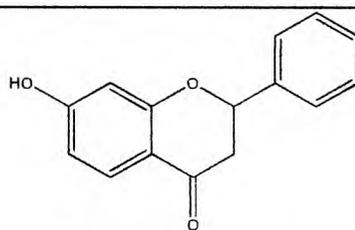
Se analizaron los EEP, EDCM y EMeOH-H⁺ (obtenidos según se describió en materiales y métodos) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC/ESI-MS/MS). Se realizó la caracterización y para la cuantificación se utilizaron estándares de referencia y los compuestos aislados previamente de la

especie *Z. punctata* (Svetaz y col., 2007 y Agüero y col., 2010). En la **Figura V-2** se presenta la estructura de los 15 compuestos caracterizados: Ácido gálico (1), Catequina (2), Eriodictiol-O-hexósido (3), Isoquercetina (4), Eriodictiol (5), Quercetina (6), Naringenina (7), Apigenina (8), Kaempferol (9), 7-hidroxi-flavanona (10), Pinocembrina (11), Crisina (12), Galangina (13), 2', 4'-dihidroxichalcona (14) y 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (15). Diez de los quince compuestos (compuestos: 1 – 9 y 12), fueron caracterizados por primera vez en esta tesis como constituyentes de los frutos de *Z. punctata*.

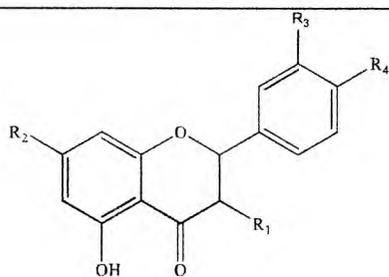
Figura V-3: Estructura de los compuestos caracterizados en los EEP, EDCM y EGMeOH-H⁺ de los frutos de *Z. punctata*.



Ácido gálico (1)

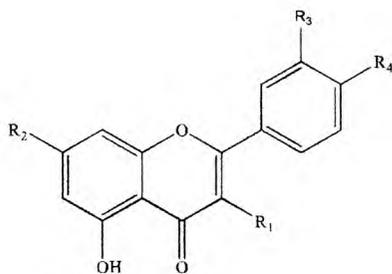


7-hidroxi flavanona (10)



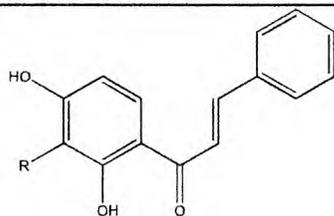
- Catequina (2)
- Eriodictiol-O-hexósido (3)
- Eriodictiol (5)
- Naringenina (7)
- Pinoцемbrina (11)

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
OH	OH	OH	OH
H	hexósido	OH	OH
H	OH	OH	OH
H	OH	H	OH
H	OH	H	H



- Isoquercetina (4)
- Quercetina (6)
- Apigenina (8)
- Kaempferol (9)
- Crisina (12)
- Galangina (13)

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Glu	OH	OH	OH
OH	OH	OH	OH
H	OH	H	OH
OH	OH	H	OH
H	OH	H	H
OH	OH	H	H



- 2',4'-dihidroxi chalcona (14)
- 2',4'-dihidroxi-3'-metoxi chalcona (15)

R
H
OCH ₃

A continuación en **Tabla V-3** y **Tabla V-4** se presenta el contenido de todos los compuestos caracterizados expresados en $\mu\text{g/g}$ fruto. El compuesto mayoritario fue la 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (**15**) en los EGMeOH-H⁺ de los frutos en los tres sitios de colecta (1045 a 1275 $\mu\text{g/g}$ de fruto) y no hubo diferencias significativas entre ellos. Por otra parte, en el orden de concentración le siguió la 2', 4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (**14**) en los EGMeOH-H⁺ y fue significativamente mayor en los frutos de Hualilán y Bauchaceta (899 y 852 $\mu\text{g/g}$ de fruto, respectivamente).

Adicionalmente, la 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (**15**) también fue mayoritario en los EEP y EDCM de las muestras de Ullúm. Su concentración fue significativamente mayor que en los frutos colectados en Bauchaceta y Hualilán (689 y 120 $\mu\text{g/g}$ de fruto, respectivamente).

Tabla V-3: Contenido de los compuestos caracterizados en los extractos de los frutos de *Z. punctata*. Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar del contenido de los polifenoles, expresados en $\mu\text{g/g}$ fruto.

Compuesto	BAUCHACETA			HUALILAN			ULLUM		
	EEP	EDCM	EGMeOH-H ⁺	EEP	EDCM	EGMeOH-H ⁺	EEP	EDCM	EGMeOH-H ⁺
1	0	0	21,90 \pm 3,45 ^{ab}	0	0	8,13 \pm 3,38 ^a	0	0	32,05 \pm 5,81 ^b
2	0	0	34,12 \pm 6,31 ^b	0	0	1,83 \pm 0,95 ^a	0	0	0 ^a
3	0	0	0,41 \pm 0,10 ^a	0	0	9,49 \pm 2,43 ^b	0	0	0 ^a
4	0	0	18,58 \pm 2,42 ^a	0	0	23,45 \pm 4,38 ^a	0	0	12,81 \pm 4,56 ^a
5	0 ^a	2,74 \pm 0,08 ^b	108,73 \pm 6,75 ^b	1,48 \pm 0,01 ^b	1,80 \pm 0,02 ^a	15,73 \pm 2,95 ^a	0 ^a	1,86 \pm 0,08 ^a	0,04 \pm 0,01 ^a
6	0	0,07 \pm 0,01 ^b	3,31 \pm 0,57 ^a	0	0 ^a	15,36 \pm 2,52 ^a	0	0 ^a	0,54 \pm 0,07 ^a
7	0 ^a	3,04 \pm 0,08 ^b	122,09 \pm 7,47 ^b	1,66 \pm 0,01 ^b	2,00 \pm 0,03 ^a	19,63 \pm 4,87 ^a	0 ^a	2,08 \pm 0,09 ^a	43,38 \pm 12,63 ^a

1: Ácido gálico, **2:** Catequina, **3:** Eriodictiol-O-hexósido, **4:** Isoquercetina, **5:** Eriodictiol, **6:** Quercetina, **7:** Naringenina

Los resultados fueron analizados mediante ANOVA para valores de $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los sitios de recolección para cada compuesto, letras iguales indican que no hay diferencias significativas a $p < 0,05$.

Tabla V-4: Contenido de los compuestos caracterizados en los extractos de los frutos de *Z. punctata*. Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar del contenido de los polifenoles, expresados en $\mu\text{g/g}$ fruto.

Compuest o	BAUCHACETA			HUALILAN			ULLUM		
	EEP	EDCM	EGMeOH-H ⁺	EEP	EDCM	EGMeOH-H ⁺	EEP	EDCM	EGMeOH-H ⁺
8	0	0,23 \pm 0,01 ^b	2,67 \pm 0,48 ^a	0	0 ^a	5,05 \pm 1,92 ^b	0	0 ^a	2,36 \pm 0,55 ^a
9	0 ^a	1,58 \pm 0,03 ^b	5,56 \pm 0,56 ^a	0,28 \pm 0,04 ^b	0,33 \pm 0,01 ^a	85,07 \pm 8,60 ^b	0 ^a	0,33 \pm 0,04 ^a	3,79 \pm 0,65 ^a
10	18,38 \pm 1,83 ^a	11,09 \pm 0,60 ^a	192,13 \pm 24,88 ^a	31,28 \pm 0,77 ^b	19,87 \pm 1,07 ^b	157,29 \pm 41,36 ^a	43,62 \pm 2,94 ^c	27,95 \pm 1,15 ^c	195,92 \pm 10,04 ^a
11	0 ^a	11,95 \pm 0,01 ^b	75,07 \pm 28,86 ^a	4,68 \pm 0,08 ^b	29,32 \pm 0,87 ^c	78,94 \pm 8,49 ^a	5,55 \pm 0,37 ^b	4,57 \pm 0,47 ^a	99,31 \pm 5,32 ^a
12	0 ^a	1,08 \pm 0,17 ^b	0 ^a	2,57 \pm 0,18 ^b	4,79 \pm 0,20 ^c	8,86 \pm 1,05 ^b	0 ^a	0 ^a	13,41 \pm 4,81 ^b
13	0 ^a	17,41 \pm 0,14 ^b	163,71 \pm 10,36 ^b	10,65 \pm 0,14 ^c	12,15 \pm 0,37 ^a	113,10 \pm 27,34 ^a	1,79 \pm 0,12 ^b	11,21 \pm 0,23 ^a	122,03 \pm 31,24 ^a
14	5,38 \pm 0,90 ^a	53,22 \pm 0,06 ^a	851,96 \pm 117,47 ^b	45,71 \pm 0,18 ^b	83,32 \pm 5,60 ^b	898,61 \pm 140,62 ^b	49,06 \pm 3,30 ^b	47,16 \pm 1,16 ^a	473,19 \pm 20,11 ^a
15	49,72 \pm 6,33 ^a	8,54 \pm 1,88 ^a	1226,18 \pm 149,45 ^a	183,27 \pm 3,20 ^b	1,95 \pm 0,98 ^a	1045,20 \pm 196,37 ^a	689,53 \pm 46,44 ^c	120,02 \pm 9,39 ^b	1274,95 \pm 55,60 ^a

8: Apigenina, **9:** Kaempferol, **10:** 7-hidroxi flavanona, **11:** Pinocebrina, **12:** Crisina, **13:** Galangina, **14:** 2', 4'-dihidroxichalcona, **15:** 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona.

Los resultados fueron analizados mediante ANOVA para valores de $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los sitios de recolección para cada compuesto, letras iguales indican que no hay diferencias significativas a $p < 0,05$.

Los compuestos **10**, **11**, **13-15** caracterizados y cuantificados en los frutos de *Z. punctata* han sido previamente informados por Agüero y col. (2010) como constituyentes de las partes aéreas de *Z. punctata*. Por otra parte, Svetaz y col. (2007) informaron la actividad antifúngica de las chalconas **14** y **15** aislados de *Z. punctata*, colectada en el departamento Iglesia de la Provincia de San Juan. Los compuestos **1-9** y **12** presentes en los frutos se informan por primera vez como constituyentes en esta especie.

Estos resultados indican que los frutos de *Z. punctata* presentan compuestos de relevancia con propiedades antioxidantes, por lo que podrían ser utilizados y aprovechados como fuente de productos naturales bioactivos.

Parte B



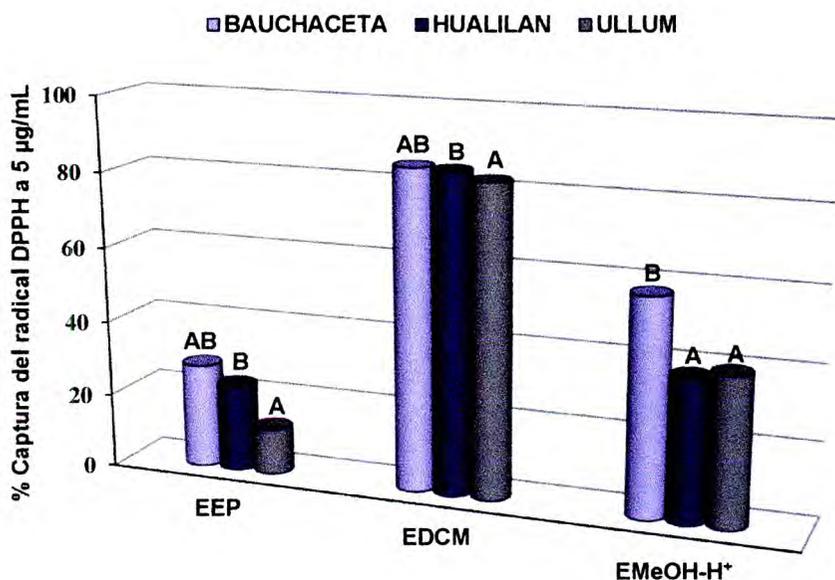
Actividad antioxidante

Evaluación de la actividad antioxidante

1. Ensayos *in vitro*

1.1. Actividad atrapadora del radical DPPH

La actividad atrapadora del radical DPPH de los extractos seriados EEP, EDCM y EMeOH-H⁺ de los frutos de *Z. punctata* para cada sitio de colecta se evaluó a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 µg/mL (Capítulo de Materiales y Métodos). Los resultados mostraron que todos los extractos fueron activos frente al radical DPPH. Los porcentajes de captura fueron 100% a 10, 50 y 100 µg/mL, mientras que a 5 µg/mL fueron menores al 90 %. A continuación en la **Figura V-2**, se presentan los resultados obtenidos para los extractos seriados de los sitios de colecta a 5 µg/mL.



