



**fcefn**



**DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA**  
Facultad de Ciencias Exactas  
Físicas y Naturales • UNSJ

**IBT** INSTITUTO DE  
BIOTECNOLOGÍA

**Universidad Nacional de San Juan**

**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**

***“Larrea ameghinoi* Speg. “JARILLA RASTRERA”:  
EFECTO ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANO  
Y ESTUDIO QUÍMICO”**

**Trabajo Final para optar al título de Licenciada en Biología**

**Alumna: Téc. Bressan Merlo, María Elisa**

**Directora: Lic. Gómez Pelaytay, Jessica Belén**

**Codirectora: Dra. Lima, Beatriz Viviana**

**AÑO: 2024**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la Dra. Sede Silvana M. y al Instituto de Botánica Darwinion CONICET-ANCEFN, San Isidro-Buenos Aires, por brindarnos las muestras para poder realizar este trabajo.

A mi directora Lic. Gómez Jessica y mi codirectora Dra. Lima Beatriz, por dirigirme y guiarme en esta instancia tan importante, por sus valiosas enseñanzas y constante disposición.

A cada integrante del grupo de trabajo, por su motivación y conocimiento compartido.

A mi madre Emilce, mis hermanos Bruno y Franco y mi hermana Guadalupe, por su sabiduría y fortaleza, por ser sostén en mi vida y por ser familia.

A mi pareja Agustín, por su amor, paciencia y apoyo incondicional, por no permitirme que deje de creer en mis capacidades y por estar a mi lado en cada paso de este camino.

A Cecilia, Ludmila y José, por su alegría y cariño, por los consejos y su amistad.

A todas mis amigas y amigos de Biología, en especial a Leandro, Agustina, Mario y Florencia, por todo lo compartido, los mates, las semitas, el estudio, las risas y el llanto, por ser parte de mi camino universitario y permitirme ser parte del suyo, sin ellos no hubiera sido lo mismo.

A mis amigas, Ana, Paula y Mayté, por ser incondicionales, por las caminatas, por su cariño, compañía y escucha.

A Celeste, por brindarme las herramientas necesarias para trabajar en mí y alcanzar mis objetivos.

A mí, por no rendirme y seguir avanzando.

*“...No te rindas que la vida es eso, continuar el viaje, perseguir tus sueños, destrabar el tiempo, correr los escombros y destapar el cielo...”*

(Autor anónimo)

## **LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS:**

- MAQ: Maquinchao
- SAO: zona cercana a Las Grutas
- EMLa: Extracto Metanólico de *Larrea ameghinoi*
- CCD: cromatografía en capa delgada
- CIMs: concentraciones inhibitorias mínimas
- mL: mililitro
- IC<sub>50</sub>: capacidad para estabilizar el 50% de los radicales
- DPPH: 1,1-difenil-2- picrilhidracilo
- TEAC: actividad antioxidante equivalente Trolox
- mg: miligramo
- ET: equivalente Trolox
- g: gramo
- EAG: equivalente de ácido gálico
- EQ: equivalente de quercetina
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- ABTS<sup>•+</sup>: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico)
- MTC: medicina natural y complementaria
- EROs: especies reactivas de oxígeno
- SOD: superóxido dismutasa
- GPX: glutatión peroxidasa
- GR: glutatión reductasa
- CAT: catalasa
- RE: retículo endoplasmático
- PX: peroxisoma
- GSSG: glutatión oxidasa
- 2GSH: glutatión reducido
- Rf: factor de retención
- HPLC-MS/MS: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
- NDGA: nordihidroguaiarético
- msnm: metros sobre el nivel del mar

- mm: milímetros
- L: litro
- DE: desviación estándar
- nm: nanómetros
- Abs: absorbancia
- mM: milimolar
- $\mu$ L: microlitro
- $A_0$ : Absorbancia inicial
- $A_1$ : Absorbancia a los 6 minutos
- $\Delta$  Abs: variación de la absorbancia
- FRAP: potencial antioxidante del ión férrico
- pH: potencial de hidrogeno
- UFC: unidad formadora de colonias
- DMSO: dimetilsulfóxido
- CBM: concentración bacteriostática mínima
- CFM: concentración fungistática mínima
- AG: ácido gálico
- ppm: partes por millón
- $\mu$ mol: micromol
- Q: quercetina
- EMC: extracto metanólico crudo
- H: hexano
- DCM: diclorometano
- EA: acetato de etilo
- EtOH: etanol
- ReLn: resina de *Larrea nitida*
- ELn: exudado de *Larrea nitida*
- C1: compuesto estándar ácido metil nordihidroguaiarético
- C2: compuesto estándar ácido nordihidroguaiarético
- C3, C4 y C5: compuestos aislados de ELn
- Ld 8, Ld 9 y Ld 10: fracciones del exudado de *Larrea divaricata*
- UV: radiación ultravioleta

## Índice

RESUMEN:.....	8
1. INTRODUCCIÓN: .....	10
1.1. Especies vegetales con propiedades fitoterapéuticas. ....	10
1.2. Principales compuestos bioactivos. ....	11
1.3. Radicales libres y Actividad Antioxidante de las especies vegetales. ....	12
1.4. Actividad Antimicrobiana de las especies vegetales. ....	14
1.5. Caracterización química mediante cromatografía en capa delgada. ....	14
1.6. Características del género <i>Larrea</i> . ....	16
1.6.1 Propiedades atribuidas a las especies del género. ....	17
1.6.2. Biomoléculas del género.....	17
1.7. Especie en estudio: <i>Larrea ameghinoi</i> . ....	18
1.7.1. Descripción botánica de la especie. ....	18
1.7.2. Antecedentes de <i>Larrea ameghinoi</i> . ....	20
1.8. HIPÓTESIS DE TRABAJO: .....	21
1.9. OBJETIVO GENERAL: .....	21
1.9.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	22
2.1. Material vegetal: .....	22
2.2 Preparación de extractos metanólicos: .....	22
2.3. Actividad Biológica. ....	23

2.3.1. Actividad Antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos metanólicos de <i>L. ameghinoi</i> : ....	23
2.3.2 Actividad Antimicrobiana de los extractos metanólicos de <i>L. ameghinoi</i> .....	27
2.4. Estudio Químico de los extractos metanólicos de <i>L. ameghinoi</i> . ....	28
2.4.1. Contenido Total de Compuestos Fenólicos:.....	28
2.4.2. Contenido de Flavonoides: .....	28
2.4.3. Análisis Químico mediante CCD:.....	28
2.5. Análisis de los datos: .....	29
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
3.1. Actividad Biológica.....	30
3.1.1. Actividad Antioxidante de los extractos de <i>L. ameghinoi</i> .....	30
3.1.2. Actividad Antimicrobiana de los extractos metanólicos de <i>L. ameghinoi</i> .....	32
3.2. Estudio Químico.....	36
3.2.1. Contenido Total de Compuestos Fenólicos y Flavonoides.....	36
3.2.2. Análisis químico preliminar de los extractos metanólicos de <i>L. ameghinoi</i> :.....	37
4. CONCLUSIONES.....	40
5. PROYECCIONES.....	41
6. BIBLIOGRAFÍA.....	42

## **RESUMEN:**

El género *Larrea* (Zygophyllaceae) comprende cinco especies, de las cuales cuatro de ellas crecen en Argentina: *Larrea ameghinoi* Speg., *L. cuneifolia* Cav., *L. divaricata* Cav. y *L. nítida* Cav., mientras que la especie *Larrea tridentata* (DC.) Coville crece en México. La caracterización química de las resinas, extractos globales, aceites esenciales y decocciones, así como la actividad biológica del género *Larrea*, han sido exhaustivamente estudiadas y reportadas. No obstante, *Larrea ameghinoi* es una especie escasamente estudiada por la comunidad científica, con algunos reportes hasta la fecha. Por tal motivo, el objetivo de esta tesis fue establecer el potencial fitoterapéutico de la especie de uso popular *L. ameghinoi*, mediante la evaluación de sus actividades antioxidantes y antimicrobianas, y el estudio de su perfil químico (compuestos fenólicos, flavonoides y la presencia de biomarcadores del género) de dos muestras de esta especie, colectadas en dos localidades: Maquinchao (MAQ) y una zona cercana a Las Grutas (SAO), de la provincia de Rio Negro, Argentina. A partir de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Larrea ameghinoi* (EMLa SAO y EMLa MAQ) se evaluaron sus actividades antioxidante y antimicrobiana. El contenido de flavonoides y compuestos fenólicos fue determinado espectrofotométricamente por el método del tricloruro de aluminio y Folin-Ciocalteu, respectivamente y se realizó el análisis cualitativo por cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando reveladores específicos para flavonoides y compuestos fenólicos con estándares aislados de otras especies del género. Los EMLa SAO y EMLa MAQ presentaron una interesante actividad antimicrobiana. La muestra colectada descrita como SAO fue significativamente activa frente a bacterias *Gram* positivo con un valor de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 125 µg/mL, en comparación con la acción del EMLa MAQ (CIM>1000 µg/mL). Ambas muestras también presentaron moderado efecto de acción frente a un panel de levaduras de incidencia clínica. Además, se determinó que las muestra SAO y MAQ presentaron efecto antioxidante, con valores de IC<sub>50</sub> de 10 y 10,5 µg/mL para la actividad atrapadora del radical DPPH y valores de TEAC de 54,84 y 54,88 mg ET/g extracto, respectivamente. Cabe destacar que no se observaron diferencias significativas entre las muestras analizadas. Se encontró similitud en el contenido de fenólicos totales (239,5 mg EAG/g de extracto SAO y 215,6 mg EAG/g de extracto MAQ) y diferencias significativas en el contenido de compuestos flavonoides (28,44 y 15,28 mg EQ/g en el EMLa SAO y en EMLa MAQ, respectivamente). Por otro lado, mediante CCD se identificó la presencia de flavonoides de polaridad media y compuestos fenólicos polares, destacándose la presencia del ácido nordihidroguaiarético, biomarcador del género *Larrea*. Es relevante destacar que este trabajo

representa un estudio preliminar que informa la actividad biológica y el perfil químico de *Larrea ameghinoi*, este permitiría establecer las bases para dar sustento científico al uso de esta especie en la medicina tradicional, considerando la necesidad de futuros estudios más exhaustivos que determinen desde otras perspectivas sus efectos fitoterapéuticos.

**Palabras clave: *Larrea ameghinoi*, potencial fitoterapéutico, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante, compuestos fenólicos y flavonoides, perfil químico.**

## **1. INTRODUCCIÓN:**

### **1.1. Especies vegetales con propiedades fitoterapéuticas.**

La humanidad ha utilizado las especies vegetales por su valor de uso medicinal desde los comienzos de la civilización y su utilización se ha conservado durante muchos siglos en todo el mundo. En la actualidad, estas especies ocupan un papel esencial en el cuidado de la salud, ya que un gran número de principios activos que forman parte de medicamentos modernos han sido aislados a partir de fuentes naturales (Haag y col., 2017; Vieyra y col., 2022; Gallia, 2023; Cabrera, 2023). Asimismo, el interés por la medicina tradicional se extiende más allá de los productos, abarcando prácticas y profesionales. Se calcula que aproximadamente un 80% de la población mundial utiliza las especies vegetales y sus derivados para la atención primaria de salud. En virtud de ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la importancia de la Medicina Tradicional y Complementaria (MTC) en la atención sanitaria y su uso generalizado en todo el mundo; y ha solicitado a los gobiernos reconocer y validar aquellas prácticas tradicionales insertas en el acervo cultural de los diferentes países, que promueve la investigación científica para evaluar la eficacia y seguridad de estas prácticas (OMS, 2013).

La OMS define a la medicina tradicional como el “conjunto de conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales”. Por otro lado, definen a la medicina complementaria o alternativa como un **“amplio conjunto de prácticas de atención de salud que no forman parte de la tradición ni de la medicina convencional de un país dado, ni están totalmente integradas en el sistema de salud predominante”**. Ambos términos, conforman lo que se conoce como MTC. Asimismo, las plantas de uso medicinal son consideradas para esta organización como: “cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos” (OMS, 2013).