Extracto	BAUCHACETA	HUALILAN	ULLUM
EEP	18,80 ± 4,34	24,60 ± 3,14	12,32 ± 1,77
EDCM	79,57 ± 3,92	88,07 ± 2,33	73,28 ± 4,82
EMeOH-H ⁺	69,03 ± 2,63	44,52 ± 8,93	39,68 ± 0,86

Figura V-4: Porcentaje de captura del radical DPPH de los EEP, EDCM y EMeOH-H⁺ de Bauchaceta, Hualilán y Ullum de los frutos de *Z. punctata*, a 5 µg/mL.

Los resultados fueron analizados mediante el test de Tukey, para valores de $p < 0,05$. Letras

diferentes indican diferencias significativas entre los sitios de colecta para los extractos, letras iguales indican que no hay diferencias significativas a $p < 0,05$.

En las tres poblaciones el EDCM fue el más efectivo en capturar el radical DPPH, los valores se presentaron entre 73 y 88 %, y el más activo correspondió a los frutos de Hualilán. Mientras que los EMeOH-H⁺ de los tres sitios, mostraron un efecto moderado (39 y 69 %) a 5 µg/mL.

El análisis estadístico de los datos muestra que el extracto más activo, para los tres sitios de colecta fue el EDCM. Mientras que los frutos de Hualilán presentó mayor capacidad de captura del radical DPPH (> 88%) y mostró diferencia significativa respecto a los otros dos EDCM Bauchaceta (79,6%) y Ullum (73,3%).

Además, para todas las concentraciones ensayadas, los EEP y EMeOH-H⁺ de los frutos colectados en Bauchaceta fueron los más activos. Esto permite inferir que los extractos de los frutos bajo estudio fueron muy activos a 5 µg/mL.

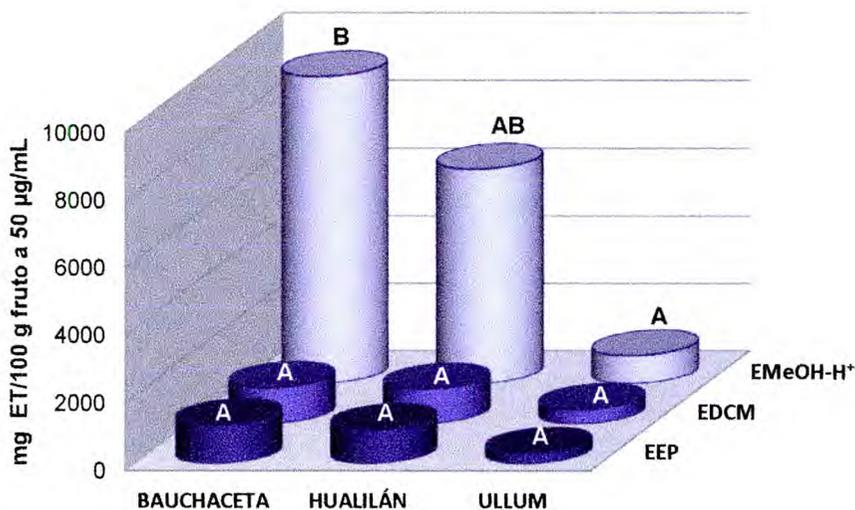
El poder de captura del radical del EDCM mostrado, podría deberse al contenido de F que presentaron los frutos de los tres sitios de colecta. La composición química de los frutos justificaría la capacidad antioxidante que presentan, ya algunos de los compuestos mayoritarios identificados y cuantificados en este estudio (7-hidroxiflavanona, 2',4'-dihidroxichalcona), los que se han informado como captadores de radicales como DPPH•, ABTS^{•+} y O₂^{•-} (Morán Vieyra y col., 2009).

1.2. Ensayo TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox)

Este método, junto al ensayo FRAP, se basan en reacciones de transferencia de electrones. La capacidad antioxidante de los extractos de los frutos de *Z. punctata* se determinó por la capacidad de atrapar el radical ABTS^{•+} expresado como la actividad antioxidante equivalente a Trolox. En la **Figura V-3** se presentan los resultados obtenidos con los extractos seriados de los frutos según los sitios de colecta, las

concentraciones ensayadas fueron 10, 50, 100, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. El análisis de los datos indicó que los EMeOH-H^+ correspondientes a los tres sitios de recolección fueron los más activos. Para realizar un estudio comparativo de los frutos entre los sitios de colecta se seleccionaron los resultados obtenidos a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$. Para el análisis estadístico se aplicó el test de Tukey para valores de $p < 0,05$, los extractos de los frutos de *Z. punctata* de polaridad baja y media (EEP y EDCM) no presentaron diferencias significativas entre los tres sitios de colecta. Respecto al análisis de la actividad del extracto polar, EMeOH-H^+ , el perteneciente a los frutos de Bauchaceta fue significativamente mayor ($> 9000 \text{ mg ET/100 g fruto}$), que el de Ullum, pero no presentó diferencias significativas respecto al extracto EMeOH-H^+ de los frutos de Hualilán el cual presentó un efecto considerable ($> 6300 \text{ mg ET/100 g fruto}$).

Estos resultados podrían estar relacionados con el elevado contenido de FT que presentes en los EMeOH-H^+ , para ambas muestras, los frutos de Bauchaceta y de Hualilán. Este potencial antioxidante podría atribuirse al contenido de compuestos caracterizados y cuantificados 7-hidroxi flavanona, 2',4'-dihidroxichalcona y 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona.



Extracto	BAUCHACETA	HUALILÁN	ULLUM
EEP	1138,27 ± 67,07	995,15 ± 90,51	307,75 ± 20,96
EDCM	1054,28 ± 116,96	1011,20 ± 94,06	416,91 ± 30,84
EMeOH-H ⁺	9078,67 ± 422,55	6350,75 ± 154,94	826,60 ± 38,60

Figura V-5: Resultados del ensayo TEAC de los EEP, EDCM y EMeOH-H⁺ de Bauchaceta, Hualilán y Ullum de los frutos de *Z. punctata*, a 50 µg/mL (en mg ET/100 g de frutos).

Los resultados fueron analizados mediante test de Tukey para valores de $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los sitios de recolección para cada extracto y letras iguales indican que no hay diferencias significativas a $p < 0,05$.

Ensayo del poder reductor del ión férrico (FRAP)

El poder reductor de los EEP, EDCM y EMeOH-H⁺ de los frutos en estudio, fue ensayado a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/mL), de acuerdo a lo descrito en el Capítulo II. Los resultados indican que todos los EMeOH-H⁺, independientemente del sitio de colecta, fueron los más activos para las concentraciones ensayadas. En la **Figura V-4** se presenta el análisis estadístico para 100 µg/mL expresados como mg EAG/100 g de frutos. El EMeOH-H⁺ de todas las muestras ensayadas fue el que presentó mayor poder reductor del Fe³⁺ a Fe²⁺.

Asimismo, los EMeOH-H⁺ de los frutos de Hualilán y Bauchaceta (2754 y 2577 mg EAG/100 g frutos, respectivamente) fueron los que mostraron mayor efecto y no presentaron diferencias significativas.

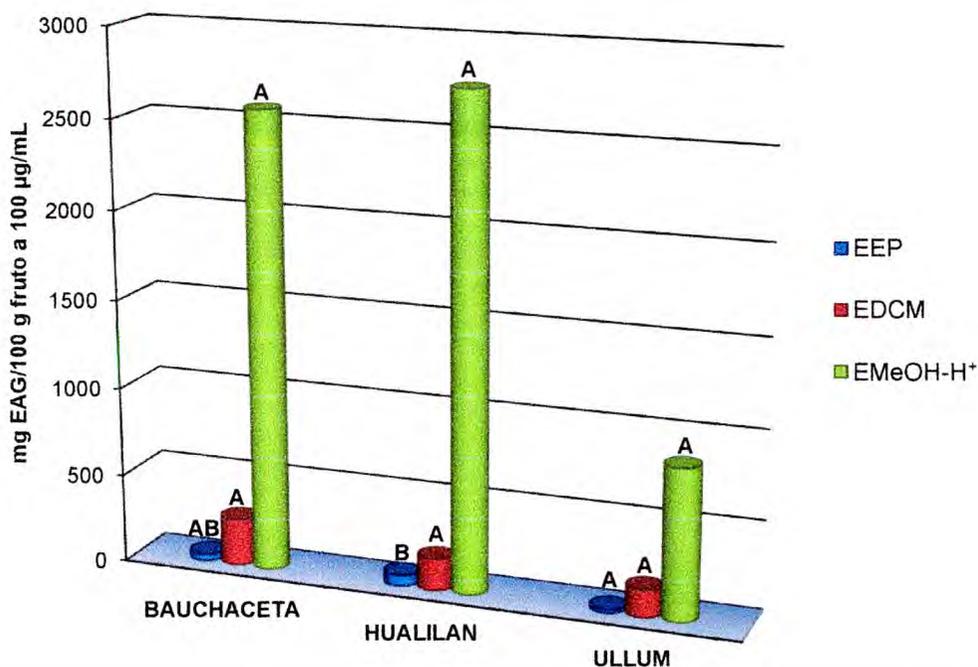


Figura V-6: Resultados del ensayo FRAP de los EEP, EDCM y EMeOH-H⁺ de los frutos de *Z. punctata*, de Bauchaceta, Hualilán y Ullum, a 100 µg/mL, expresados en mg EAG/100 g de frutos).

Los resultados fueron analizados mediante test de Tukey para valores de $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los sitios de recolección para cada extracto y letras iguales indican que no hay diferencias significativas a $p < 0,05$.

El poder reductor evidenciado por los EMeOH-H⁺ de los frutos de Hualilán y Bauchaceta estaría relacionado con el considerable contenido de FT, como así también el mayor contenido de AT.

Alonso-Amelot (2008), informó que de la gran diversidad de los metabolitos secundarios que producen las plantas, parte de ellos son aquellos implicados en los mecanismos de defensa frente al estrés abiótico (la radiación UV, elevada amplitud térmica, entre otros) y éstos poseen propiedades antioxidantes. En coincidencia con este autor, los frutos de *Zuccagnia punctata* presentaron elevada capacidad antioxidante, principalmente los frutos colectados en Bauchaceta y Hualilán, áreas geográficas con marcadas diferencias de altitud, exposición a la radiación y amplitud térmica. El análisis comparativo de los resultados de actividad antioxidante, conjuntamente con los metabolitos cuantificados e identificados, muestran evidencia que el estrés abiótico al que está sometida la especie (consecuentemente sus frutos) modifica la producción de metabolitos para protegerse de la producción de radicales libres que tales condiciones le generan. Esto constituye un efecto positivo para el aprovechamiento sustentable de estos frutos como materia prima para la producción sostenible de antioxidantes.

Parte C



Aporte nutricional:

Contenido de Ácidos Grasos

Contenido mineral

Determinación del contenido de ácidos grasos

El análisis del contenido de ácidos grasos se realizó en los EEP de los frutos de *Z. punctata*, mediante cromatografía gaseosa como se describió en el capítulo II. A continuación, en la **Tabla V-5** se presenta el contenido e identificación de los ácidos grasos presentes en los frutos de los tres sitios de colecta, no hubo diferencias significativas entre ellos. Cualitativamente, el contenido de ácidos grasos fue similar para los frutos de los diferentes sitios de colecta. El contenido de ácido oleico y palmítico fue entre 25 – 28 % y 25 – 27 %, respectivamente, éstos fueron mayoritarios en todos los frutos estudiados. Mientras que los ácidos grasos que se presentaron en orden siguiente fueron el ácido linoléico y araquídico. Por otra parte, el índice de Iodo (IY) que se obtuvo en los aceites de los frutos fue > 45 , esto indica que este aceite se clasificaría como secante con bajo grado de insaturación, coincidente con los valores que se presentaron para los distintos tipos de ácidos grasos, los ácidos grasos saturados (AGS): 54 %; ácidos grasos monoinsaturados (MUFA): 29 %, ácidos grasos poliinsaturados (AGPI): 16 %; aproximadamente. Este es el primer estudio del perfil de ácidos grasos en los frutos de *Z. punctata*, sus valores no son comparables con otros frutos similares, aunque en general, se observan diferencias respecto a lo informado en semillas de diferentes variedades de pasas (entre 11 – 14%), donde el contenido de AGS es considerablemente mayor (Fernandes y col., 2013). En el caso de AGMI, también resultan ser mayores que el de las semillas de las pasas (entre 14 – 21%). En cambio, para los AGPI, los porcentajes en las pasas (entre 63 – 73%) fueron considerablemente mayores que los de los frutos de *Z. punctata* (16 %). Además, la relación O/L fue de 2 aproximadamente, lo que indicaría que la cantidad de ácido oleico sería el doble a la del ácido linoléico; esto indica que el aceite de estos frutos presentaría una baja estabilidad.

Tabla V-5: Composición de ácidos grasos expresados en g/100g ácidos grasos del EEP de los frutos de *Z. punctata* (media \pm DE, $n = 3$)

Ácidos Grasos	Bauchaceta	Hualilán	Ullum
Ácido palmítico (C16:0)	25,46 \pm 2,52	26,59 \pm 3,15	27,63 \pm 2,11
Ácido margárico (C17:0)	0,46 \pm 0,13	0,47 \pm 0,15	0,49 \pm 0,19
Ácido esteárico (C18:0)	5,98 \pm 1,15	5,95 \pm 1,21	6,13 \pm 1,18
Ácido araquídico (C20:0)	12,39 \pm 3,18	11,86 \pm 2,13	12,22 \pm 1,24
Ácido behénico (C22:0)	9,74 \pm 1,30	8,54 \pm 0,95	8,85 \pm 1,38
Ácido oleico (C18:1)	27,62 \pm 1,58	28,05 \pm 2,13	25,69 \pm 1,98
Ácido palmitoleico (C16:1)	2,23 \pm 0,84	2,22 \pm 0,91	2,28 \pm 1,20
Ácido linoleico (C18:2)	12,89 \pm 2,42	13,06 \pm 1,36	13,38 \pm 2,32
Ácido linolénico (C18:3)	3,24 \pm 0,75	3,25 \pm 0,88	3,32 \pm 1,12
Índice de Yodo (IY)	46,08 \pm 3,15	46,75 \pm 2,26	45,27 \pm 3,42
Relación Oleico/Linoléico	2,14 \pm 0,12	2,15 \pm 0,26	1,92 \pm 0,21

Si bien el perfil de ácidos grasos mostró mayormente AGS, la presencia de ácido oleico, linolénico y linoléico es relevante, estos resultados indican que podría ser un aceite promisorio en vista de su valor nutricional, ya que estos frutos aportarían esos ácidos grasos esenciales si se utilizaran como aditivos alimentarios. Por ejemplo, López-Huertas (2010) consideró que el aumento en la ingesta de ácido oleico puede ser beneficioso, ya que limita el consumo de grasas saturadas. Además, la ingesta suficiente de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linolénico (omega-3) y el ácido linoléico (omega-6) es importante por el rol crucial que desempeñan en la salud humana entre la que se pueden mencionar: el desarrollo y mantenimiento de una correcta función cerebral, la visión, las respuestas inmunitarias e inflamatorias, la producción de moléculas semejantes a las hormonas (Pereira y col. 2008)

Análisis del contenido Mineral

El contenido de minerales se realizó a partir de los frutos de *Z. punctata* pulverizados, se utilizó para cada elemento material de referencia certificado, según se describe en el capítulo de Materiales y Métodos. El perfil de minerales obtenido se presenta en la **Tabla V-6**, el contenido se expresó como mg de mineral cada 100 g de frutos. Se analizaron 28 minerales en total, los minerales mayoritarios fueron seis: K, Ca, Mg, Na, Fe y Zn para los tres sitios de colecta, y se muestran al inicio de la tabla.

Potasio se presentó en mayor cantidad y no mostró diferencias significativas en los frutos según el sitio de colecta. El perfil que presentó este mineral fue relevante y representa el 85,4 % del contenido total de los minerales en los frutos de Bauchaceta; el 80 % en los de Hualilán y 65 % en los de Ullum.

El Ca, el Mg y Fe presente en los frutos de Ullum fue significativamente diferente que para los frutos de los otros dos sitios. Mientras que el sodio fue significativamente menor en los frutos de Bauchaceta. De los seis minerales mayoritarios, el que se presentó en menor concentración fue el Fe. Es relevante considerar que tres de los cinco minerales mayoritarios (Ca, Mg, Fe), están incluidos por el Código Alimentario Argentino (CAA) como un requisito nutricional en la ingesta diaria de nutrientes para los individuos. Mientras que Zn, otro mineral considerado esencial por el CAA, se presentó en concentraciones significativamente mayor en los frutos de Hualilán y Ullum que en Bauchaceta.

Tabla V-6: Contenido de minerales de los frutos de *Zuccagnia punctata*, expresados en (mg mineral/100 g fruto).

Mineral	Lugar			LOD	LOQ
	Bauchaceta	Hualilán	Ullum		
K	1896,65 ± 125,64 ^a	1777,08 ± 97,29 ^a	1442,80 ± 433,26 ^a	3,79	11,29
Ca	205,03 ± 49,09 ^a	394,94 ± 88,23 ^a	623,87 ± 109,21 ^b	0,12	0,36
Mg	77,42 ± 4,21 ^a	91,87 ± 11,16 ^a	160,90 ± 45,98 ^b	3,27	9,81
Na	18,62 ± 3,18 ^a	99,73 ± 14,38 ^b	136,85 ± 53,39 ^b	5,41	15,45
Fe	11,33 ± 1,52 ^a	28,94 ± 2,39 ^a	145,56 ± 64,79 ^b	0,41	1,24
Zn	4,32 ± 0,22 ^a	101,88 ± 12,54 ^b	123,08 ± 66,67 ^b	0,02	0,08
Al	0 ^a	41,97 ± 0,63 ^a	196,80 ± 91,99 ^b	10,59	31,76
B	2,81 ± 0,59 ^a	3,64 ± 0,90 ^a	4,56 ± 1,43 ^a	0,39	1,23
Mn	1,56 ± 0,27 ^a	1,73 ± 0,19 ^a	5,41 ± 1,98 ^b	0,04	0,12
Cu	1,25 ± 0,05 ^a	1,16 ± 0,17 ^a	1,45 ± 0,38 ^a	0,02	0,08
Sr	0,58 ± 0,18 ^a	1,23 ± 0,27 ^{ab}	2,27 ± 0,84 ^b	0,00	0,00
Ba	0,21 ± 0,07 ^a	0,45 ± 0,02 ^a	1,64 ± 0,75 ^b	0,02	0,05
Rb	0,45 ± 0,03 ^a	0,50 ± 0,09 ^a	1,22 ± 0,42 ^b	0,00	0,01
Pb	0,59 ± 0,02 ^a	0,64 ± 0,02 ^{ab}	0,80 ± 0,13 ^b	0,00	0,01
Ni	0,40 ± 0,34 ^a	0,31 ± 0,06 ^a	0,36 ± 0,12 ^a	0,07	0,10
V	0 ^a	0 ^a	0,48 ± 0,09 ^b	0,12	0,36
As	0 ^a	0 ^a	0,29 ± 0,06 ^b	0,05	0,15
Cr	0 ^a	0 ^a	0,24 ± 0,05 ^b	0,05	0,14
Li	0 ^a	0 ^a	0,23 ± 0,09 ^b	0,02	0,07
Ag	0,01 ± 0,002 ^a	0,02 ± 0,003 ^a	0,04 ± 0,04 ^a	0,01	0,01
Cd	0 ^a	0,01 ± 0,002 ^{ab}	0,02 ± 0,01 ^b	0,03	0,04
Be	0 ^a	0 ^a	0,01 ± 0,002 ^b	0,01	0,01
Tl	0 ^a	0,001 ± 0,0003 ^b	0 ^a	0,00	0,00
Co	0	0	0	0,06	0,19
Ga	0	0	0	0,07	0,22
Se	0	0	0	0,05	0,12
Mo	0	0	0	0,05	0,12
Bi	0	0	0	0,00	0,01

LOD: Límite de detección ($\mu\text{g/g}$), LOQ: Límite de cuantificación ($\mu\text{g/g}$). Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (de tres réplicas), y se analizaron con ANOVA para $p < 0,05$, Diferentes letras indican diferencias significativas entre los sitios de recolección, letras iguales indican que no presentan diferencias significativas para $p < 0,05$.

Estos resultados obtenidos indican que existe una variabilidad respecto al contenido mineral, en los frutos de *Z. punctata* colectados en distintos sitios, principalmente en los minerales mayoritarios como Ca, Mg, Na, Fe y Zn. Este es el primer estudio que muestra el contenido mineral en los frutos de *Z. punctata*, los resultados presentados indicarían, adicionalmente que estos frutos constituyen una fuente promisoría por su contenido mineral, aspecto relevante para su posible utilización como aditivos en alimentos.

Parte D

Análisis Multivariado en relación a los sitios de colecta

Análisis Estadístico

Estadística Multivariada

Se utilizaron métodos estadísticos multivariados para verificar la contribución de cada variable al modelo, y su capacidad de discriminar una categoría de la otra.

Se analizó la dinámica de variables medidas en los extractos y en los frutos de la especie estudiada. Para determinar la heterogeneidad espacial, los datos de los diferentes sitios (FT, F, AT, perfil de minerales, cuantificación química, actividad antioxidante, medida por diferentes métodos) y de los diferentes extractos de las muestras de frutos (EEP, EDCM, EMeOH-H⁺ y EMeOH-H⁺), se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y por comparación de medias con el test de Tukey a $p < 0,05$. Además, se analizaron los datos de las determinaciones químicas y biológicas de los frutos mediante análisis de componentes principales (PCA). Las relaciones entre las muestras fueron evaluadas después de trazar las partituras de muestra en las dos dimensiones principales, es decir, los componentes más significativos.

A continuación, con los resultados obtenidos se presenta el análisis multivariado de los componentes principales de los frutos de *Zuccagnia punctata* que se realizó para determinar la variabilidad de las muestras según el sitio de colecta y sus correlaciones. En la **Figura V-7** se observa el análisis multivariado de la composición química obtenida de los extractos de los frutos de los tres sitios de colecta. En la misma los dos primeros ejes canónicos aportaron el 77% de la variabilidad de los tres sitios de muestreo (el eje 1 aporta el 66% de la variabilidad y el eje 2, el 11%). La componente 1 (CP1) muestra a los EMeOH-H⁺ de los tres sitios de colecta se encuentran asociados entre sí por su composición química, y principalmente con el contenido de isoquercetina, 7-hidroxiflavanona, 2', 4'-dihidroxichalcona y galangina.

Por otra parte, la componente 2 (CP2) muestra que está asociada con eriodictiol-O-hexósido y kaempferol; y a su vez, diferencia marcadamente al EMeOH-H⁺ de Hualilán y el de Bauchaceta.

En general el análisis muestra que la composición química cuantificada en estos frutos está asociada a los EMeOH-H⁺ de los tres sitios de colecta, que además fueron los extractos con mayor capacidad antioxidante en los ensayos llevados a cabo. Esto podría estar relacionado y las propiedades antioxidantes de los frutos de *Z. punctata*, que a su vez, podría deberse a la capacidad antioxidante de los compuestos que los constituyen.

Figura V-7: análisis de componentes principales correspondientes a la composición química de los extractos seriados de los frutos de *Z. punctata* de Bauchaceta, Hualilán y Ullum.