Numerosos investigadores han documentado que las especies vegetales y sus productos naturales poseen potentes propiedades medicinales, lo que sugiere que pueden resultar una alternativa para tratar dolencias o afecciones, debido a que representan actividades antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, entre otras (Petrovska, 2012; Rico, 2015; Simirgiotis y col., 2016; Gómez y col., 2021). En Argentina crecen más de 1500 especies vegetales nativas las

cuales son usadas en la medicina tradicional, aunque muchas de ellas aún no han sido analizadas químicamente ni evaluadas sus potenciales propiedades (Rondina y col., 2008; Alonso y col., 2015; Heissenberg y col., 2019).

Si bien, se han informado numerosos resultados prometedores en pruebas clínicas y ensayos realizados con especies de uso medicinal para el tratamiento eficiente contra afecciones o dolencias, resulta fundamental ampliar la evidencia mediante la realización de un mayor número de ensayos que permitan asegurar el efecto específico y significativo de los extractos, decocciones e infusiones utilizados (Haag y col., 2014; Lorenzo y col., 2020; Gómez y col., 2021; Cabrera, 2023).

## **1.2. Principales compuestos bioactivos.**

En la actualidad, gracias al uso de distintas técnicas avanzadas de caracterización química, es posible identificar los metabolitos presentes en diferentes preparados de especies vegetales que se utilizan tradicionalmente por sus propiedades benéficas en la salud (Singleton y col., 1999; Chang y col., 2002; Agüero y col., 2011; Simirgiotis y col., 2013; Worley y col., 2013; Simirgiotis y col., 2016; Roche, 2023).

Los metabolitos secundarios, a diferencia de los primarios que están presentes en las especies vegetales con roles esenciales para el crecimiento y desarrollo, son compuestos orgánicos producidos por las plantas que desempeñan un papel crucial en la protección contra patógenos y herbívoros, así como en la señalización. Además brindan a las especies propiedades atrayentes de polinizadores y animales dispersores de semillas, actúan como agentes alelopáticos y en respuesta a factores estresantes abióticos y condiciones climáticas extremas (Taiz y col., 2006). Entre los metabolitos secundarios más destacados, los compuestos fenólicos son particularmente importantes debido a sus propiedades terapéuticas reportadas hasta el momento como: antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria, entre otras (Colina, 2016; Santos de Lima y col., 2017; Lorenzo y col., 2020; Misaraimé, 2023). Esta categoría de compuestos comprende ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, quinonas, antocianinas y demás (Lin y col., 2016; Qadir y col., 2017; Gastaldi, 2019). Su estructura posee uno o más grupos hidroxilos unidos a un anillo aromático, que le permiten ser metabolitos con efectos diversos, ya que pueden neutralizar electrones desapareados de los radicales libres, generalmente por transferencia del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo y, detener así, la propagación de reacciones en cadena (antioxidantes) (Vermerris y col., 2007) o actuar como

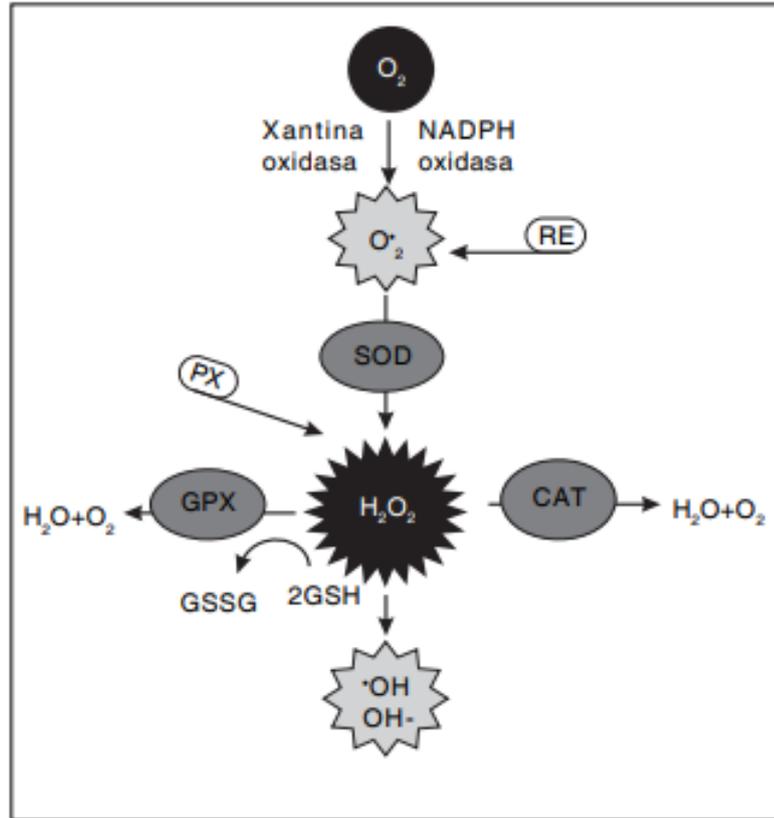
inhibidores membranas celulares de microorganismos (antimicrobiano). En consecuencia, la determinación y el estudio de los compuestos fenólicos es de gran relevancia para la comprensión de las propiedades de las especies vegetales de uso medicinal utilizados por las distintas comunidades (Lin y col., 2016; Hernandez, 2017; Gastaldi, 2019).

### **1.3. Radicales libres y Actividad Antioxidante de las especies vegetales.**

Un radical libre es una molécula inestable que se distingue por tener un electrón desapareado en su orbital externo, éstos se generan normalmente en el organismo en algunas etapas del metabolismo celular, por ejemplo en la cadena transportadora de electrones mitocondrial (complejos respiratorios I-III) donde un electrón es transferido al oxígeno, convirtiéndolo en un anión superóxido (Brand, 2010). Además, ciertas sustancias, como algunos medicamentos, el humo del cigarrillo, la radiación ionizante, la contaminación ambiental, la luz ultravioleta y ciertos agentes químicos, pueden generar radicales libres. Por tal motivo, estas moléculas son de interés biológico debido a su alta reactividad y capacidad para causar daño en el organismo (Viada y col., 2017; Sánchez-Valle y col., 2018). Las especies reactivas de oxígeno (EROs) interactúan en las células con diferentes moléculas constituyentes o no de sus membranas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, generalmente, mediante reacciones en cadena que generan la inactivación irreversible de estas moléculas diana (Bhattacharyya y col., 2014; Sadowska-Bartosz y col., 2014; Guija-Guerra y col., 2023).

Se conoce que el ser humano cuenta con un sistema antioxidante coordinado que ejerce un efecto protector sobre el organismo y le permite controlar las concentraciones de radicales libres. Este sistema está compuesto por sustancias endógenas (enzimáticas y no enzimáticas) y exógenas. De acuerdo a San-Miguel (2009), un antioxidante es definido como “cualquier sustancia que estando presente a bajas concentraciones, en relación a las del sustrato oxidable, retrase considerablemente o inhiba la oxidación de dicho sustrato”.

Los antioxidantes enzimáticos constituyen la primer línea de defensa, la cual está constituida por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno, glutatión peroxidasa (GPX) que reacciona con el  $H_2O_2$  y elimina los hidroperóxidos, glutatión reductasa (GR) que reduce el glutatión oxidado y forma dos moléculas de glutatión reducido, catalasa (CAT) que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, entre otros (Figura 1) (Banwo y col., 2021).



**Figura 1:** Mecanismo general de producción y neutralización de especies reactivas de oxígeno. RE: Retículo endoplasmático; PX: Peroxisoma; GSSG: Glutatión oxidado; 2GSH: Glutatión reducido. Extraído de Sánchez-Valle y col. (2018).

Además, dentro de los antioxidantes exógenos podemos encontrar compuestos que, se obtienen a través de la dieta, los cuales desempeñan un papel crucial en la prevención del daño causado por las especies reactivas de oxígeno (EROs). Estos antioxidantes incluyen vitaminas A, E ( $\alpha$ -tocoferol) y C (ácido ascórbico), minerales (manganeso, selenio, cobre, hierro), carotenoides, ácidos fenólicos, algunos azúcares y aminoácidos (Núñez, 2011; Mattera y col., 2017; Banwo y col., 2021; Guija-Guerra y col., 2023).

Cuando se genera un desequilibrio entre la producción de EROs y las defensas antioxidantes, con predominio de los primeros, se promueve un daño potencial, estado es conocido comúnmente como **estrés oxidativo**. El mismo es la repercusión en el organismo de un aumento en la producción de radicales libres, o la disminución en el sistema de defensa antioxidante (Hidalgo, 2018). Diversos estudios epidemiológicos muestran la estrecha relación que existe entre el estrés oxidativo y las enfermedades crónicas no transmisibles como cáncer, diabetes mellitus, psoriasis, aterosclerosis, afecciones gastrointestinales, hipertensión arterial, neurodegenerativas, entre otras (Martínez y col., 2003; Viada y col., 2017; Sánchez-Valle y col., 2018; Hidalgo, 2018; Guija-Guerra y col., 2023). Cabe destacar, que existen numerosos

reportes sobre la actividad antioxidante de especies vegetales, los cuales sustentan la idea de que éstas representan una fuente potencial de compuestos fitoquímicos para el tratamiento de dolencias o afecciones relacionadas con el estrés oxidativo (Hernández y col., 2015; Moreno y col., 2020; Gómez y col. 2021; Vieyra y col., 2022; Gallia, 2023).

#### **1.4. Actividad Antimicrobiana de las especies vegetales.**

Muchos trastornos causados por diferentes microorganismos, como las bacterias y hongos patógenos, generan una variedad de problemas de salud, como lesiones ulcerativas, inflamaciones crónicas en el sistema digestivo, enfermedades pulmonares, autoinmunes, urinarias, entre otros (Moreno y col., 2020; Valero y col. 2023; Lliguin y col., 2023). En diversos estudios, se ha informado la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos, así como los múltiples efectos secundarios, convirtiéndose en un grave problema global para la salud. Esta situación se atribuye a múltiples causas como: administración inadecuada de dosis, calidad deficiente de medicamentos, acceso limitado a tratamientos, uso excesivo e inadecuado por la práctica de la automedicación (Rocha y col., 2015; Valero y col. 2023; Sharif y col. 2023). Consecuentemente, ha surgido un interés común en la búsqueda de compuestos bioactivos o nuevos fármacos derivados de diferentes preparados de especies vegetales conocidas por sus propiedades medicinales, así como también comprender su perfil bioquímico y evaluar su potencial antimicrobiano como una alternativa ante esta problemática (Vivot y col., 2012; Ruiz y col., 2019; Moreno y col., 2020; Gómez y col., 2020; Gómez y col., 2021; Huaraca y col., 2021).

En este contexto, se ha evidenciado que las especies vegetales representan una fuente prometedora de compuestos bioactivos para el desarrollo de nuevos fármacos, exhibiendo efectos positivos frente a una amplia variedad de enfermedades. Su capacidad para sintetizar compuestos (metabolitos secundarios) con destacadas propiedades biológicas, incluyendo efectos antimicrobianos, las convierte en una alternativa natural a nivel mundial en la búsqueda de nuevos medicamentos (Davicino y col., 2011; Atef y col. 2019; Lliguin y col., 2023).

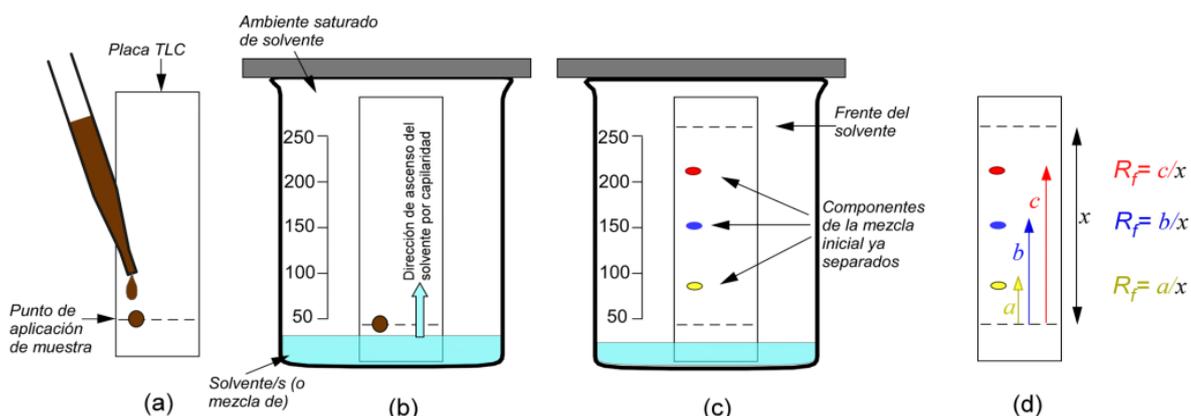
#### **1.5. Caracterización química mediante cromatografía en capa delgada.**

La cromatografía en capa delgada CCD (TLC, del inglés Thin Layer Chromatography) es una técnica cromatográfica que se utiliza por ser rápida, sencilla y de bajo costo, ésta permite analizar distintas muestras en simultáneo para ser comparadas con patrones de referencia.