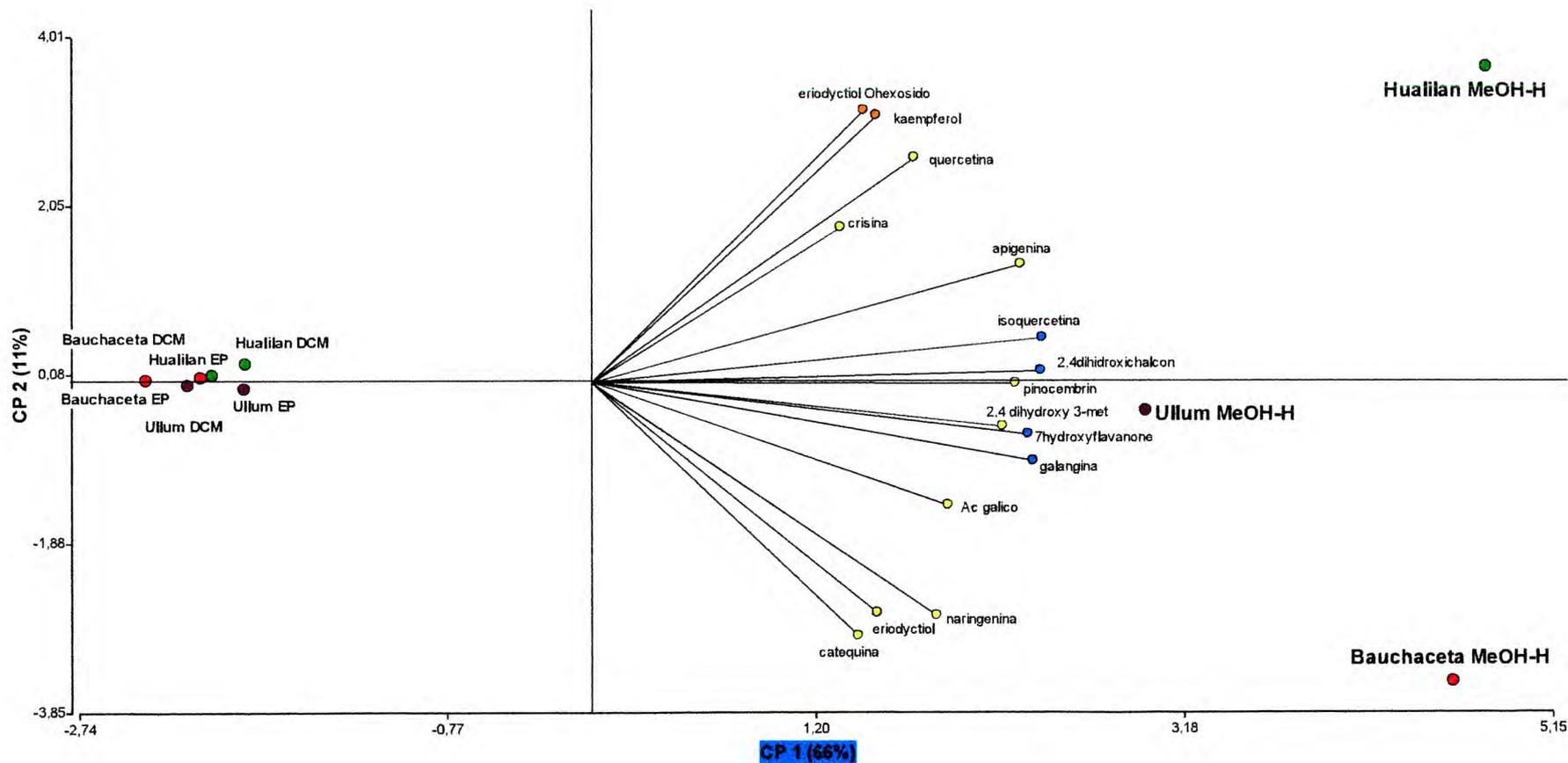
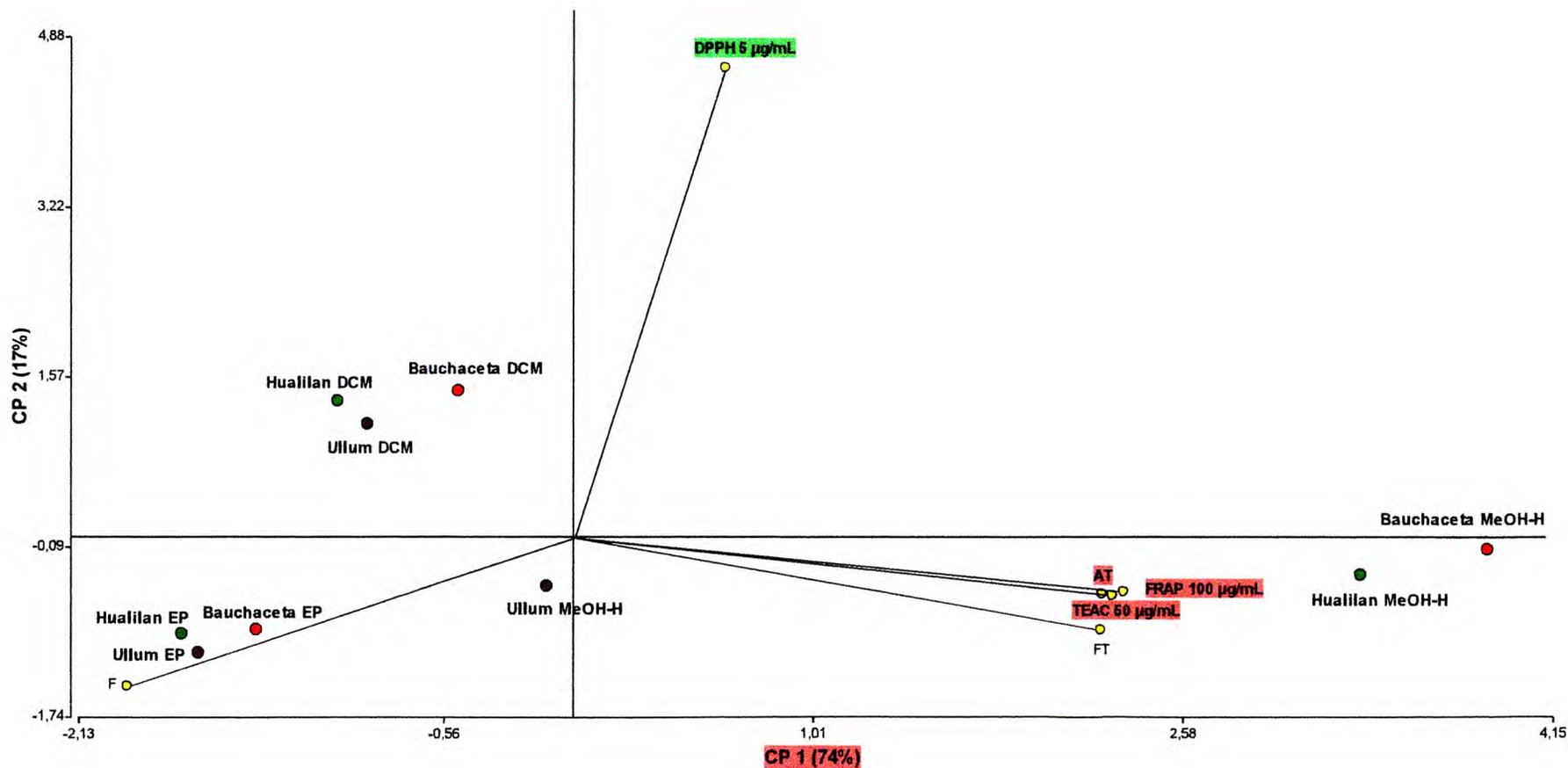


Figura V-8: análisis de componentes principales correspondientes al contenido de F, FT, AT y la actividad antioxidante de los extractos seriados de los frutos de *Z. punctata* de Bauchaceta, Hualilán y Ullum.



En este caso (**Figura V-8**), se realizó un análisis multivariado del contenido de FT, F y AT; y la actividad antioxidante de los extractos de los frutos de la especie en estudio. El gráfico muestra que los ejes canónicos aportaron el 91% de la variabilidad de los tres sitios de muestreo (el eje 1 aporta el 74% de la variabilidad y el eje 2, el 17%). La componente 1 (CP1) muestra que los EMeOH-H⁺ de Hualilán y Bauchaceta están relacionados entre sí y asociados con el contenido de AT, la capacidad reductora medida por el ensayo FRAP y el ensayo TEAC. Este análisis muestra gráficamente la relación que presentan los resultados obtenidos durante este trabajo, ya que los extractos de estos dos sitios de colecta, de mayor altura, fueron los que presentaron mayores valores, tanto de AT como de FT, además de evidenciar mayor capacidad antioxidante. Esto está de acuerdo con algunos autores (Larson, 1988 y Alonso-Amelot, 2008), que sugieren que la concentración de los metabolitos incrementa con ciertas condiciones como son la altura, la radiación UV, elevada amplitud térmica, entre otros.

La componente 2 (CP2) presenta mayor aporte por parte de la variable de la capacidad de captura del radical DPPH a 5 µg/mL, y se encuentra principalmente asociada los EDCM de los tres sitios de colecta. Esto representa, gráficamente, el comportamiento de las muestras en los ensayos llevados a cabo, ya que estos extractos fueron los que presentaron mayor poder de captura del radical DPPH.

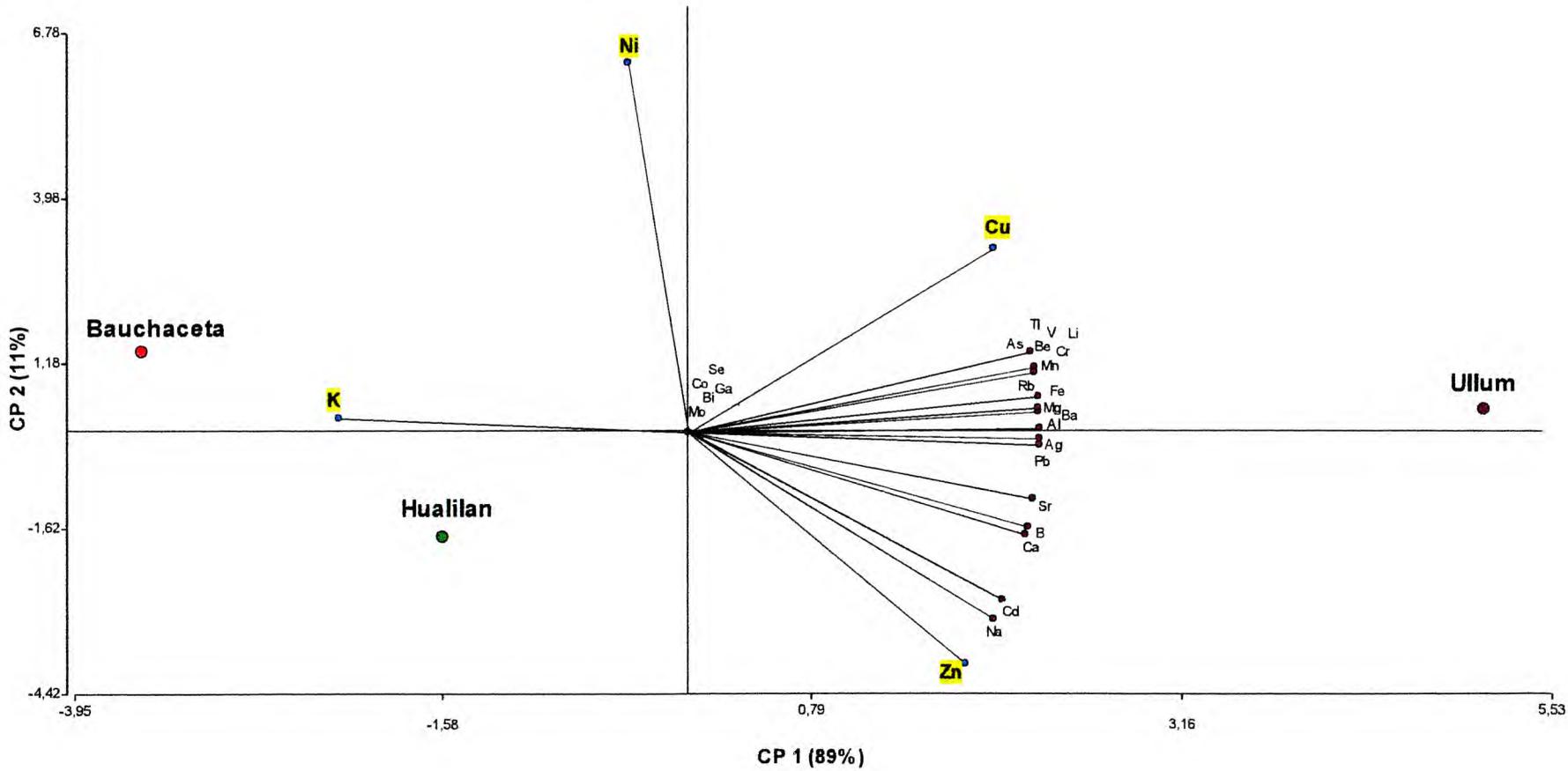
Además, los EEP de los tres sitios de colecta se observan asociados a la variable F, es decir que el contenido de flavonoides de estos extractos fue similar, tal como se vio cuando se realizó el ANOVA. Estos resultados están relacionados con la presencia de este tipo de compuestos aún en el extracto no polar, como son las chalconas, que a su vez, son compuestos característicos de esta especie, que ya se han reportado por diversos autores (Pederiva y col., 1975; Pederiva y Giordano, 1984; Svetaz y col., 2004; Agüero y col., 2010).