Además, su uso sigue vigente debido a que utiliza pequeñas cantidades de reactivos, estándares y muestras, aunque presenta baja sensibilidad comparado con otras metodologías (Renger, 1998; Kumar y col., 2013).

La aplicación de esta técnica consiste en introducir la fase estacionaria (placa cromatográfica con la muestra previamente sembrada) (Figura 2a), en un recipiente cerrado que contiene un pequeño volumen del solvente o mezcla de solventes que constituyen la fase móvil, la cual circulará a través de la placa debido al fenómeno de capilaridad, lo que conllevará un reparto diferencial de los productos que están presentes en la muestra entre el solvente y el adsorbente (Figura 2b). Una vez que el frente del solvente alcance el límite de la placa, los puntos procedentes de la muestra separados (Figura 2c) se visualizan por fluorescencia. Finalmente, los compuestos pertinentes se identifican por sus colores característicos o fluorescencia con ayuda de reveladores específicos y sus valores del factor de retención ( $R_f$ , Figura 2d), los cuales, al ser comparados con un patrón de referencia permiten la identificación de los metabolitos que constituyen la muestra, identificando así los compuestos de interés (Vallejo-Rosero y col., 2021).

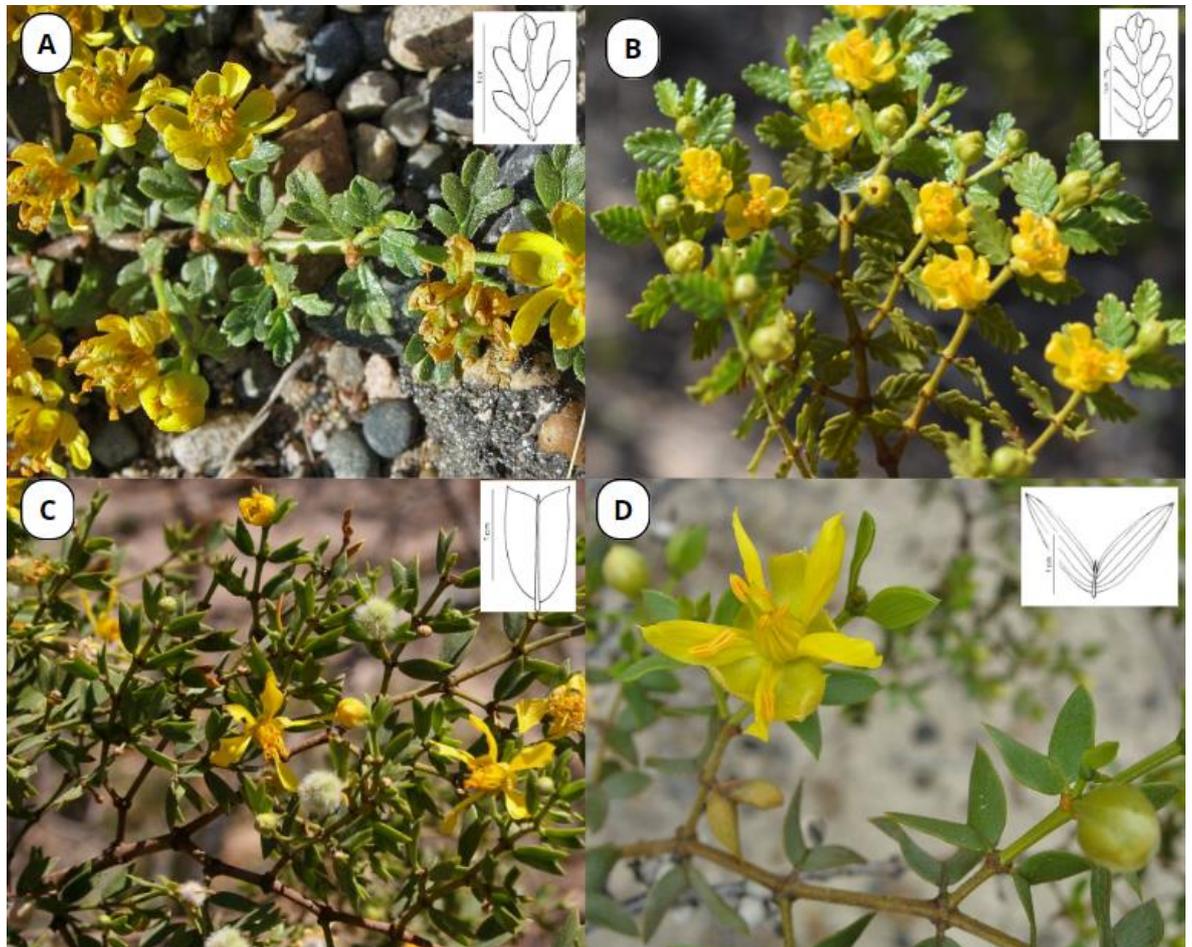
La CCD, permite determinar el grado de pureza de un compuesto, identificar y comparar analitos, así como también realizar el seguimiento de una reacción, razón por la que es ampliamente usada. Asimismo, esta técnica permite separaciones de los componentes de una muestra en corto tiempo y una identificación cualitativa con la ayuda de estándares de referencia.



**Figura 2:** Pasos básicos de la cromatografía en capa delgada. Extraído de Vallejo-Rosero y col. (2021).

## 1.6. Características del género *Larrea*.

El género *Larrea* (Zygophyllaceae) está compuesto por arbustos leñosos de hoja perenne, es característico de la provincia fitogeográfica del Monte y posiblemente es el género de arbustos desérticos más extendido en el Continente Americano, siendo Argentina y México su hábitat principal. De este género, cuatro especies se encuentran ampliamente distribuidas en Argentina (*Larrea ameghinoi* Speg., *L. cuneifolia* Cav., *L. divaricata* Cav. y *L. nitida* Cav.) (Figura 3), dos de estas especies también habitan en Chile (*L. divaricata* y *L. nitida*) y una crece en México: *L. tridentata* (DC.) Coville (Kiesling, 2003; Aliscioni y col., 2017; WFO, 2023). Asimismo, un factor diferencial es que todas las especies de *Larrea* son arbustos micrófilos con cutículas resinosas y estomas pequeños (Morello, 1951).



**Figura 3:** Especies del género *Larrea* distribuidas en Argentina, con referencia de la hoja característica de cada una. A: *L. ameghinoi*, B: *L. nitida*, C: *L. cuneifolia*, D: *L. divaricata* (Imágenes extraídas del Instituto de Botánica Darwinion, 1897).

### 1.6.1 Propiedades atribuidas a las especies del género.

Los integrantes de *Larrea* en Argentina, se agrupan bajo el nombre vernáculo de “jarillas”, las cuales se usan en la medicina tradicional argentina y en comunidades andinas para el tratamiento de heridas y contusiones, como desinfectantes de heridas, repelente de insectos, para la construcción de techos en zonas rurales y como leña para cocinar alimentos. Se conoce que extractos, decocciones e infusiones de partes aéreas de la mayoría de las especies de este género presentan diversas actividades biológicas tales como antimicrobianas, antioxidantes e inhibidoras de enzimas, antiinflamatorias, antiulcerosas, inmunomoduladoras, antitumorales, entre otras (Martins, y col., 2013; Martino y col. 2013; Skouta y col., 2018; Peralta, 2019; Morán-Santibañez y col., 2019; Moreno y col., 2020; Gómez y col., 2021; Isla y col., 2021).

Sin embargo, no sólo las preparaciones antes mencionadas resultan interesantes en estas especies, sino que sus aceites esenciales de acuerdo a lo informado por Itza (2019), presentan propiedades antifúngicas y antibacterianas frente a bacterias Gram positivo y Gram negativo. Existe una asociación vegetal entre las especies y algunos productos naturales, lo que permite una asociación botánica y cuyas propiedades biológicas también están relacionadas. Un ejemplo, es el propóleo andino asociados a *Larrea nítida* cuyos reportes sobre la capacidad antimicrobiana han permitido asociar botánicamente este producto natural. Entre las especies evaluadas con el extracto de propóleo colectado en diferentes departamentos de la provincia de San Juan, se encontró que las levaduras *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *C. neoformans* fueron las más sensibles. Agüero y col. (2011), informaron que los extractos de propóleos asociados a *Larrea* (*L. divaricata* y *L. nítida*) mostraron un notable efecto fúngico frente a hongos del género *Candida* y dermatofitos.

### 1.6.2. Biomoléculas del género.

Numerosos trabajos han informado la composición química de extractos y exudados de distintas especies del género *Larrea* (*L. divaricata*, *L. cuneifolia* y *L. nítida*), obtenida mediante la técnica cromatográfica líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS), donde se detectaron e identificaron diversos metabolitos, entre ellos ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, destacándose principalmente el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) y sus derivados (Moreno y col., 2018; Gómez y col., 2021).

Por otra parte, se ha estudiado el aceite esencial de *L. divaricata*, en el cual se determinó el contenido de terpenos mediante cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (limoneno, canfeno, borneol y alcanfor) y varios flavonoides (Davicino y col., 2011). Asimismo, se reportó que el aceite de *L. tridentata* posee como constituyentes mayoritarios terpenos como el timol y carvacrol, además de contener numerosos flavonoides (Buñuelos y col., 2018). También se aislaron de los extractos de propóleo y exudado de *L. nítida* el lingano: ácido NDGA y sus derivados, considerandos como los principales compuestos responsables de la actividad antifúngica (Agüero y col., 2011) y su capacidad para actuar como eliminador de radicales libres generados durante los procesos inflamatorios (Palacio y col., 2011). En otro estudio realizado por Isla y col. (2021), se reportó que en infusiones y decocciones de flores de *L. divaricata* el principal compuesto era el NDGA, sumado a la presencia de flavonoides como quercetina, kaempferol e isorhamnetina.

Existen numerosos informes sobre las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales, anticancerígenas y como protectores contra trastornos neurodegenerativos de moléculas del tipo flavonoides y el NDGA identificadas y aisladas de especies del género *Larrea* (Gnabre y col., 2015; Moreno y col., 2018; Carabajal y col., 2020; Skrajda-Brdak y col., 2020).

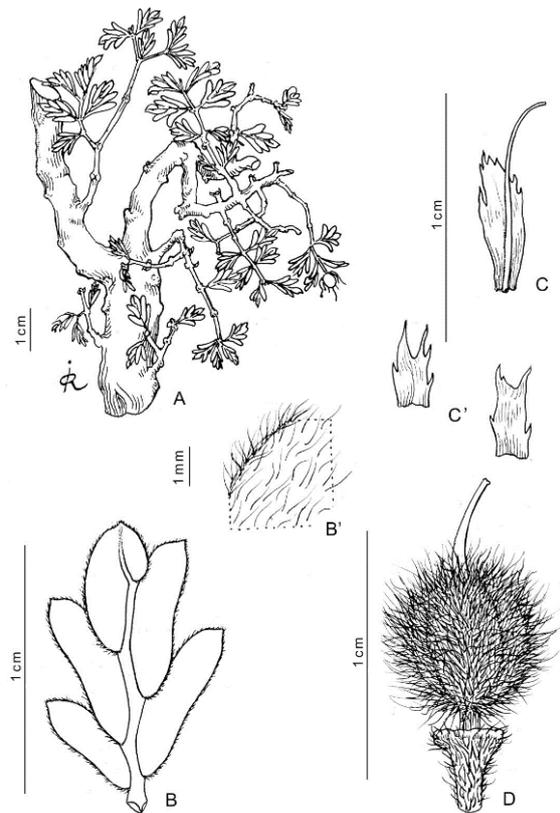
## **1.7. Especie en estudio: *Larrea ameghinoi*.**

### **1.7.1. Descripción botánica de la especie.**

*Larrea ameghinoi* Speg. conocida comúnmente como “Jarilla rastrera”, es un arbusto endémico de la Patagonia Argentina que habita en zonas bajas, desde Neuquén hasta Chubut entre los 200 y 800 msnm. Es una planta leñosa resinosa, ramosa, postrada, que crece como si estuviera adherida al suelo en toda su extensión y mide aproximadamente 10 centímetros de altura y sus ramas son torcidas (Figura 4). Esta especie florece desde octubre hasta fines de noviembre, periodo en el que se aprecian sus flores amarillas. Se distingue del resto del género por poseer hojas (5-8 x 2-3 mm) subsésiles, con 3-7 folíolos imparipinnados desiguales, con un folíolo terminal, soldado y más pequeño. Su fruto es una cápsula con pelos blanco grisáceos; el cual presenta 5 semillas pequeñas, lisas, arriñonadas (Figura 5).



**Figura 4:** *Larrea ameghinoi* con crecimiento horizontal cerca del suelo (Extraído de Instituto de Botánica Darwinion, 1897).



**Figura 5:** *Larrea ameghinoi*, A: Planta con hojas, B: Hojas con foliolos imparipinados, B': Tricomas., C y C': Detalle de flor. D: Fruto (Extraído de Instituto de Botánica Darwinion, 1897).

Esta especie, es la única en dispersar el fruto completo, a pesar de que el mismo es seco y dehiscente, siendo un caso particular de "dispersión esclerendocoria". Además, presenta hojas que crecen de forma horizontal y su proceso de desarrollo se caracteriza por su postura postrada. Estas particularidades le brindan la capacidad de prosperar en zonas expuestas a los vientos característicos del oeste patagónico. De acuerdo a lo informado por Zuloaga y col. (2019), el follaje es el elemento atractivo para el dispersor, quien ingiere los frutos al consumir las hojas. Por ello, integra en forma significativa la ingesta de los caprinos en el período de reposo vegetativo del pastizal natural en el Chaco Árido.

### **1.7.2. Antecedentes de *Larrea ameghinoi*.**

*L. ameghinoi*, además de su importancia cultural y simbólica, constituye una fuente promisoriosa de compuestos bioactivos con potenciales beneficios para la salud humana. Siendo valorada por los pueblos originarios, sus usos se han transmitido a través del saber popular. La corteza y hoja son utilizadas popularmente para tratar diversas dolencias en forma de diferentes preparaciones, por ejemplo, como infusión de la hoja, conocida como "té de Jarilla", o sus vapores, los que son indicados para disminuir la fiebre, trastornos estomacales, afecciones respiratorias como la bronquitis, tratar el dolor de espalda, y como emenagogo, ya que estimula y favorece el flujo menstrual. Además, de calmar el dolor reumático debido a su aplicación en forma de cataplasma (Patagonia, 2002; Alarcón y col., 2004; Ferreyra y col., 2021; Cabrera, 2023).

En los últimos años, se ha reportado la actualización química de algunas especies de *Larrea* (Gómez y col., 2021). Particularmente, de acuerdo a los datos proporcionados recientemente por Cabrera (2023) de *L. ameghinoi* basados en pruebas de germinación y establecimiento, informó que esta especie muestra una considerable probabilidad de sobrevivencia en comparación con las otras variantes del mismo género, ya que presenta semillas capaces de dar origen a un mayor número de plántulas, más vigorosas y en menor tiempo, por su mayor energía y vigor germinativo. Esta información resulta esencial para programas de bioprospección y multiplicación masiva bajo condiciones controladas, sobre todo teniendo en cuenta que sus poblaciones son muy escasas. En este estudio, también se identificaron los métodos más óptimos para extraer compuestos fenólicos de *L. ameghinoi* y se informó que el extracto de esta especie es capaz de capturar los radicales libres ABTS<sup>•+</sup> y DPPH, por lo que puede ser considerada como fuente de compuestos bioactivos con potencial antioxidante.

Teniendo en cuenta que las partes aéreas de esta especie en las provincias andinas del sur de Argentina son empleadas para tratar diversas dolencias y considerando que hasta la actualidad es escaso el estudio sobre la caracterización química y actividad biológica del extracto de *L. ameghinoi*, se plantea el desarrollo de este trabajo de tesis que tiene como hipótesis y objetivo:

### **1.8. HIPÓTESIS DE TRABAJO:**

La especie *Larrea ameghinoi* presenta potencial uso fitoterapéutico, el cual puede ser determinado mediante la evaluación de sus actividades antioxidante, antimicrobiana y el estudio de su perfil químico.

### **1.9. OBJETIVO GENERAL:**

Establecer el potencial fitoterapéutico de la especie de uso popular *Larrea ameghinoi*, mediante la evaluación de sus actividades antioxidantes y antimicrobianas, y el estudio de su perfil químico (compuestos fenólicos, flavonoides y la presencia de biomarcadores del género).

#### **1.9.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Determinar el efecto antioxidante *in vitro* de los extractos metanólicos de *L. ameghinoi* mediante un panel de ensayos estandarizados.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de *L. ameghinoi* frente a un panel de bacterias y hongos levaduriformes tipificados y aislados clínicos provenientes del Hospital Público Dr. Marcial Quiroga.
3. Cuantificar y determinar el perfil de los compuestos fenólicos y flavonoides mediante ensayos colorimétricos.
4. Analizar las muestras de los extractos metanólicos de *L. ameghinoi* mediante cromatografía en capa delgada con patrones de referencia de los compuestos principales.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS:**

### **2.1. Material vegetal:**

La especie en estudio fue colectada en dos localidades de la provincia de Río Negro, Maquinchao (MAQ) y una localidad cercana a Las Grutas (SAO) (Figura 6). La colecta se realizó con la colaboración de la Dra. Sede Silvana M., del Instituto de Botánica Darwinion CONICET-ANCEFN, San Isidro, Buenos Aires, Argentina.



**Figura 6:** Sitios de colecta del material vegetal de *L. ameghinoi* (Google Earth).

### **2.2 Preparación de extractos metanólicos:**

A diferencia de *L. nitida*, *L. cuneifolia* y *L. divaricata*, que crecen en grandes poblaciones desde Jujuy hasta Mendoza, las poblaciones de *L. ameghinoi* son pequeñas y muy escasas, difíciles de localizar y en estado de conservación. A sugerencia de la Dra. Sede, se colectaron solo dos muestras de 20 g de MAQ y SAO. Cada muestra fue tomada de al menos 5 ejemplares de la especie en estudio y se recolectó un ejemplar adicional de cada localidad para ser herborizado. Tras el secado del material vegetal al abrigo de la luz y a una temperatura de 25-30°C, se molieron 20 g de cada sitio de colecta y se colocaron en 10 mL de metanol para SAO y MAQ, respectivamente. Se realizaron extracciones sucesivas con metanol de calidad analítica a una temperatura ambiente, mediante sonicación (tres veces durante 30 minutos cada vez). Los extractos resultantes fueron sometidos a una etapa de filtración para eliminar los residuos sólidos. Posteriormente, se concentraron a presión reducida en evaporador rotatorio hasta peso constante (Figura 7), obteniéndose así los extractos metanólicos de *L. ameghinoi* (EMLa SAO

y EMLa MAQ) (Figura 8). Luego, se determinaron los rendimientos porcentuales obtenidos de cada muestra, se calculó como gramos de extracto obtenido en relación a los gramos de planta seca empleada.

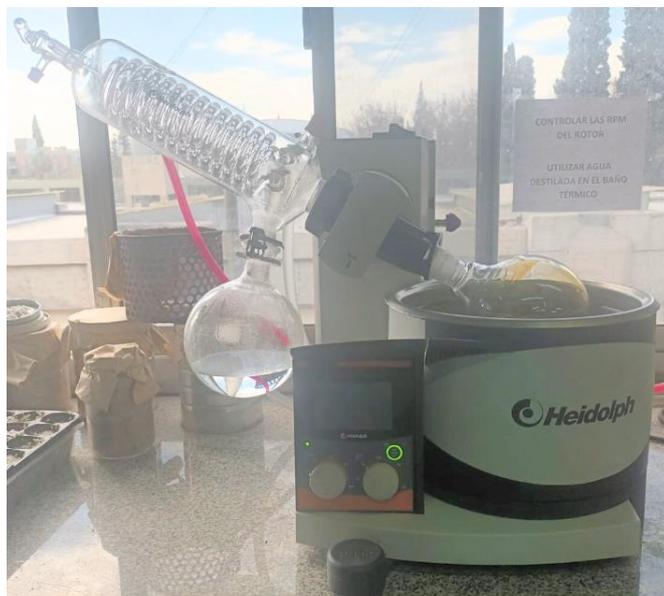


Figura 7: Evaporador rotatorio.



Figura 8: Extractos metanólicos de *L. ameghinoi*.

## 2.3. Actividad Biológica.

### 2.3.1. Actividad Antioxidante *in vitro* de los extractos metanólicos de *L. ameghinoi*:

#### 2.3.1.1. Actividad atrapadora del radical DPPH:

Para la búsqueda de agentes atrapadores de radicales libres se empleó el bioensayo “*in vitro*” de captura del radical DPPH (1,1-difenil-2- picrilhidracilo) de acuerdo a Gómez y col. (2021). La solución del radical DPPH (Aldrich) es de color violeta intenso, cuando la muestra captura este radical, la solución del mismo se decolora. La capacidad de captura del radical DPPH que poseen las muestras EMLa SAO y EMLa MAQ se cuantificó mediante la determinación del grado de decoloración. Para llevar a cabo la determinación, se preparó una solución metanólica fresca del radical DPPH, a una concentración de 1 mg/mL y se prepararon diluciones del extracto a ensayar en metanol (10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL). Se realizaron blancos del radical y de los extractos metanólicos de *L. ameghinoi*. Las soluciones de DPPH y las diluciones de EMLa SAO y EMLa MAQ se mezclaron y midieron a 520 nm, en lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC). Las determinaciones se realizaron por triplicado, por lo que

los resultados se expresan como la media  $\pm$  DE. Para calcular el porcentaje de la capacidad de captura del radical DPPH se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Decoloración de DPPH} = \left\{ 1 - \left( \frac{\text{Abs Muestra} - \text{Abs Blanco Muestra}}{\text{Abs DPPH}} \right) \right\} * 100$$

Dónde:

- Abs. Muestra: absorbancia de la muestra al reaccionar con la solución del radical.
- Abs. DPPH: absorbancia de la solución de DPPH.

La capacidad de captura del radical DPPH se determinó mediante el valor de IC<sub>50</sub>, definido como la concentración en EMLa SAO y de EMLa MAQ que capturan o eliminan el 50 % del radical DPPH.