Por otro lado, se realizó este tipo de análisis para el caso del contenido de minerales de los frutos de los diferentes sitios de colecta. En el gráfico (**Figura V-9**) se muestra que el aporte a los ejes canónicos fue del 100 % de la variabilidad de la composición de minerales en los frutos estudiados (el eje 1 aporta el 89 % y el eje 2, el 11 %).

La CP1 presenta el mayor aporte por parte del contenido de K, y el mismo se encuentra asociado con los frutos de Bauchaceta y Hualilán. Y la CP2, muestra el mayor aporte del contenido de Ni, Cu y Zn; y a su vez, diferencia a Bauchaceta y Ullum, de Hualilán. Además, este componente asocia a Bauchaceta con el contenido de K y Ni; y por otro lado asocia a Ullum con el contenido de Cu.

Estos resultados muestran que los frutos de Bauchaceta y Hualilán, están relacionados con el mineral mayoritario, K, y los frutos de Bauchaceta, con el contenido de Ni. Esto sumado a los resultados obtenidos hasta el momento, referidos al contenido de FT, F, AT y la actividad antioxidante, demuestran que los frutos más promisorios son los de los que crecen a mayor altura, como son los de Hualilán y Bauchaceta.

Figura V-9: análisis del contenido mineral de los frutos de *Z. punctata* de Bauchaceta, Hualilán y Ullum.



CONCLUSIÓN

Los frutos de *Zuccagnia punctata* presentan una elevada capacidad antioxidante, principalmente los de Bauchaceta y Hualilán. Esta actividad está relacionada con la composición química de los frutos, ya que contienen compuestos que presentan diversas propiedades biológicas. Además, se determinó que los frutos colectados en las zonas de mayor altura, serían una fuente de antioxidantes naturales importante.

De acuerdo con la composición de ácidos grasos y minerales que mostraron estos frutos, se los considera promisorios con un relevante aporte nutricional, si se utilizan como aditivos alimenticios.

La especie *Zuccagnia punctata* presenta una amplia distribución en la provincia de San Juan a lo largo de las zonas cordilleranas, por lo que se propone el posible uso sustentable de sus frutos, tendiendo a preservar las especies autóctonas y también sus hábitats de alta montaña para las generaciones futuras.

Capítulo VI

Conclusiones

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de esta Tesis, se evaluó la capacidad antioxidante y el aporte nutricional de los frutos de tres especies nativas que crecen en la provincia de San Juan. El conocimiento de los metabolitos que presentaron efecto antioxidante, como así también el contenido mineral y de ácidos grasos para otorgar valor agregado a estos frutos.

Semillas de *Ramorinoa girolae* Speg.

El análisis de estas semillas permitió:

- Establecer las propiedades antioxidantes y la composición de compuestos fenólicos, ácidos grasos y contenido mineral.
- El mayor contenido de fenólicos totales se presentó en el EMeOH.
- El perfil de ácidos grasos mostró mayoritariamente ácidos grasos insaturados, principalmente ácido oleico.
- Los minerales mayoritarios fueron: Potasio, Magnesio y Calcio.
- Se caracterizaron cinco compuestos fenólicos:

Compuesto 1: Derivado del ácido cumárico

Compuesto 4: (Epi) Gallocatequina

Compuesto 5: Catequina-O-Glucósido

Compuesto 6: Procianidina B (Dímero de catequina)

Compuesto 7: Catequina

Los resultados obtenidos en este primer estudio de las semillas de los frutos de *R. girolae*, en referencia a las propiedades antioxidantes, conjuntamente con el contenido

mineral y los ácidos grasos presentes, indicarían que podrían contribuir a mantener un estado saludable para aquellos que las consumieran.

Frutos de *Maytenus Viscifolia* Griseb.:

El estudio de estos frutos mostró:

- Un contenido moderado de fenólicos totales, flavonoides y antocianinas totales.
- Limitada actividad antioxidante.
- El ácido linoleico y oleico como los ácidos grasos mayoritarios.
- Los minerales mayoritarios fueron: Potasio, Sodio, Calcio, Magnesio y Zinc.

La información aportada sobre estos frutos, que hasta ahora no son aprovechados, podría considerarse desde el punto de vista de su contenido mineral y de ácidos grasos, para ser utilizados como aditivos alimentarios.

Frutos de *Zuccagnia punctata* Cav.:

Los frutos de esta especie colectados en tres sitios de la provincia de San Juan (Bauchaceta, Hualilán y Ullúm a una altura sobre el nivel del mar de 2600, 1800 y 700 respectivamente) mostraron que:

- Los EMeOH-H⁺ de Bauchaceta y Hualilán presentaron mayor contenido de fenólicos totales.
- Los EEP y EMeOH-H⁺ de los tres sitios de colecta, poseen elevado contenido de flavonoides.
- El EMeOH-H⁺ de Bauchaceta evidenció el mayor contenido de antocianinas totales.

- La mayor capacidad antioxidante se presentó en los frutos de Bauchaceta y Hualilán.
- El perfil de ácidos grasos mostró mayoritariamente a los ácidos oleico y palmítico.
- Los minerales mayoritarios fueron: Potasio, Calcio, Magnesio, Sodio, Hierro y Zinc
- Se caracterizaron y cuantificaron 15 compuestos en los frutos de las tres poblaciones.
 - ✓ 1: Ácido gálico
 - ✓ 2: Catequina
 - ✓ 3: Eriodictiol-O-hexósido
 - ✓ 4: Isoquercetina
 - ✓ 5: Eriodictiol
 - ✓ 6: Quercetina
 - ✓ 7: Naringenina
 - ✓ 8: Apigenina
 - ✓ 9: Kaempferol
 - ✓ 10: 7-hidroxi-flavanona
 - ✓ 11: Pinocebrina
 - ✓ 12: Crisina
 - ✓ 13: Galangina
 - ✓ 14: 2', 4'-dihidroxichalcona
 - ✓ 15: 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona

Todos los compuestos caracterizados se informan por primera vez en estos frutos. Diez de ellos (1 – 9 y 12), son informados por primera vez como constituyentes de *Z. punctata*.

Las propiedades antioxidantes de los frutos de *Zuccagnia punctata*, dan un valor adicional, alientan a su aprovechamiento y uso sustentable como suplementos dietarios en la industria alimentaria, principalmente los frutos de los sitios de mayor altura. Adicionalmente, los frutos de *Z. punctata* poseen potencial nutricional (la composición de ácidos grasos y minerales) independientemente del lugar de colecta.

El trabajo desarrollado durante esta tesis, permite concluir que es posible asignar un valor adicional a los frutos de especies nativas, que se manifiesta a través del conocimiento de los metabolitos que poseen, y su relación, en este caso, a la capacidad antioxidante, sobre la base de los requerimientos nutricionales para proteger los sistemas vivos del estrés oxidativo, con la consecuente búsqueda constante de nuevas fuentes naturales (de modo sustentable) de moléculas capaces de contrarrestar los efectos nocivos de la vida moderna.

Finalmente, este enfoque permitiría la valoración de estos frutos, su uso sustentable así como también su aprovechamiento en alimentos o suplementos dietarios, y abre nuevos horizontes para continuar, a futuro, con la búsqueda diferentes bioactividades a partir de frutos nativos de otras especies que crecen en regiones de la Argentina.

Capítulo VII

Bibliografía

- Agüero M. B., Svetaz L., Sánchez M., Luna L., Lima B., López M. L., Zacchino S., Palermo J., Wunderlin D., Feresin G. E., Tapia A. (2011). Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. *Food and Chemical Toxicology* 49, 1970–1978.
- Agüero, M.B., González, M., Lima, B., Svetaz, L., Sanchez, M., Zacchino, S., Feresin, G., Schmeda-Hirschmann, G., Palermo, J., Wunderlin, D., Tapia, A. (2010). Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 194–201.
- Alam, M. N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, 143–152.
- Alonso-Amelot, M. (2008). High altitude plants, chemistry of acclimation and adaptation. Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 34. 883 – 982.
- Amari, F., Fettouche, A., Samra, M. A., Kefalas, P., Kampranis, S. C., Makris, A. M. (2008). Antioxidant Small Molecules Confer Variable Protection against Oxidative Damage in Yeast Mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11740–11751.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K. y Özyurt, D. (2007). Review: Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* 12, 1496-1547.
- Arts, M., Dallinga, S., Voss, H-P., Haenen, Guido R.M.M, Bast, A. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry* 88, 4, 567–570.
- Ashraf, M.Z. y Gupta, N. (2011). Scavenger receptors: implication atherothrombotic disorders. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43, 697-700.
- Avery, S.V. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *The Biochemical Journal* 434, 2, 201-210.
- Azam, S., Hadi, N., Khan, N. U., Hadi, S. M. (2004). Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: Implications for anticancer properties. *Toxicology in Vitro*, 18, 5, 555–561.
- Baroni, M. V., Di Paola Naranjo, R. D., García-Ferreya, C., Otaiza, S., Wunderlin, D. A. (2012). How good antioxidant is the red wine? Comparison of some in vitro and in vivo methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines. *LWT - Food Science and Technology* 47, 1-7.
- Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH. (2004). Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. *European Food Research and Technology* 219:561–571.
- Belinha, I.; Amorim, M. A.; Rodrigues, P.; de Freitas, V.; Moradas-Ferreira, P.; Mateus, N.; Costa, V. (2007). Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2446–2451.

- Belnstein, J. (2001). The protective factors of fruit and vegetables. *Food Technology International* 10, 12-4.
- Berr, C., Balansard, B., Arnaud, J., Roussel, A. M., Alperovitch, A. (2000). Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: The EVA study, Etude du Vieillessement Arteriel. *Journal of the American Geriatric Society* 48, 10, 1285–1291.
- Beserra Almeida, M. M., Machado de Sousa, P. H., Campos Arriaga, Â. M., Matias do Prado, G., de Carvalho Magalhães, C. E., Arraes Maia, G., Gomes de Lemos, T. L. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International* 44, 2155 – 2159.
- Branchi, B., Galli, C. y Gentili, P. (2005). Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase–ABTS oxidations: an apparent paradox. *Org. Biomol. Chem.* 3, 2604-2614.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. Food Science and Technology* 28, 25–30.
- Bryans, J. A., Judd, P. A., Ellis, P. R. (2007). The effect of consuming instant black tea on postprandial plasma glucose and insulin concentrations in healthy humans. *Journal of the American College of Nutrition* 26, 5, 471–477.
- Cabrera, C., Lloris, F., Gimenez, R., Olalla, M., López, M.C. (2003). Mineral content in legumes and nuts: contribution to the Spanish dietary intake. *Science of the Total Environment* 308, 1–14.
- Cardozo M.L., Ordoñez R.M., Alberto M.R., Zampini I.C., Isla M.I. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activity characterization and genotoxicity evaluation of *Ziziphus mistol* ripe berries, exotic Argentinean fruit. *Food Research International* 44, 2063–2071.
- Chang, C. C.; Yang, M. H.; Wen, H. M.; Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10, 178–182.
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *The New England Journal of Medicine* 358, 5, 502–511.
- da Silva Nunes, R., Silva Kahl, V.F., da Silva Sarmiento, M., Richter, M.F., Costa-Lotufo, L.V., Rocha Rodrigues, F.A., Abin-Carriquiry, J.A., Martinez, M.M., Ferronato, S., Falcao Ferraz, A.B., da Silva, J. (2011). Antigenotoxicity and antioxidant activity of Acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at two stages of ripeness. *Plant Foods for Human Nutrition* 66, 129–135.
- De la Rocha, N., María, A.O.M., Gianello, J.C., Pelzer, L. (2003). Cytoprotective effects of chalcones from *Zuccagnia punctata* and melatonin on gastroduodenal tract in rats. *Pharmacological Research* 48, 97–99.
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Mullen, J.B., Lean, M.E.J., Brighenti, F., Crozier, A., (2004). HPLC–MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2807–2815.