### **2.3.1.2. Actividad antioxidante equivalente Trolox (TEAC):**

La decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup> se determinó usando el método descrito por Re y col. (1999). Éste permite la detección de la actividad antioxidante por decoloración aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos. Se trabajó con una solución del radical ABTS<sup>•+</sup> 7 mM en agua destilada, a la que se le agregó peroxodisulfato de potasio a una concentración final de 2,45 mM, para generar el catión radical ABTS<sup>•+</sup>. Esta solución se estabilizó durante 12-16 h a temperatura ambiente antes de ser utilizada y se la protegió de la luz. Luego, se tomó una alícuota y se diluyó con metanol hasta lograr un valor de absorbancia de  $0,8 \pm 0,1$  a 734 nm y se realizó la lectura en el Lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC) (Figura 9). A continuación, se tomaron 200  $\mu$ L de ABTS<sup>•+</sup> y se midió la absorbancia inicial ( $A_0$ ). Luego se agregaron 10  $\mu$ L de la solución EMLa SAO y EMLa MAQ, se incubaron en oscuridad y se midió absorbancia a los 6 minutos ( $A_1$ ) a 734 nm. Luego se calculó el  $\Delta$  Abs ( $A_0 - A_1$ ) para cada determinación. Se usó como estándar para la curva de calibración Trolox 1 mM en diferentes concentraciones (0; 0,1; 0,25; 0,50; 0,75 y 1 mM). Los resultados se expresaron como el poder de captura del radical ABTS<sup>•+</sup> determinado en mg ET/g de extracto metanólico (miligramos equivalentes a Trolox por gramo de extracto) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{TEAC (mg ET/g)} = \left( \frac{(\Delta \text{ Abs} - b/m) * \text{PM}_{\text{Trolox}} * V_{\text{C(L)}}}{C_{\text{(g/mL)}} * V_{\text{m(mL)}}} \right) * \text{FD}$$

Donde:

- $\Delta \text{ Abs}$ :  $A_0 - A_1$  a 734nm
- $b$ : ordenada de la ecuación de la curva de calibración
- $m$ : pendiente de la ecuación de la curva de calibración
- $\text{PM}$ : Peso molecular Trolox (250,29 g/mol)
- $V_{\text{C}}$ : volumen de solución stock colocado en la microplaca (litros)
- $C$ : Concentración de la muestra (g/mL)
- $V_{\text{m}}$ : volumen de muestra colocado en la microplaca (mL)
- $\text{FD}$ : Factor de dilución



**Figura 9:** Lector de microplaca (Thermo Scientific Multiskan FC).

### 2.3.1.3. Ensayo del poder reductor (FRAP):

Para determinar la habilidad del extracto para reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , se utilizó el ensayo del poder antioxidante del ión férrico (FRAP) que se basa en una reacción de transferencia de electrones, en donde una sal férrica  $\text{Fe}(\text{III}) (2,4,6\text{-tripiridi-s-triazina})_2\text{Cl}_3$  se usa como oxidante, en condiciones ácidas con un pH de 3,6, de acuerdo a lo informado por Benzie y Strain (1996). El extracto metanólico se ensayó a una concentración de 1 mg/mL. La solución FRAP se preparó con 42 mL de buffer de acetato (0,1 M pH= 3,6); 4,17 mL de  $\text{FeCl}_3$  (20 mM) y 4,16 mL de 2, 4, 6-tris (2-pyridil)-5-triazina (10 mM) disuelta en HCl (40 mM). La reacción se llevó a cabo directamente en la microplaca. Para la curva de calibración se usó como estándar Trolox en diferentes concentraciones (0; 0,1, 0,25; 0,50; 0,75; 1 mM). Posteriormente se incubó la mezcla 30 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas. Las muestras de los extractos se analizaron por triplicado, se informó la media  $\pm$  DE. Los resultados se expresaron, en relación al compuesto patrón utilizado (miligramos equivalentes a Trolox por gramo de extracto), utilizando la siguiente formula:

$$\text{FRAP (mg ET/g)} = \left( \frac{(\text{Abs} - b/m) * \text{PM}_{\text{Trolox}} * V_{\text{C(L)}}}{C_{(\text{g/mL})} * V_{\text{m(mL)}}} \right) * \text{FD}$$

Donde:

- Abs: absorbancia a 595nm
- b: ordenada de la ecuación de la curva de calibración
- m: pendiente de la ecuación de la curva de calibración
- PM: Peso molecular Trolox (250,29 g/mol)
- V<sub>C</sub>: volumen de solución stock colocado en la microplaca (litros)
- C: Concentración de la muestra (g/mL)
- V<sub>m</sub>: volumen de muestra colocado en la microplaca (mL)
- FD: Factor de dilución

## 2.3.2 Actividad Antimicrobiana de los extractos metanólicos de *L. ameghinoi*.

### 2.3.2.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima:

Para evaluar el efecto antibacteriano de los EMLa SAO y EMLa MAQ, se empleó el método de microdilución en caldo Müeller Hinton (CLSI, 2013). Se utilizaron cepas tipificadas y de aislados clínicos, para evaluar la actividad frente a microorganismos de diferente resistencia. Las cepas tipificadas utilizadas fueron: Gram (+): *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina ATCC 25923 y *S. aureus* resistente a meticilina ATCC 43300, Gram (-): *Escherichia coli* ATCC 25922 y de aislados clínicos: *S. aureus* MQ1, *S. aureus* MQ2 y *Salmonella* sp., provenientes del Laboratorio de Microbiología del Hospital Marcial Quiroga, San Juan. Las suspensiones de microorganismos se ajustaron en un espectrofotómetro con soluciones fisiológicas estériles para dar una densidad final de organismo de la escala McFarland de 0,5 ( $5 \times 10^5$  UFC/mL). Se añadió un volumen de 100  $\mu$ L de suspensión de inóculo a cada pocillo con excepción del control de esterilidad. Las muestras y el compuesto de referencia Imipenem-cilastatina (Imipecil®) se diluyeron en DMSO en el ensayo ( $\leq 1\%$ ). Las absorbancias a 620 nm se determinaron en un lector de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, E.E.U.U.). La concentración inhibitoria mínima (CIM) en  $\mu$ g/mL, se definió como la concentración más baja de extractos que inhibe el crecimiento bacteriano después del tiempo de incubación (18 a 24 h) a la absorbancia medida. La concentración bactericida mínima (CBM en  $\mu$ g/mL) de EMLa SAO y EMLa MAQ, se realizó de la siguiente manera: después de determinar la CIM, se extrajo una alícuota de 5  $\mu$ L de cada pocillo de la microplaca donde no se observó desarrollo microbiano y se sembró en una nueva microplaca de Petri con medio agar-Müeller Hinton. Las placas inoculadas se incubaron a 37°C y los CBM se registraron después de 24 h. El CBM se definió como la concentración más baja de cada muestra que resultó en una inhibición total del crecimiento.

Asimismo, la actividad antifúngica se evaluó mediante el método de microdilución en caldo Sabouraud-cloranfenicol (CLSI, 2008) frente a las cepas tipificadas: *C. tropicalis*-C131 y *Cryptococcus neoforman* ATCC 32264 y cepas provenientes de pacientes del Laboratorio de Microbiología del Hospital Marcial Quiroga, San Juan. Los microorganismos utilizados fueron: *C. albicans*-MQ 1924, *C. glabrata*-MQ 1, *C. parapsilosis*-MQ 1, *C. tropicalis*-MQ 1, los cuales fueron incubados durante 24 h para las cepas del genero *Candida* y 48 h para *Cryptococcus neoforman* y se determinaron los efectos antifúngico (CIMs) y fungicida (CFM) de EMLa SAO y EMLa MAQ, utilizando el mismo método que para bacterias.

## **2.4. Estudio Químico de los extractos metanólicos de *L. ameghinoi*.**

### **2.4.1. Contenido Total de Compuestos Fenólicos:**

El contenido de compuestos fenólicos totales de las muestras de EMLa SAO y EMLa MAQ se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu y se utilizó una curva de calibración (Singleton y col., 1999). Para realizar la curva de calibración se empleó como estándar ácido gálico (AG) en concentraciones de 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ppm. Las muestras se utilizaron a una concentración de 1 mg/mL (disueltas en MeOH). La reacción se llevó a cabo a pH básico (pH= 10) con una solución de carbonato de sodio. Pasados 30 minutos se midió el valor de absorbancia a 765 nm en un lector de microplacas. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DE (n = 3), expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto metanólico (mg EAG/g extracto metanólico). Las mediciones se realizaron por triplicado.

### **2.4.2. Contenido de Flavonoides:**

El contenido de flavonoides en EMLa SAO y EMLa MAQ se determinó por el método colorimétrico del tricloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) según la metodología Chang y col. (2002), con algunas modificaciones. Para la curva de calibración se utilizó como compuesto de referencia quercetina (Q) a diferentes concentraciones (0, 50, 100, 250, 350, 500 ppm). La absorbancia de la reacción se midió a 435 nm en un lector de microplaca. El contenido de flavonoides se calculó a partir de la curva de calibración como equivalentes de quercetina por gramo de extracto metanólico (mg EQ/g EMLa). Las mediciones se realizaron por triplicado para cada muestra y los resultados se informan como la media  $\pm$  DE.

### **2.4.3. Análisis Químico mediante CCD:**

La técnica CCD se basa en la separación de los analitos mediante las diferencias de velocidad a la que éstos son transportados por una fase móvil líquida (solvente) a través de una fase fija o estacionaria (la placa de CCD). La separación de los componentes de la muestra se da principalmente por el fenómeno de la adsorción de tal modo que un compuesto de la fase líquida entra en contacto con el sólido adsorbente y se adhiere a la superficie del mismo mediante una fuerza física, sin implicar intercambio de electrones (Sgariglia y col., 2010; Corzo, 2019). Los extractos metanólicos obtenidos de las dos muestras de *Larrea* se evaluaron por CCD desarrollada en cromatoplasmas con sílica gel 60 F254 Merck, empleando una mezcla

de acetato de etilo: éter de petróleo (AcOEt:EP, 2.5:7.5) como fase móvil. Posteriormente, la placa fue observada bajo lámpara de luz ultravioleta (CAMAG, Suiza) a 366 nm y 254 nm, y fue revelada con los siguientes reactivos:

#### **2.4.3.1. Vapores de yodo resublimado:**

Se dispuso el yodo sólido en una cámara cerrada y posteriormente se expuso la placa de CCD a vapores de yodo. La coloración amarillo-marrón al visible indicó la presencia de doble enlaces conjugados (Sherma y col., 2003).

#### **2.4.3.2. Reactivo FeCl<sub>3</sub> (Fenoles):**

Se roció una solución etanólica al 1% en cloruro férrico sobre la placa de CCD. La coloración verde al visible indicó que la prueba es positiva para núcleos químicos tipo Fenoles (Sherma y col., 2003).

#### **2.4.3.3. Reactivo AlCl<sub>3</sub>/EtOH (Flavonoides):**

Se roció una mezcla de Cloruro de aluminio al 1% en etanol sobre la placa de CCD, posteriormente se observó a la luz ultravioleta. La fluorescencia verde a la luz ultravioleta a 360 nm indicó la presencia de para núcleos químicos tipo flavonoides (Harborne y col., 2013).

Además de los reactivos antes mencionados, se utilizaron como patrones de referencia cinco (5) compuestos aislados previamente del exudado de *Larrea nitida* Cav. (C1-C5) (Agüero y col., 2011), los cuales son característicos del género. Todos los solventes empleados fueron calidad analítica.

### **2.5. Análisis de los datos:**

Los resultados fueron procesados mediante el paquete estadístico InfoStat versión Estudiantil 2.0 (Balzarini y col., 2008). Se analizó la normalidad de los datos con el Test Shapiro-Wilks. Posteriormente se realizó el análisis de la varianza (Kruskal Wallis) para determinar diferencias significativas entre las dos muestras analizadas (SAO y MAQ), para los ensayos antioxidantes y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la actividad antioxidante y antibacteriana, así como también el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides y el perfil de los constituyentes mayoritarios, biomarcadores del género y moléculas bioactivas de las muestras de *L. ameghinoi* SAO y MAQ. A partir de la preparación de los extractos metanólicos, se obtuvieron valores de rendimiento de 12,79 % p/p para EMLa SAO y 16,69 % p/p para EMLa MAQ.

#### **3.1. Actividad Biológica.**

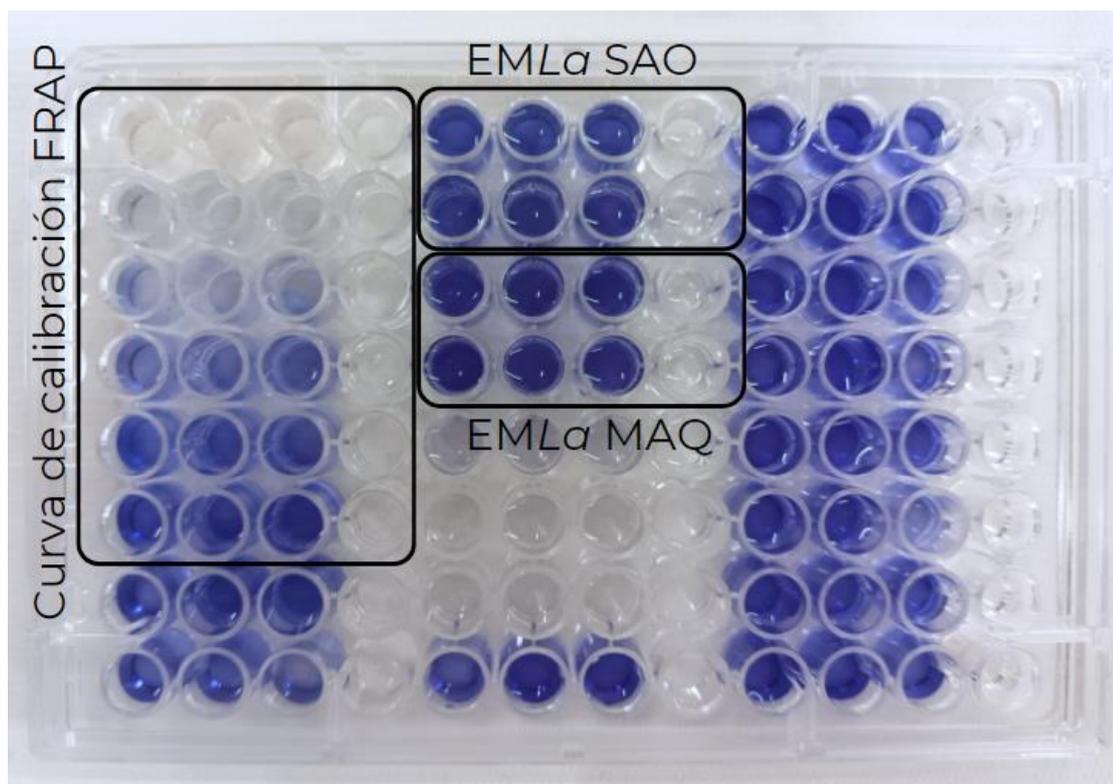
##### **3.1.1. Actividad Antioxidante de los extractos de *L. ameghinoi*.**

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos sobre la actividad antioxidante descrita en Materiales y Métodos de los EMLa SAO y EMLa MAQ (Tabla 1).

**Tabla 1:** Capacidad antioxidante los EMLa. Los datos se presentan como el valor de la media  $\pm$  DE. Medias con letras común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

<b>Ensayo</b>	<b>EMLa SAO</b>	<b>EMLa MAQ</b>
<b>DPPH</b> (IC <sub>50</sub> $\mu$ g/mL)	10 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	10,05 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>
<b>FRAP</b> (mg ET/g extracto metanólico)	28,94 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>	28,7 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>
<b>TEAC</b> (mg ET/g extracto metanólico)	54,84 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	54,88 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>

Respecto a la actividad atrapadora del radical DPPH evaluada, se observó una potente actividad capturadora de radical libre DPPH, con un IC<sub>50</sub>=10  $\mu$ g/mL para EMLa SAO, el cual fue muy similar al obtenido para el EMLa MAQ. Con respecto a la capacidad del poder reductor FRAP y el ensayo equivalente a Trolox, los dos extractos metanólicos de *L. ameghinoi* exhibieron actividad antioxidante con valores similares (28,94 mg ET/g EMLa SAO y 28,7 mg ET/g EMLa MAQ para ensayo FRAP (Figura 10). Cabe destacar que no existen diferencias significativas para la actividad antioxidante exhibida por las dos muestras (SAO y MAQ) de *Larrea ameghinoi* (valor de  $p > 0,05$ ).



**Figura 10:** Placa correspondiente a ensayo FRAP de las dos muestras evaluadas.

Existen numerosos estudios realizados sobre diferentes preparados de especies de *Larrea* que evidencian la capacidad antioxidante de este género. Entre ellos, Turner y col. (2011) determinaron que el extracto acuoso de *L. divaricata* presenta una importante actividad eliminadora de radicales DPPH con  $IC_{50}$  de 13,18  $\mu\text{g/mL}$ . En otro informe llevado a cabo por Gómez y col. (2021), se observó que los exudados resinosos de *L. divaricata* y *L. nítida* presentan una actividad de captura del radical DPPH con valores de  $IC_{50}$  alrededor de 8,4  $\mu\text{g resina/mL}$ . Estos datos se corresponden con los obtenidos en este trabajo para *L. ameghinoi*. Cabe destacar que en un estudio previo realizado por Cabrera (2023) se informaron valores de  $IC_{50}$  de 150  $\mu\text{g/mL}$  superiores a los obtenidos en este trabajo, para esta especie colectada en zonas próximas al Área Natural Protegida “Meseta de Somuncura” de la provincia Río Negro.

Por otra parte, Moreno y col. (2018) informaron que los extractos etanólicos de partes aéreas (tallos y hojas) de *Larrea divaricata* presentan mayor actividad en el ensayo de decoloración del radical  $ABTS^{*+}$  ( $IC_{50} = 2,68 \mu\text{g/mL}$ ) en comparación con los extractos de *L. cuneifolia* y *L. nítida*, presentando valores de 4,10  $\mu\text{g/mL}$  y 4,50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. En investigaciones posteriores realizadas sobre las mismas especies, Moreno y col. (2020) determinaron que los extractos etanólicos de *L. divaricata* presentaron mayor efecto de captura del radical  $ABTS^{*+}$  (2,7  $\mu\text{mol Trolox/g}$  de extracto), seguido de los extractos de *L. cuneifolia* y

*L. nitida* (3,9  $\mu\text{mol Trolox/g}$  de extracto y 4,5  $\mu\text{mol Trolox/g}$  de extracto). Asimismo, Carabajal y col. (2017), informaron que las infusiones de partes aéreas de *L. divaricata* fueron más activas que las de *L. cuneifolia* para el ensayo ABTS<sup>•+</sup> ( $\text{IC}_{50}$  de 10,2  $\mu\text{g EAG/mL}$  y 71,2  $\mu\text{g}$  infusión liofilizada/mL, respectivamente). Del mismo modo, Lorenzo y col. (2020), realizaron ensayos antioxidantes (DPPH y FRAP) sobre extractos etanólicos de hojas de dos especies del género *Larrea*, y encontraron que los extractos de *L. cuneifolia* son más activos ( $\text{IC}_{50} = 97,80 \pm 12,50$   $\mu\text{g/mL}$  para captura del radical DPPH y  $74,21 \pm 8,31$  mg ET/g extracto para ensayo de FRAP), con diferencias significativas respecto a los extractos etanólicos de *L. divaricata* ( $67,40 \pm 10,58$   $\mu\text{g/mL}$   $49,14 \pm 5,46$  mg ET/g extracto etanólico, respectivamente). En cuanto a la actividad antioxidante en el ensayo TEAC, no se observaron diferencias significativas entre las dos especies evaluadas del género *Larrea*.

Los resultados de las investigaciones mencionadas previamente muestran concordancia con los obtenidos en el presente estudio. Asimismo, se destaca el potencial antioxidante de las muestras evaluadas, las cuales exhibieron mayor efecto con respecto a informes previos de la misma especie.

### **3.1.2. Actividad Antimicrobiana de los extractos metanólicos de *L. ameghinoi*.**

La evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de EMLa SAO y EMLa MAQ se llevó a cabo mediante la determinación de los valores de CIM, CBM y CFM. Se analizaron los resultados obtenidos (Tabla 2), de acuerdo a lo informado por Tamokou y col. (2017), donde se establece que un extracto de especies vegetales se considera muy activo si presenta valores de  $\text{CIM}_s < 100$   $\mu\text{g/mL}$ , significativamente activo si  $100 \leq \text{CIM}_s \leq 512$   $\mu\text{g/mL}$ , moderadamente activo si  $512 < \text{CIM}_s \leq 2048$   $\mu\text{g/mL}$  y poco activo si  $\text{CIM}_s > 2048$   $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 2:** Actividad antimicrobiana de las muestras SAO y MAQ frente a cepas tipificadas y aislados clínicos de bacterias y levaduras. Referencias: Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Bactericida Mínima (CBM), Concentración Fungicida Mínima (CFM), extracto metanólico de *Larrea ameghinoi* (EMLa). Los valores se expresan en µg/mL de extracto metanólico.

Bacterias	EMLa SAO		EMLa MAQ		Compuesto de Referencia	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
					<i>Imipecil</i>	
<b>GRAM (+)</b>						
<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina ATCC 25923	125	250	>1000	>1000	0,250	0,250
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina ATCC 43300	125	>1000	>1000	>1000	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i> -MQ 1	125	>1000	>1000	>1000	2	2
<i>Staphylococcus aureus</i> -MQ 2	125	250	>1000	>1000	0,250	0,250
<b>GRAM (-)</b>						
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1000	>1000	>1000	>1000	0,625	0,625
<i>Salmonella sp.</i>	1000	>1000	>1000	>1000	0,5	1
Levaduras	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
					<i>Ketoconazol</i>	
<i>Candida albicans</i> -MQ 1924	500	>1000	1000	>1000	0,625	1,25
<i>C. glabrata</i> -MQ 1	>1000	>1000	1000	>1000	2,5	>2,5
<i>C. tropicalis</i> -C131	125	500	250	>1000	0,31	0,625
<i>C. parapsilopsis</i> -MQ 1	250	>1000	500	>1000	0,156	0,156
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 32264	>1000	>1000	>1000	>1000	0,62	2,5
<i>C. tropicalis</i> -MQ1	500	>1000	>1000	>1000	0,62	0,62

El EMLa SAO fue significativamente activo frente a las cepas de bacteria Gram (+) tipificadas: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ATCC 43300 y de aislados clínicos: *Staphylococcus aureus*-MQ1 *Staphylococcus aureus*-MQ2 con valores de CIM = 125 µg/mL. Los valores de CBM fueron de

250 µg/mL frente a las cepas *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus*-MQ2. Las cepas Gram (-) evaluadas fueron menos sensibles a los extractos de *L. ameghinoi* (CIM = 1000 µg/mL).

Un estudio realizado por Zampini y col. (2007), informó que los extractos etanólicos de partes aéreas de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* son significativamente activos contra distintas cepas de *E. coli*. (CIM=50µg/mL). Asimismo, Moreno y col. (2020) analizaron el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos de tres integrantes al género *Larrea* (*L. nítida*, *L. divaricata* y *L. cuneifolia*). Estas especies resultaron moderadamente activas frente a *E. coli*, presentando una CIM de 800 µg/mL y CBM > 1000 µg/mL. Este reporte se condice con los resultados obtenidos en el presente trabajo, para las dos muestras de *L. ameghinoi*, las cuales exhibieron una acción moderadamente activa contra la cepa de *E. coli*, con valores de CIM = 1000 µg/mL para EMLa SAO y CIM > 1000 µg/mL para EMLa MAQ, además ambas muestras presentaron valores de CBM > 1000 µg/mL para su acción bacteriostática.

Gómez y col. (2021) describen la actividad antimicrobiana de los exudados resinosos de *L. divaricata* y *L. nítida*, los cuales mostraron una fuerte actividad antibacteriana frente a *E. coli*, siendo la más sensible a ambas resinas *E. coli* MQ 586 (CIM = 62,5 µg/mL), mientras que otras cepas del mismo género (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* MQ 11009, *E. coli* MQ 11068 y *E. coli* MQ 11062), mostraron efecto menor, con valores de CIM entre 250 y 500 µg/mL. Además, estos exudados resinosos demostraron ser significativamente activos frente a las bacterias Gram (+) *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina ATCC 25923 y *S. aureus* resistente a meticilina ATCC 43300, con valores de CIM de 16-32 µg de resina/mL.

En adición a lo expuesto, Martín y col. (2013), evaluaron la actividad antibacteriana del extracto metanólico crudo (EMC) y sus fracciones (hexano (H), diclorometano (DCM), acetato de etilo (EA) y etanol (EtOH)) obtenidos de *Larrea tridentata*. El efecto de las muestras fue más efectivo inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram positivo en comparación con las bacterias Gram negativo, principalmente para las fracciones EMC, DCM y EA. La fracción EA mostró la mayor actividad antibacteriana contra el aislado de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina con un valor de CIM de 31,3 µg/mL, inferior al antibiótico de referencia tetraciclina (64 µg/mL). También se obtuvieron valores bajos de CIM (62,5 µg/ml) para la fracción EMC y DCM.

Existen trabajos que relacionan la composición química de diferentes preparaciones de plantas medicinales, las proporciones de los compuestos principales y la actividad antimicrobiana. De acuerdo a Martín y col. (2013), la composición química de las fracciones EMC y EA presentaron las mayores concentraciones de quercetina, kaempferol y NDGA mostraron mayor inhibición microbiana. Estos compuestos tienen importantes actividades biológicas y podrían ser responsables de al menos parte de la actividad antibacteriana de las fracciones EMC, DCM y EA. También se han aislado y caracterizado diversos compuestos del extracto de *Larrea tridentata*, incluyendo tres lignanos y cuatro flavonoides. Estos compuestos fueron evaluados frente a 16 especies/cepas bacterianas. Además, se determinó que el lignano 3'-Demetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina es el principal responsable de la actividad antibacteriana de *L. tridentata*. Asimismo, lignanos como el ácido dihidroguaiarético, la 4-epi-larreatricina y el flavonoide 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona también mostraron cierto nivel de actividad antibacteriana (Favela-Hernández y col., 2012).