- Di Paola, R. Estudio de la funcionalidad del polen apícola: caracterización y actividad de los antocianos y otros flavonoides. Tesis Doctoral Universidad de Salamanca (2006).
- Di Paola-Naranjo, R.D., Baroni, M.V., Podio, N.S., Rubinstein, H.R., Fabani, M.P., Badini, R.G., Inga, M., Ostera, H.A., Cagnoni, M., Gallego, E., Peral-García, P., Hoogewerff, J., Wunderlin, D.A. (2011). Fingerprints for main varieties of Argentinean wines: terroir differentiation by inorganic, organic and stable isotopic analyses coupled to chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 7854–7865.
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology* 17, 505–512.
- Egea, J.M. (2010). Biodiversidad Agraria, Agroecología Y Desarrollo Rural. El Caso De Tierra De Iberos Y Vegas Del Segura (Murcia). Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Elsayed, N.M. (2001). Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: A dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition* 17, 828-834.
- Gunstone, F.D. *Lipid Synthesis and Manufacture* (ed. F.D. Gunstone) Sheffield Academic Press, Sheffield (1999).321-346.
- Fabani, M. P., Luna, L., Baroni, M. V., Monferran, M. V., Ighani, M., Tapia, A., Wunderlin, D. A., Feresin, G. E. (2013). Pistachio (*Pistacia vera* var Kerman) from Argentinean cultivars. A natural product with potential to improve human health. *Journal of Functional Foods* 5, 1347 – 1356.
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT). (2012). Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation. FAO Food and Nutrition Paper No. 91.
- Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J.A., Ramalhosa, E. (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International* 50, 161–166.
- Flora, S.J. (2007). Role of Free Radicals and Antioxidants In Health And Disease. *Cellular and molecular biology* 53, 1, 1-2.
- Forman, H. J., Torres, M., Fukuto, J. (2002). Redox signalling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 234–235(1–2), 49–62
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. y Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules* 15, 8813-8826.
- Geleijnse, J. M., Launer, L. J., Van der Kuip, D. A. M., Hofman, A., Witteman, J. C. M. (2002). Inverse association of tea flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 75, 880–886.
- Giménez, A.M., P. Hernández, R. Gerez, M.E. Figueroa, I. Barrionuevo, F. Calatayu. (2010). Los arbustos útiles de los bosques del Chaco Semiárido. *Eco Productos Forestales No Madereros- Libro de Actas. Trabajo completo*, 66- 77.
- Giusti, M. y Wrolstad, R. E. (2001). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.

- Gonzalez AG., Tincusi BM., Bazzocchi IL., Tokuda H, Nishino H, Konoshima T, Jimenez IA., Ravelo AG. (2000). Anti-Tumor Promoting Effects of Sesquiterpenes from *Maytenus cuzcoina* (Celastraceae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 8, 1773 – 1778.
- Gonzalez F.G., Portela T.Y., Stipp E.J., Di Stasi L.C. (2001). Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 77, 41–47.
- Gonzalvo-Heras, B., Raidó-Quintana, B., Serra-Majem, L. (2006). Alimentos funcionales, Capítulo 84. In Serra-Majem, L., Aranceta-Bartrina, J. (Eds.). *Nutrición y Salud Pública. Métodos, bases científicas y aplicaciones*, 2ª Ed. Elsevier, Masson, S.A., Barcelona.
- Gozin, A.; Sellak, H.; Franzini, E.; Pasquier, C. (1999). Reactive oxygen species increase neutrophil adherence to endothelial cells and activate tyrosine phosphorylation of cytoskeleton proteins. En: *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. Packer, L.; Hiramatsu, M.; Yoshikawa, T. (Eds.) Academic Press, San Diego 371.
- Griendling, K. K., FitzGerald, G. A. (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: Animal and human studies. *Circulation* 108, 17, 2034–2040.
- Gupta, V. y Sharma, M. (2012). Phytochemical Analysis and Evaluation of Antioxidant Activities of Methanolic Extracts of *Maytenus emarginata*. *A Journal of Integrative Biology* 5, 257-262.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. (2010). Antioxidants: molecules, medicines and myths. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 393, 4, 561-564.
- Hannum, S.M. (2004). Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44, 1-17.
- Heldrich, K. (1990). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. Arlington, VA: Association of Official Chemists.
- Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S., Floyd, R. A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology & Medicine* 28, 10, 1456–1462.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780, 1217 – 1235.
- Hertog, M.G.L., Bueno de Mesquita, H.B., Fehily, A.M., Sweetnam, P.M., Elwood, P.C., & Kromhout, D. (1996). Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 5, 673–677.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1841–1856.
- Hussein G, Nakamura N, Meselhy MR, Hattori M. 1999. Phenolics from *Maytenus senegalensis*. *Phytochemistry*. 50: 689-94.
- ILSI. (2004) *Conceptos sobre los alimentos funcionales*. ILSI Europe Concise Monograph Series, USA.

- Jamuna, K.S., Ramesh, C.K., Srinivasa, T.R. y Raghu, K.L. (2010). Comparative studies on DPPH and reducing power antioxidant properties in aqueous extracts of some common fruits. *Journal of Pharmacy Research* 3, 10, 2378-2380.
- Jorge, R.M., Leite, J.P.V., Oliveira, A.B., Tagliati, C.A. (2004). Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 93-100.
- Kaume, L., Howard, L. R. y Devareddy, L. (2012). The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 5716–5727.
- Kiesling, R. (2003). Flora de San Juan. República Argentina. Volumen II. Estudio Sigma.
- King, A., Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association* 99, 213-8.
- Knudsen, I. (1999). Scientific elements in the safety assessment of novel foods in an international setting. *Nutrition* 2, 433-436.
- Konczak, I., Zhang, W. (2004). Anthocyanins more than nature's colours (2004). *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5, 239–240.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A.E., Hilpert, K. F. (2002). Bioactive compounds in food: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine* 113, 71s-88s.
- Kris-Etherton, P. M.; Yu-Poth, S.; Sabate, J.; Rateliffe, H. E.; Zahao, G.; Etherton, T. D. (1999). Nuts and their bioactive constituents: effects on plasma lipids and other factors that affect disease risk. *American Journal of Clinical Nutrition* 70, 504-511.
- Lambert, J.D., Hong, J., Yang, G., Liao, J., y Yang, C.S. (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 284S–291S.
- Larson (1988) Review: The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27, 969-978.
- Leite, J.P.V., Rastrelli, L., Romussi, G. (2001). Isolation and HPLC quantitative analysis of Flavonoid glycosids from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3796-801.
- Liu, M., Qi Li, X., Weber, C., Lee, C.Y., Brown, J., Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2926-2930.
- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition* 78, 517S–520S.
- Lopez-Huertas, E. (2010). Review: Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological Research* 61, 200–207.
- Maestri D M, Guzman C A. (1993). Chemical composition of tobacco seeds (*Nicotiana tabacum* L) from Argentina. *J Sci Food Agric* 61, 227-230.

- Maestri, D. M., Labuckas, D. O., Meriles, J. M., Lamarque, A. L., Zygadlo, J. A., Guzman, C. A. (1998). Seed Composition of Soybean Cultivars Evaluated in Different Environmental Regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77, 494-498.
- Martínez-Navarrete, N., Camacho Vidal, M., Martínez Lahuerta, J. J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética* 2, 64 – 8.
- Martins, A.G., Guterres, S.S., González Ortega, G. (2003). Anti-ulcer Activity of Spray-dried Powders prepared from Leaf Extracts of *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss. *Acta Farm. Bonaerense* 22, 1, 39-44.
- MassBank – High Resolution Mass Spectral Database (www.massbank.jp).
- Matsui, T., Ebuchi, S., Kobayashi, M., Fukui, K., Sugita, K., Terahara, N. (2002). Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomea batatas* cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7244–7248.
- Mattson, M.P. (2006). Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders. *Antioxidants and Redox Signalling* 8, 11–12.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., Carvalho, M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food Chemistry and Toxicology* 49, 2285–2291.
- Menéndez, J. C. (1993). Cap. 19: Diseño de fármacos basado en la química de radicales libres. En: *Introducción a la Química Farmacéutica*. Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U., España.
- Meyers, K., Watkins, C.B., Pritts, M.P., Liu, R.H. (2003). Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6887 – 6892.
- Middleton, P., Stewart, F., Al-Qahtani, S., Egan, P., O'Rourke, C., Abdulrahman, A. (2005). Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutiosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2, 81–86.
- Millone, M.V., Olagnero, G.F., Santana, E.C. (2011). Alimentos funcionales: análisis de la recomendación en la práctica diaria. *Diaeta (B. Aires)* 29, 134, 7-15.
- Monferrán M., Sánchez Agudo, J. A.; Pignata, M. L.; Wunderlin, D. A. (2009). Copper-induced response of physiological parameters and antioxidant. *Environmental Pollution* 157, 2570 – 2576.
- Monferrán, M.V., Pesce, S.F., Cazenave, J., Wunderlin, D.A. (2008). Detoxification and Antioxidant Responses in Diverse Organs of *Jenynsia multidentata* Experimentally Exposed to 1,2- and 1,4-Dichlorobenzene. *Environmental Toxicology* 23, 2, 184–192.
- Monferrán, M.V., Wunderlin, D.A., Nimptsch, J. y Pflugmacher, S. (2007). Biotransformation and Antioxidant Response in *Ceratophyllum demersum* Experimentally Exposed to 1,2- and 1,4-Dichlorobenzene. *Chemosphere* 68, 2073-2079.

- Morán Vieyra, F., Boggetti, H., Zampini, I., Ordoñez, R., Isla, M., Alvarez, R., De Rosso, V., Mercadante, A., Borsarelli, C. (2009). Singlet oxygen quenching and radical scavenging capacities of structurally related flavonoids present in *Zuccagnia punctata* Cav. Free Radical Research 43, 553–564.
- Moskaug, J.O., Carlsen, H., Myhrstad, M.C.W., y Blomhoff, R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. American Journal of Clinical Nutrition 81, 277S–283S.
- Nepote, V., Olmedo, R.H., Mestrallet, M.G., Grosso, N.R., (2009). A study of the relationships among consumer acceptance, oxidation chemical indicators and sensory attributes in high-oleic and normal peanuts. Journal of Food Science 74, S1–S8.
- Ness, A. R. y Powles, J. W. (1997). Fruit and vegetables and cardiovascular disease: review. International Journal of Epidemiology 26, 1 – 13.
- Netzel, M., Netzel, G., Tian, Q., Schwartz, S., Konczak, I. (2006). Sources of antioxidant activity in Australian native fruits. Identification and quantification of anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 9820–9826.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2012). Natural products as source of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products 75, 311–335.
- Niki, E., y Noguchi, N. (2000). Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? IUBMB Life 50 (4–5), 323–329.
- OMS (2006). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: Report of a WHO/IDF consultation: World Health Organisation [Online]. Retrieved on 16-04-2011 from, http://www.idf.org/webdata/docs/WHO_IDF_definition_diagnosis_of_diabetes.pdf.
- OMS. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Granada, España, 2012.
- OMS. Guideline: Potassium intake for adults and children. Geneva, World Health Organization (WHO), 2012.
- Orabi KY, Al-Qasoumi SI, El-Olemy MM, Mossa JS, Muhammad I. (2001). Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. Phytochemistry 58, 475– 80.
- Organización Mundial de la Salud para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas, 2002. Requerimientos de vitaminas y minerales de Humanos. Roma.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning effect reaction prepared from glucose amine. Journal of Nutrition 44, 307–315.
- Pederiva, R., Giordano, O. (1984). 3,7-Dihydroxy-8-methoxyflavone from *Zuccagnia punctata*. Phytochemistry 23, 1340–1341.
- Pederiva, R., Kavka, J., D'Arcangelo, A.T. (1975). Chalconas y flavanonas aisladas de *Larrea nifida* Cav. Anales de la Asociación Química Argentina 63, 85–90.
- Pereira, L.M., Hatanaka, E., Martins, E.F., Oliveira, F., Liberti, E.A., Farsky, S.H., Curi, R., Pithon-Curi, T.C., (2008). Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. Cell Biochemistry and Function 26, 197–204.