Con respecto a la actividad antifúngica, EMLa SAO y EMLa MAQ mostraron ser moderadamente activas en su acción frente a un panel de levaduras de incidencia clínica, provenientes de pacientes del Laboratorio de Microbiología del Hospital Marcial Quiroga, como fue descrito en Materiales y Métodos. El EMLa SAO presentó mayor actividad antifúngica que EMLa MAQ (con valores de CIM<sub>s</sub> entre 125-500 µg/mL y CIM<sub>s</sub> entre 250-1000 µg/mL y >1000 µg/mL, respectivamente).

La cepa levaduriforme *C. tropicalis* C131 fue la más sensible a ambos extractos (EMLa SAO, CIM = 125 µg/mL y EMLa MAQ, CIM = 250 µg/mL), seguida de las cepas *C. parapsilopsis*-MQ 1 (CIM = 250 µg/mL para EMLa SAO y CIM = 500 µg/mL para EMLa MAQ) y de las cepas de *C. albicans* 1924 y *C. tropicalis*-MQ 1 con valores de CIM = 500 µg/mL para EMLa SAO y valores de CIM = 1000 µg/mL frente al EMLa MAQ.

En cuanto a la acción fungicida se observó que frente a *C. tropicalis* C131 el extracto de SAO presentó una CFM = 500 µg/mL, mientras que para el resto de las levaduras evaluadas frente a ambos extractos no mostraron actividad fungicida (CFM > 1000 µg/mL).

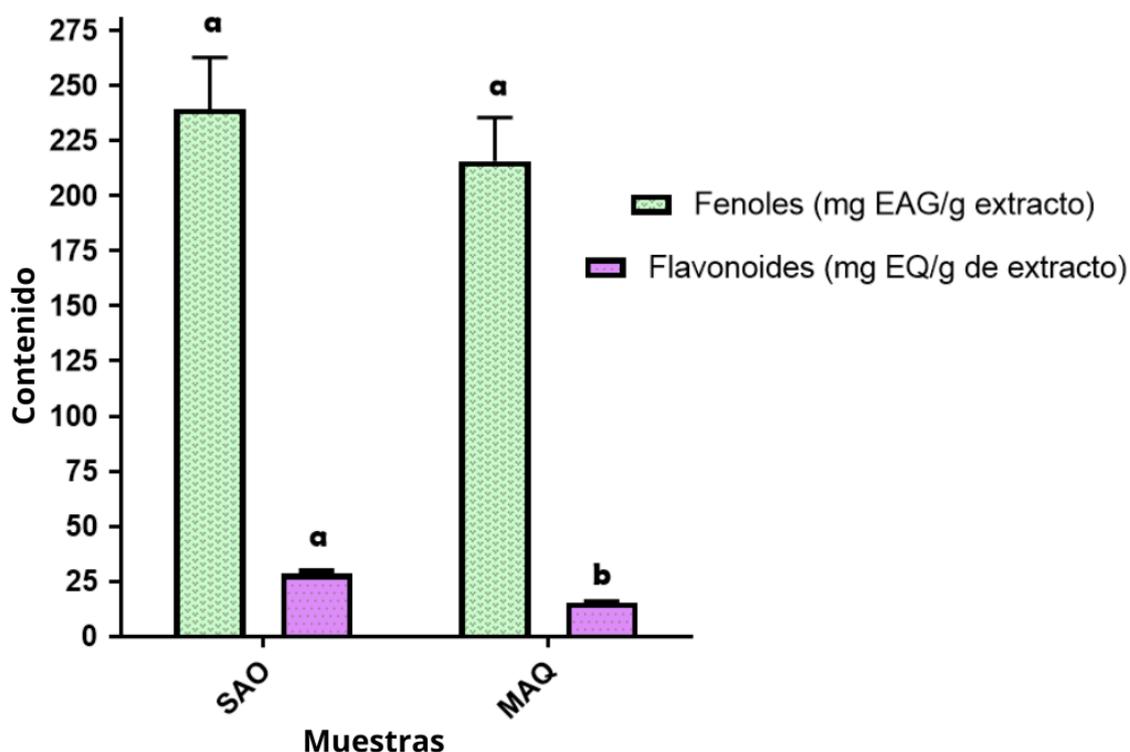
De acuerdo a lo informado por Agüero y col. (2011), el extracto diclorometano de *L. nítida* presentó una fuerte actividad antifúngica contra levaduras del género *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231 - C125-126-127-128-129-130, *C. glabrata* C115, *C. parapsilopsis* C124, *C. lusitaniae* C131, *C. colliculosa* C122, *C. krusei* 117, *C. kefir* C123 y *C. tropicalis* C131) con valores de CIM entre los 62,5 µg/mL y los 125 µg/mL, además presentó una fuerte actividad

fungicida con valores de CFM entre 62,5  $\mu\text{g/mL}$  y 250  $\mu\text{g/mL}$ . Estos datos, revelan una mayor acción fungicida y fungistática del extracto de *L. nítida*, en comparación con los extractos de *L. ameghinoi* evaluados en el presente estudio. Estos resultados indican que los EMLa presentan algunas similitudes y diferencias en sus perfiles químicos que justifican los resultados obtenidos en las actividades antimicrobianas evaluadas.

### 3.2. Estudio Químico.

#### 3.2.1. Contenido Total de Compuestos Fenólicos y Flavonoides.

El contenido de compuestos fenólicos y flavonoides analizados en los extractos metanólicos de *L. ameghinoi* se presentan en la Figura 11. Se observa similitud en los valores obtenidos para las dos muestras de *L. ameghinoi* respecto al contenido de fenólicos totales (valores de  $239,5 \pm 23,3$  mg EAG/g de extracto para SAO y de  $215,6 \pm 19,85$  mg EAG/g de extracto para MAQ). Respecto al contenido de compuestos flavonoides, se determinó que existen diferencias significativas para las dos muestras evaluadas, obteniendo valores de  $28,44 \pm 1,29$  y  $15,28 \pm 0,29$  mg EQ/g de extracto para SAO y MAQ respectivamente ( $p > 0,05$ ).



**Figura 11:** Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides de las dos muestras evaluadas (SAO y MAQ) de *Larrea ameghinoi*. Letras iguales no indican diferencia significativa  $p > 0,05$

Se conoce que el contenido de compuestos bioactivos evaluados en especies del género *Larrea*, varía significativamente según el tipo de preparado que se realice. En infusiones y decocciones florales de *L. divaricata* (2 g de flor seca en 100 mL de agua destilada) se informaron valores de compuestos fenólicos totales de 83,18 y 135,56 mg EAG/100 mL de infusión y contenido de flavonoides de 3,46 y 5,88 mg EQ/100 mL de infusión de flavonoides, respectivamente (Isla y col., 2021).

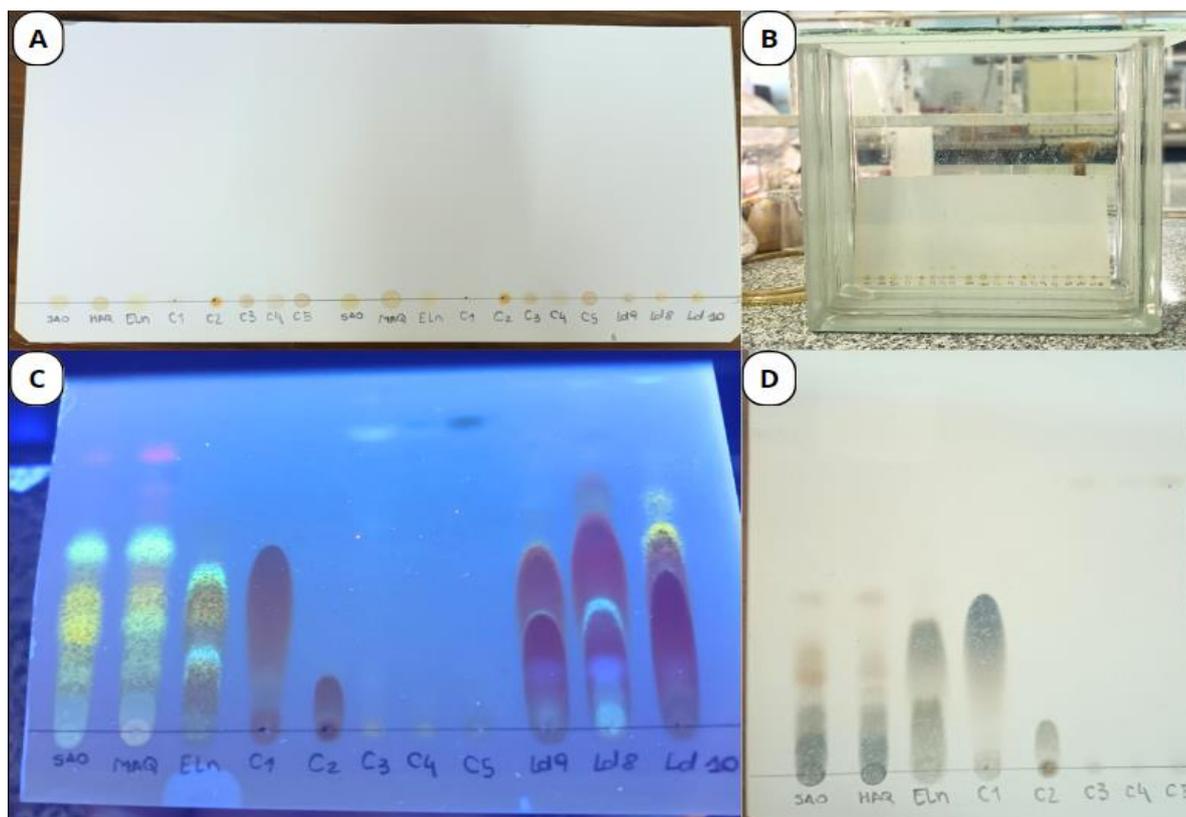
En un estudio previo, Carabajal y col. (2017) determinaron que las infusiones de partes aéreas (tallos y hojas) de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* presentaron valores máximos de fenólicos totales de 781,0 y 1042,0 mg EAG/L y 34,2 y 34,3 mg EQ/L de flavonoides, respectivamente. De la misma manera, se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales para infusiones de partes aéreas de *L. divaricata* (2 g de flor seca en 200 mL de agua destilada), mostrando un valor de 255,8 mg EAG/200 mL de infusión, y para flavonoides de 15,0 EQ/200 mL de infusión. Por otro lado, lo reportado para *L. cuneifolia* mostró valores menores (205,0 mg EAG/200 mL de infusión) de compuestos fenólicos totales y de 9,7 EQ/200 mL de infusión de flavonoides (Carabajal y col., 2020).

Por su parte, Gómez y col. (2021) evidenciaron que las resinas de *L. nitida* presentan un valor de 459 mg EAG/g ReLn, del cual aproximadamente el 8,8% corresponde a flavonoides (40,8 mg EQ/g ReLn).

El único estudio previo realizado sobre *L. ameghinoi* informó un contenido de compuestos fenólicos menor al obtenido en este trabajo ( $78,4 \pm 1,3$  mg EAG/g) (Cabrera, 2023). Sin embargo, los resultados obtenidos en las investigaciones antes mencionadas, realizadas sobre distintos preparados de *Larrea*, son acordes con los presentados en este estudio.

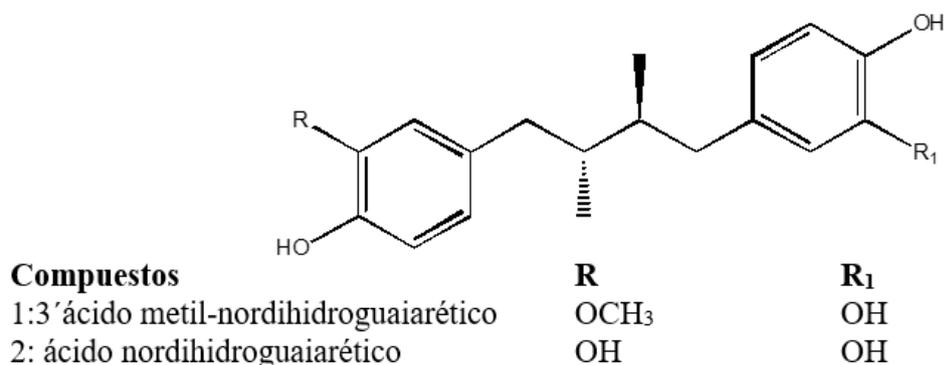
### **3.2.2. Análisis químico preliminar de los extractos metanólicos de *L. ameghinoi*:**

El análisis cromatográfico en capa delgada mostró la presencia de flavonoides de polaridad media y compuestos fenólicos polares, destacándose la presencia del ácido nordihidroguaiarético (NDGA) y flavonoides (Figura 12).