- Peschel W, Bohr C, Plescher A. (2008). Variability of total flavonoids in Crataegus—factor evaluation for the monitored production of industrial starting material. *Fitoterapia* 79, 6–20.
- Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Lamuela-Ravento, R., Buxaderas, S., Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry* 97, 137–150.
- Pombo, M., Castro, J.R., Castro Feijoo, I. Crecimiento y nutrición. En: Tojo R, editor. *Tratado de Nutrición Pediátrica*. Barcelona: Doyma, 2001, 467-474.
- Prior, R.L., Guohua, C. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables diet and health implications. *Hort Science* 35, 588-592.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4290–4302.
- Proestos, C., Lytoudi, K., Mavromelanidou, O. K., Zoumpoulakis, P., Sinanoglou, V. J. (2013). Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts and Their Essential Oils. *Antioxidants* 2, 11 – 22.
- Quiroga, E. N., Sampietro, A. R., Vattuone, M. A. (2001). Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 89–96.
- Ratera, E., Ratera, M. (1981). *Plantas de la Flora Argentina Empleadas en Medicina Popular*. Edit. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 189.
- Regos, I., Urbanella, A., Treutter, D. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds from the forage legume sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5843–5852.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology* 234, 279–293.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20, 933–956.
- Rice-Evans, C.A. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* 8, 797–807.
- Rivas-Gonzalo, J.C., García-Alonso, M. (2002). Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alimentación, nutrición y salud* 9, 31-8.
- Roth, I. (1987). Stratification of a Tropical Forest as Seen in Dispersal Types. *Task for Vegetation Science* 17. Dr. W. Junk Publishers. Dordrecht, Boston, Lancaster. 325.
- Rude, R.K., Gruber, H.E. (2004). Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15, 710–716.
- Santacruz L., Carriazo J.G., Almanza O., Osorio C. (2012). Anthocyanin Composition of Wild Colombian Fruits and Antioxidant Capacity Measurement by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 1397–1404.

- Saura-Calixto, F., Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry* 94, 442-47.
- Šavikin K, Zdunić G, Janković T, Tasić S, Menković N, Stević T, Đorđević B. (2009) Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia. *Plant Foods for Human Nutrition* 64, 212–217.
- Scalbert, A. Monties, B., Favre, JM. (1988). Polyphenols of *Quercus robur*: adult tree and in vitro grown calli and shoots. *Phytochemistry* 27, 3483 – 3488.
- Scalbert, A. Monties, B., Janin, G. (1989). Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 1324 – 1329.
- Seeram, N. P., Zhang, Y., Henning, S. M., Lee, R., Niu, Y., Lin, G., Heber, D. (2006). Pistachio skin phenolics are destroyed by bleaching resulting in reduced antioxidative capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7036–7040.
- Souza-Formigoni, M.L., Oliviera, M.G.M., Monteiro, M.G., Silveira- Filho, N.G., Braz, S., Carlini, E.A. (1991). Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals *Journal of Ethnopharmacology* 34, 21–27.
- Spegazzini, C. (1924). Un nuevo género de leguminosa (*Ramorinoa*). *Physis* 7, 21 262–267, Bs.As.
- Steinmetz, K. A., Potter, J. D. (1991). Vegetables, fruit, and cancer I. *Epidemiology. Cancer Causes and Control* 2, 325 – 357.
- Svetaz, L., Tapia, A., López, S., Furlán, R., Petenatti, E., Pioli, R., Schmeda-Hirschmann, G., Zacchino, S. (2004). Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soy bean infecting fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3297–3300.
- Svetaz, L.; Agüero, M.B.; Alvarez, S.; Luna, L.; Feresin, G.; Derita, M.; Tapia, A.; Zacchino, S. (2007). Antifungal Activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: Evidence for the Mechanism of Action. *Planta Medica* 73, 1074 – 1080.
- Tapia, A., J. Rodriguez, C. Theoduloz, S.Lopez, G. E. Feresin, G. Schmeda-Hirschmann. (2004). Free radical Scavengers and Antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 155-161.
- Tiberti L A, Yariwake JH, Ndjoko K, Hostettmann K. (2007). Identification of flavonols in leaves of *Maytenis ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analisis. *J Chromatogr B.* 846, 378-84.
- Tomás-Barberán, F.A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, nutrición y salud* 10, 41-53.
- Tomás-Barberán, F.A., Clifford, M.N. (2000). Review: Flavanones, charcones and dihydrochacones- nature, ocurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1073-80.
- Torres, M.M., Maestri, D.M. (2006). The effect of genotype and extraction methods on chemical composition of virgin olive oils from Traslasierra Valley (Córdoba, Argentina). *Food Chemistry* 96, 507–511.
- Touriño, S., Fuguet, E., Jáuregui, O., Saura-Calixto, F., Cascante, M., Torres, J.L., (2008). High-resolution liquid chromatography/electrospray ionization time- of-flight

mass spectrometry combined with liquid chromatography/electro-spray ionization tandem mass spectrometry to identify polyphenols from grape antioxidant dietary fiber. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 3489–3500.

- Toursarkissian, M. (1980). *Plantas medicinales de la Argentina. Sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica.* Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., Osawa, T. (2003). Dietary cyaniding 3-O-β-d-glucoside-rich purple corn colour prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *Journal of Nutrition* 133, 2125–2130.
- Ulibarri, E. A. (2005). *Zuccagnia punctata* (Leguminosae) ¿nuevo o viejo endemismo argentino? *Darwiniana* 43, 212-215.
- Urquiaga, I., Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidant and oxidative stress. *Biological Research* 33, 55-64.
- Vadivel, V., Stuetz, W., Scherbaum, V., Biesalski, H.K. (2011). Total free phenolic content and health relevant functionality of Indian wild legume grains: Effect of indigenous processing methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 935–943.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 1, 44–84.
- Van den Berg, R.; Haenen, G. R. M. M.; Van den Berg, H.; Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry* 66, 511 – 517.
- Van 't Berkel, T. J. C., Hoen, P. A. C., Van der Lans, C. A. C., Van Eck, M., Bijsterbosch, M. K., Twisk, J. (2003). Aorta of ApoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. *Circulation Research* 93, 3, 262–269.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4113-4117.
- Vessby, B., Uusitupa, M., Hermansen, K., Riccardi, G., Rivellese, A.A., Tapsell, L.C., Nälsen, C., Berglund, L., Louheranta, A., Rasmussen, B.M., Calvert, G.D., Maffettone, A., Pedersen, E., Gustafsson, I.B., Storlien, L.H. (2001). Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: the KANWU Study. *Diabetologia* 44, 312–319.
- Vicente-Herrero, M.T.; Terradillos García, M.J.; Ramírez Iñiguez de la Torre, M.V.; Capdevila García, L.M.; López-González, A.A.; Riera Routon, K. (2013). *Especies, hierbas medicinales y plantas. Usos en medicina. Revisión de la bibliografía científica (Medline).* *Medicina Balear* 28, 2. 35-42.
- Vilegas W, Sanommiya M, Rastrelli L, Pizza C. (1999). Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium*

- leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 403-6.
- Vilegas, J.H.I., Lancas, F.M., Antoniosi, N.R. (1995). High-temperature capillary GC analysis of phytopreparations of *espinheirasanta* (*Maytenus ilicifolia* M. and *Maytenus aquifolium*. Celastraceae), a Brazilian antiulcer plant. *Chromatographia* 40, 341–344.
 - Vilegas, J.H.I., Lancas, F.M., Cervi, A.C. (1994). High-resolution Gas-chromatography analysis of espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*) — analysis of crude drug adulterations. *Phytotherapy Research* 8, 241–244.
 - Vilegas, J.H.I., Lancas, F.M., Wauters, J.N., Angenot, L. (1998). Characterization of adulteration of 'espinheira-santa' (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*, Celastraceae) hydroalcoholic extracts with *Sorocea bomplandii* (Moraceae) by high-performance thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis* 9, 263.
 - Vita, J.A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 292S–297S.
 - Wahrburg, U. (2004). What are the health effects of fat? *European Journal of Nutrition* 43, 16–111.
 - Waladkhani, A, Clemens, M. R. (1998). Effect of dietary phytochemicals on cancer development (review). *International Journal of Molecular Medicine* 1, 747-53.
 - White, P.J. (2008). Fatty acids in oilseeds (vegetable oils). In Chow, K.C. ed. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*, pp. 227-262. CRC Press, New York, NY.
 - Wilmsen, P. K., Santa Spada, D., Salvador, M. (2005). Antioxidant activity of the flavonoid hesperedin in chemical and biological system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4757 – 4761.
 - Wolfe, K., Xianzhong, W., Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 609-614.
 - Wolfe, K.L., Liu, R.H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8896–8907.
 - Wootton-Beard, P. C.; Ryan, L. (2011). Review: Improving public health? The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International* 44, 3135 – 3148.
 - Youdim, K. A., Spencer, J. P. E., Schroeter, H., Rice-Evans, C. A. (2002). Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biological Chemistry* 383, 503–519.
 - Zampini, I.C., Vattuone, M.A., Isla, M.I. (2005). Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 450–456.
 - Zampini, I.C., Villarini, M., Moretti, M., Dominici, L., Isla, M.I. (2008). Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of hydroalcoholic extracts of *Zuccagnia punctata* Cav. *Journal of Ethnopharmacology* 115, 330–335.
 - Zhao, B., Hall, C. A. (2008). Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food Chemistry* 108, 511–518.

- Zywicki, B., Reemtsma, T., Jekel, M. (2007). Análisis de curtientes vegetales comerciales mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con ionización de electrospray acoplada a espectrometría de masas y su determinación en aguas residuales. In: Méndez Pampín, R., Vidal Sáez, G., Lorber, K.E., Márquez Romegialli, F. (Eds.), Producción limpia en la industria de curtiembre. Universidad de Santiago de Compostela, pp. 43–62.

Producción científica

Los trabajos publicados tienen relación a este trabajo y otros se realizaron como colaboración en el grupo de trabajo.

PUBLICACIONES

Relacionados al trabajo de Tesis:

***Ramorinoa girolae* Speg. (Fabaceae) seeds, an Argentinean traditional indigenous food: nutrient composition and antioxidant activity.** Lorena C. Luna, Natalia B. Pigni, Laura Torras-Claveria, Magdalena V. Monferran, Damian Maestri, Daniel A. Wunderlin, Gabriela E. Feresin, Jaime Bastida, Alejandro Tapia. *Journal of Food Composition and Analysis*. Available online 31 July 2013.

En colaboración:

I. **Antifungal activity of chalcones from *Zuccagnia punctata* Cav. acting against clinically important fungi and studies of mechanism of action.** Laura Svetaz, María Belen Agüero, Sandra Alvarez, Lorena Luna, Gabriela Feresin, Marcos Derita, Alejandro Tapia, Susana Zacchino. *Journal Planta Médica*; 73: 1074-1080 (2007).

II. **Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling Essential Oil.** Lorena Luna, Beatriz Lima, Alejandro Tapia, Gabriela Egly Feresin, Claudia Duschatzky, Mirta Possetto, Marina P. de Lampasona, Carola Schuff. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 11 (1) 106 – 111 (2008).

III. **Main Flavonoids, DPPH Activity and Metal Content Allow Determining the Geographical Origin of Propolis from the Province of San Juan (Argentina).** Lima, Beatriz; Tapia, Alejandro; Luna, Lorena; Fabani, María P.; Schmeda-Hirschmann, Guillermo; Podio, Natalia S.; Wunderlin, Daniel A.; Feresin, Gabriela E. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009), 57: 2691-2698.

IV. **Essential oils of medicinal plants from the Central Andes of Argentina; chemical composition and antifungal, antibacterial and insect repellent activity.** Beatriz Lima, Sandra López, Lorena Luna, María B. Agüero, Liliana Aragón, Alejandro Tapia, Susana Zacchino, María L. López, Julio Zygodlo and Gabriela E. Feresin. *Chemistry & Biodiversity*. (2011) Volume 8, Issue 5. Pages 711 – 953.

V. **Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization, and antifungal activity.** María B. Agüero, Laura Svetaz, Marianela Sanchez, Lorena Luna, Beatriz Lima, María L. López, Susana Zacchino, Jorge Palermo, Daniel Wunderlin, Gabriela Feresin and Alejandro Tapia. *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 1970–1978.

VI. **Antimicrobial and antioxidant activity of *Gentianella multicaulis* collected in Andean slopes of San Juan province, Argentina.** Lima B, Sánchez M, Luna L, Agüero MB, Zacchino S, Filippa E, Palermo JA, Tapia A, Feresin GE. Z. Naturforsch. (2012), 67C, 29-38.

VII. **Pistachio (*Pistacia vera* var Kerman) from Argentinean cultivars. A natural product with potential to improve human health.** María P. Fabani, Lorena Luna, María V. Baroni, Magdalena V. Monferran, Maximiliano Ighani, Alejandro Tapia, Daniel A. Wunderlin, Gabriela Egly Feresin. Journal of Functional Foods, 5, (2013), 1347-1356.

RESÚMENES EN REVISTAS CIENTÍFICAS DE PUBLICACIÓN PERIÓDICA CON REFERATO (ACTAS PROCEEDING)

Relacionados al trabajo de Tesis:

- I. **Antioxidant activity of native fruits from San Juan province, Argentine.** Luna Lorena, Wunderlin Daniel, Tapia Alejandro, Feresin Gabriela. XXVII Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Diciembre de 2009. San Luis, Argentina. Abstract Biocell 34, (1) 2010, ISSN: 0327-9545.
- II. **Phytochemical study, antioxidant activity and fatty acid composition of *Zuccagnia punctata* fruits.** Luna Lorena, Maestri Damián, Wunderlin Daniel, Feresin Gabriela, Tapia Alejandro. XXVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Octubre de 2010. Mendoza, Argentina. Biocell 35 (1), 2011.
- III. **Antioxidant activity and fatty acids composition of *Ramorinoa girolae* Speg. fruits.** Luna Lorena, Maestri Damián, Wunderlin Daniel, Feresin Gabriela, Tapia Alejandro. XXVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Octubre de 2010. Mendoza, Argentina. Biocell 35(1), 2011
- IV. **Contenido mineral en semillas de frutos de *Ramorinoa girolae* Speg. (Fabaceae).** Luna L., Monferran M., Feresin G., Wunderlin D., Tapia A. II Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina. Agosto 2011. San Juan, Argentina.
- V. **Polyphenols in wild populations of *Zuccagnia punctata* Cav. fruits.** Luna L.C., Baroni V., Wunderlin D.A., Feresin G.E., Tapia A. Biocell 36 (3), 2012, A-137, 136. Potrero de los Funes, San Luis, Noviembre, 2012.

En colaboración:

- I. **Antifungal and antioxidant activities of extracts and compounds from *Gentianella multicaulis* collected in San Juan.** Lima B, Sánchez M, Luna L, Agüero MB, Zacchino S, Filippa E, Palermo JA, Tapia A, Feresin GE. XXVIII Reunión

Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Octubre de 2010. Mendoza, Argentina. Biocell 35(1), 2011.

- II. **Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante de especies de *Tagetes spp.* de Tucumán.** Vidal E., Luna L., Tereschuk M.L., Slanis A., González M., Feresin G., Tapia A. II Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina. Agosto 2011. San Juan, Argentina.
- III. **Polifenoles y actividad antioxidante de cultivares argentinos de *Pistacia vera* var *kerman*.** Fabani MP., Luna L., Ighani M., Tapia A., Wunderlin D., Feresin G. II Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina. Agosto 2011. San Juan, Argentina.
- IV. **Actividad antimicrobiana y antioxidante de miel de Tudcum, San Juan, Argentina.** Aberastain E., Lima B, Luna L., Feresin G., Tapia A. II Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina. Agosto 2011. San Juan, Argentina.
- V. **Polyphenos and free radical scavengers of *Punica granatum* L. Var wonderful cultivares from San Juan, Argentine.** Mestre E., Baroni V., Wunderlin D., Naranjo E., Caputo R., Coralli M., Feresin G.E., Tapia A., Luna L. Biocell 36 (3), 2012, A-124, 83. Potrero de los Funes, San Luis, Diciembre, 2012.
- VI. **Antioxidant compounds of propolis from *Larrea nitida* Cav.** Vidal Bustos E., Fabani M.P., Agüero M.B., Luna L., Baroni V., Feresin G.E., Wunderlin D.A., Tapia A. Biocell 36 (3), 2012, A-126, 90. Potrero de los Funes, San Luis, Diciembre, 2012.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y OTROS EVENTOS CIENTÍFICOS

Relacionados al trabajo de Tesis:

XXVII CONGRESO ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CUYO, 11 al 13 de Dic. 2009. San Luis, Argentina.

- 1) Antioxidant activity of native fruits from San Juan province, Argentine. Luna L., Wunderlin D, Feresin GE, Tapia A.

XXVIII CONGRESO ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CUYO, 6 al 8 de Octubre 2010. Mendoza, Argentina.

- 2) Phytochemical study, antioxidant activity and fatty acid composition of *Zuccagnia punctata* fruits. Luna LC., Maestri, D., Feresin GE., Wunderlin DA. , Tapia A.
- 3) Antioxidant activity and fatty acids composition of *Ramorinoa girolae* Speg. fruits. Luna

LC., Maestri; D., Feresin GE., Wunderlin DA., Tapia A.

II REUNIÓN CONJUNTA DE LAS SOCIEDADES DE BIOLOGÍA DE LA REPÚBLICA ARGENTINA. Agosto, 2011. San Juan, Argentina.

4) Contenido mineral en semillas de frutos de *Ramorinoa girolae* Speg. (Fabaceae). Luna L., Monferran M., Feresin G., Wunderlin D., Tapia A.

XVIII SIMPOSIO ARGENTINO DE QUÍMICA ORGÁNICA. SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA ORGÁNICA, 13 al 16 de noviembre de 2011, Carlos Paz, Argentina.

5) La especie nativa *Ramorinoa girolae*: una nueva fuente natural de compuestos antioxidantes. Lorena C. Luna, Natalia B. Pigni, Laura Torras Claveria, Daniel A. Wunderlin, Gabriela E. Feresin, Jaume Bastida y Alejandro Tapia.

XXX REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CUYO. Diciembre 6 - 7, 2012. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.

6) Polyphenols in wild populations of *Zuccagnia punctata* Cav. fruits. Luna LC, Baroni, V., Wunderlin DA, Feresin GE, Tapia A. A-137-136. Biocell 36(3), 2012, ISSN 0327 – 9545.

En colaboración:

CONGRESO LATINOAMERICANO DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS. 18 al 20/03/2009. San Rafael, Mendoza.

7) Estudio de propóleos de Amaicha del Valle: posible aplicación en el diseño de alimentos funcionales. González, M.; Rudyk, R.A.; Albornoz, A.C.; Luna, L.; Lima, B.; Tapia, A.A.; Feresin, G.E.; Tereschuk, M.L.; Albarracín, P.M. 27A- Ciencia e Ingeniería de los alimentos.

XXVIII CONGRESO ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CUYO, 6 al 8 de Octubre, 2010. Mendoza, Argentina.

8) Antifungal and antioxidant activities of extracts and compounds from *Gentianella multicaulis* collected in San Juan. Lima B., Sánchez M., Luna L., Agüero MB., Zacchino S., Filippa E., Palermo JA., Tapia A., Feresin GE.

X SIMPOSIO ARGENTINO Y XIII LATINOAMERICANO DE FARMACOBOTÁNICA, 24 al 26 de Noviembre de 2010.

- 9) Antifungal and antioxidant activity of *Gentianella multicaulis* (Gentianaceae) from San Juan, Argentina. Lima Beatriz, Marianela Sánchez, Lorena Luna, María Belén Agüero, Susana Zacchino, Eva Filippa, Jorge A. Palermo, Alejandro Tapia y Gabriela Egly Feresin.

II REUNIÓN CONJUNTA DE LAS SOCIEDADES DE BIOLOGÍA DE LA REPÚBLICA ARGENTINA. Agosto, 2011. San Juan, Argentina.

- 10) Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante de especies de *Tagetes* spp. de Tucumán. Vidal E., Luna L., Tereschuk M.L., Slanis A., González M., Feresin G., Tapia A.
- 11) Polifenoles y actividad antioxidante de cultivares argentinos de *Pistacia vera* var kerman. Fabani MP., Luna L., Ighani M., Tapia A., Wunderlin D., Feresin G.
- 12) Actividad antimicrobiana y antioxidante de miel de Tucumán, San Juan, Argentina. Aberastain E., Lima B, Luna L., Feresin G., Tapia A.

XVIII SIMPOSIO ARGENTINO DE QUÍMICA ORGÁNICA. SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA ORGÁNICA, 13 al 16 de noviembre de 2011, Carlos Paz, Argentina.

- 13) Contenido mineral, compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y actividad antioxidante de cultivares argentinos de *Pistacia vera* var kerman. María Paula Fabani, Lorena Luna, Magdalena Monferran, Maximiliano Ighani, Alejandro Tapia, Daniel A. Wunderlin, Gabriela E. Feresin.

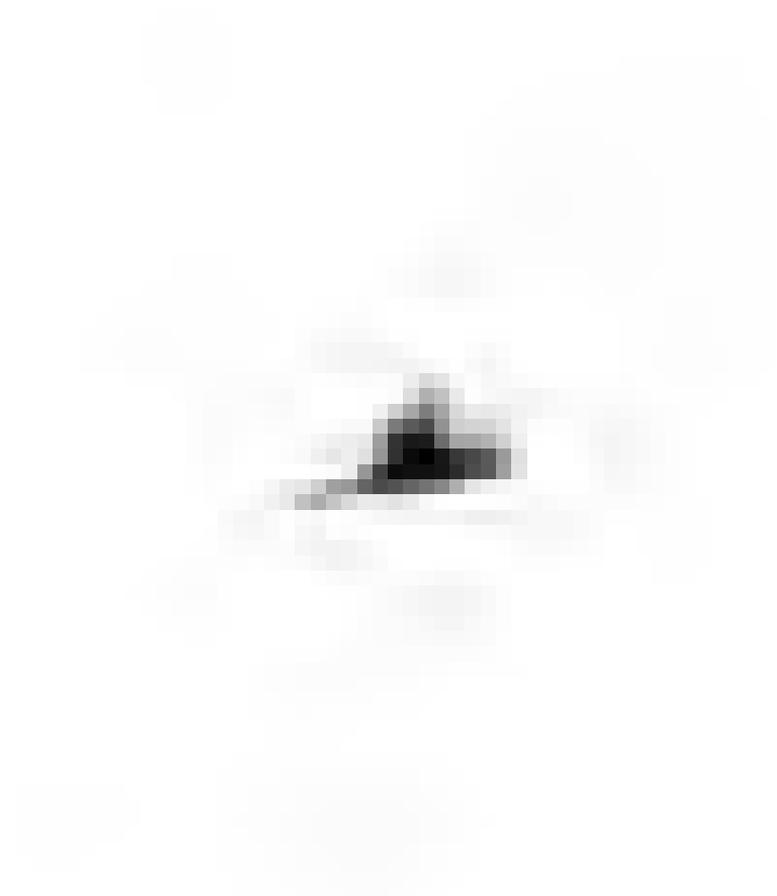
XXX REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CUYO. DICIEMBRE 6 - 7, 2012. POTRERO DE LOS FUNES, SAN LUIS, ARGENTINA.

- 14) Polyphenols and free radical scavengers of *Punica granatum* L. var Wonderful cultivars from San Juan, Argentine. Mestre E., Baroni V., Wunderlin D., Naranjo E., Caputo R., Coralli M., Feresin GE., Tapia A., Luna L. A-124-83. Biocell 36(3), 2012, ISSN 0327 – 9545.
- 15) Antioxidant compounds of propolis from *Larrea nitida* Cav. Vidal Bustos E., Fabani MP., Agüero MB., Luna L., Baroni V., Feresin GE., Wunderlin DA., Tapia A. A-126-90. Biocell 36(3), 2012, ISSN 0327 – 9545.

XVIII SIMPOSIO ARGENTINO DE QUÍMICA ORGÁNICA. SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA ORGÁNICA, 16 al 19 de noviembre de 2013, Mar del Plata, Argentina.



- 16) Química y bioactividad de extractos polares de orujo de uvas tintas. Gitto, V., Germano-García, M.J., Ferrari, M., Ardanaz, C.E., Wunderlin, D.A., Feresin, G.E., Luna, L., Kurina-Sanz, M., Gianini, F. PN-37. Pág. 95.



Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.