**Figura 12:** Cromatografía en capa delgada de las muestras SAO y MAQ. A: Placa sembrada con las muestras SAO, MAQ y patrones de referencia (ELn: exudado de *Larrea nitida*; C1: compuesto estándar ácido metil nordihidroguaiarético; C2: compuesto estándar ácido nordihidroguaiarético; C3, C4 y C5: compuestos aislados de ELn; Ld 8, Ld 9 y Ld 10: fracciones obtenidas del exudado de *L. divaricata*). B: Placa en cuba. C: Placa con reactivo  $\text{AlCl}_3/\text{EtOH}$ . D: Placa con reactivo  $\text{FeCl}_3$ .

A continuación se presenta la estructura base de los lignanos, estos compuestos (C1 y C2) fueron aislados e identificados como biomarcadores de la especie *L. nitida* (Butassi y col., 2015), empleados en el análisis químico de *L. ameghinoi* mediante CCD (Figura 13).



**Figura 13:** Compuestos 1 y 2 de aislados de la especie *L. nitida*. Imagen extraída de Butassi y col., 2015.

Numerosos estudios han reportado la presencia de NDGA en las distintas especies de este género, entre ellos, Turner y col. (2011) determinaron mediante HPLC el contenido de NDGA de las hojas de *L. divaricata* (0,32 g % p/p), también analizaron el contenido de este compuesto en

la decocción de esta especie e indicaron una concentración de 3,2 µg/mL de NDGA. Sumado a lo expuesto, Miccuci y col. (2011) confirmaron la presencia de NDGA en el extracto acuoso de *L. divaricata* (0,119 ± 0,018 g % del peso seco de la planta), mediante el tiempo de retención y análisis espectral UV del pico frente al estándar. Asimismo, Peralta (2019) analizó el extracto acuoso de *L. divaricata* y determinó la presencia de NDGA y de flavonoides como rutina. De la misma manera, se identificaron en la decocción de esta especie otros compuestos como el ácido fenólico 4-hidroxibenzoico (4-HBA), junto con flavonoides como rutina, pero en menores cantidades (Peralta y col., 2020).

Además, existen reportes sobre la presencia de NDGA en las infusiones de las partes aéreas de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* (Carabajal y col., 2017) y se han analizado por aislamiento bioguiado y cromatografía (columna en gel de fase inversa y HPLC), extractos etanólicos de tallos y hojas de *L. nitida*, donde se determinaron seis compuestos: dos nuevas espirocetonas, nitidaonas A y B, un nuevo análogo de bifenilo, nitidaol, NDGA, 7,3',4'-tri-*O*-metilquercetina y ayanina (Ahn y col., 2018). En un estudio reciente de Gómez y col. (2021), se informó la composición química de los exudados resinosos de *L. divaricata* y *L. nitida*, obtenida mediante HPLC-MS/MS, donde se detectaron e identificaron provisoriamente cuarenta y un compuestos fenólicos. De estos, uno era un ácido fenólico, ocho eran flavonoides (entre ellos Axillarina, Rhamnetina, Isorhamnetina y Kaempferol), y veintinueve propuestos tentativamente como lignanos. De ellos, un número importante fueron asignados como NDGA y sus derivados.

Cabe destacar que la presencia NDGA en los extractos metanólicos de las muestras *Larrea ameghinoi* evaluadas en el presente trabajo coincide con la basta información reportada sobre la presencia de esta molécula en el género. Además, es importante resaltar que los flavonoides y el NDGA son fitoquímicos ampliamente descritos en la literatura científica como agentes con propiedades antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos, antiviral, anticancerígena y como protectores contra trastornos neurodegenerativos (Gnabre y col., 2015; Moreno y col., 2018; Carabajal y col., 2020; Skrajda-Brdak y col., 2020).

Considerando lo antes expuesto y teniendo en cuenta la hipótesis de trabajo propuesta, podemos expresar que la especie *Larrea ameghinoi* colectada en dos zonas de la provincia de Río Negro Argentina, presenta potencial uso fitoterapéutico determinado mediante la evaluación de sus actividades antioxidante, antimicrobiana y la identificación de compuestos biomarcadores del género *Larrea*, sin embargo es necesario un estudio más exhaustivo incluyendo estudios de toxicidad que permitan sustentar la hipótesis planteada.

#### **4. CONCLUSIONES**

En el marco de esta Tesis de trabajo, se investigó sobre las actividades antioxidantes y antimicrobianas, y el estudio del perfil químico (compuestos fenólicos, flavonoides y la presencia de biomarcadores de género) para determinar el potencial uso fitoterapéutico de la especie *Larrea ameghinoi*, colectada en Maquinchao (MAQ) y Las Grutas (SAO) de la provincia de Río Negro, Argentina. Pudo establecerse que:

- Los extractos metanólicos de *L. ameghinoi* presentaron efecto antioxidante, determinado por ensayos de captura de los radicales libres (ABTS<sup>•+</sup> y DPPH), y el ensayo del poder reductor (FRAP).
- Hubo similitud en el contenido de fenólicos totales en los dos extractos de *L. ameghinoi*, mientras que en relación al contenido de compuestos flavonoides, se determinó que la muestra colectada en SAO evidenció un contenido superior a la muestra colectada en MAQ.
- El análisis preliminar del perfil químico determinado por CCD indicó la presencia de compuestos fenólicos polares y flavonoides de polaridad media, destacándose la presencia del ácido nordihidroguaiarético como compuesto mayoritario, biomarcador del género *Larrea*, el cual podría ser responsable de las propiedades biológicas determinadas en este estudio.
- El extracto metanólico SAO exhibió una significativa actividad antimicrobiana frente a cepas Gram (+): *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ATCC 43300 y de aislados clínicos: *Staphylococcus aureus*-MQ 1 *Staphylococcus aureus*-MQ 2.
- Los EMLa SAO y EMLa MAQ mostraron actividad antifúngica frente a *C. tropicalis*-C 131, seguida de las cepas de aislados clínicos *C. parapsilopsis*-MQ 1 y de las cepas de *C. albicans* 1924 y *C. tropicalis*-MQ 1.

Es relevante destacar que el presente trabajo representa un estudio preliminar sobre la actividad biológica y el perfil químico de *Larrea ameghinoi*, por lo que el mismo establece las bases para dar sustento científico al uso de esta especie en la medicina tradicional, considerando la necesidad de estudios más exhaustivos que confirmen desde otras perspectivas sus efectos fitoterapéuticos

## **5. PROYECCIONES**

Sobre la base del objetivo propuesto de este trabajo, en relación a **establecer el potencial fitoterapéutico de la especie de uso popular *Larrea ameghinoi*, mediante la evaluación de sus actividades antioxidantes y antimicrobianas, y el estudio de su perfil químico (compuestos fenólicos, flavonoides y la presencia de biomarcadores del género)**, se plantean las siguientes proyecciones a futuro:

- Realizar estudios químicos más exhaustivos de diferentes preparados mediante la utilización de técnicas de caracterización química (HPLC MS/MS) y aislamiento de los principales compuestos de *L. ameghinoi*.
- En cuanto a la actividad antioxidante determinada por ensayos de captura de los radicales libres ABTS<sup>•+</sup> y DPPH y el ensayo del poder reductor (FRAP), resulta relevante adicionar ensayos que sustenten el efecto antioxidante de la especie tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*.
- Un estudio químico más exhaustivo permitiría identificar los posibles compuestos bioactivos con efecto antimicrobiano presentes en el extracto. Además, ampliar el panel de cepas evaluadas determinaría el alcance de la inhibición que los extractos presentan.
- Resulta relevante determinar desde otras perspectivas (ensayos de toxicidad, ensayos *in vivo*) los posibles efectos fitoterapéuticos que puede presentar esta especie.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

Alarcón, A. M., Astudillo, P., Barrios, S., & Rivas, E. (2004). Política de Salud Intercultural: Perspectiva de usuarios mapuches y equipos de salud en la IX región, Chile. *Revista médica de Chile*, 132(9), 1109-1114.

Aliscioni S. S., & Torretta J. P. (2017). Malpighiaceae, en F. O. Zuloaga & M. J. Belgrano. *Flora Vascular de la República Argentina*, vol. 17: 163-205. Buenos Aires: Estudio Sigma S.R.L.

Alonso, J. & Desmarchelier, C. (2015). Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud.

Agüero, M. B., Svetaz, L., Sánchez, M., Luna, L., Lima, B., López, M. L., Zacchino, S., Palermo, J., Wunderlin, D., Feresina, G. E., & Tapia, A. (2011). Propolis andino argentino asociado a la planta medicinal *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). Caracterización HPLC-MS y GC-MS y actividad antifúngica. *Toxicología Química y Alimentaria*. 49, (9), 1970-1978.

Ahn, J., Pei, Y., Chae, H. S., Kim, S. H., Kim, Y. M., Choi, Y. H. & Chin, Y. W. (2018). Spiroketones and a Biphenyl Analog from Stems and Leaves of *Larrea nitida* and Their Inhibitory Activity against IL-6 Production. *Molecules*, 23(2), 302.

Atef, N. M., Shanab, S. M., Negm, S. I., & Abbas, Y. A. (2019). Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-11.

Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A., Robledo C.W. (2008). Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.

Banwo, K., Olojede, A. O., Adesulu-Dahunsi, A. T., Verma, D. K., Thakur, M., Tripathy, S., Singh S., Patel A., Kumar A., Aguilar C. & Utama, G. L. (2021). Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: A review on recent trends. *Food Bioscience*, 43, 101320.

Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L., Echavarría-Cháirez, F., Delgadillo-Ruiz, O., & Meza-López, C. (2018). Chemical composition and FTIR of ethane extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens*. *Agrociencia*, 52(3), 309-321.

Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2014). Oxidative, nitrosative, and chlorinative stress: biomarkers. *Studies on Psychiatric Disorders* (pp. 1-39). New York, NY: Springer New York.

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., & Crow S. E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev.*, 94, 329–354.

Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology*, 45(7-8), 466-472.

Butassi, E., Svetaz, L.A., Ivancovich, J.J., Feresin, G.E., Tapia, A., & Zacchino, S.A. (2015). Synergistic mutual potentiation of antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav. and *Larrea nitida* Cav. extracts in clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Phytomedicina*, 22, 666–678, doi:10.1016/j.phymed.2015.04.004.

Cabrera, A. A. (2023). Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química. *Tesis Doctoral en la Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica, Licenciatura en Ciencias del Ambiente*.

Carabajal, M. P., Isla, M. I., Borsarelli, C. D., & Zampini, I. C. (2020). Influence of *in vitro* gastro-duodenal digestion on the antioxidant activity of single and mixed three “Jarilla” species infusions. *Journal of Herbal Medicine*, 19, 100296.

Carabajal, M. P., Isla, M. I., & Zampini, I. C. (2017). Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of herbal teas from native plants used in traditional medicine in Argentina. *South African Journal of Botany*, 110, 258-265.

Chang, C. C., Yang, M.Y., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.*, 10, 178-182.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement; CLSI document M100-S23; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2013; ISBN 1-56238-865-7.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard (CLSI document M27-A3). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 1–25.

Colina Ramos, A. C. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de “*Muehlenbeckia hastulata* (JE Sm) IM Johnst” de la zona de Yucay (Cusco).

Corzo, A. (2019). Técnicas de análisis en química orgánica: Cromatografía. *Universidad Nacional de Santiago del Estero–UNSE*, 45.

Davicino, R., Martino, R., & Anesini, C. (2011). *Larrea divaricata* Cav.: Scientific evidence showing its beneficial effects and its wide potential application. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(2), 92-103.

Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.

Favela-Hernández, J. M. J., García, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., & Camacho-Corona, M. R. (2012). Lignanos y flavonoides antibacterianos y antimicobacterianos de *Larrea tridentata*. *Fitoter. Res.*, 26, 1957-1960.

Ferreira, M. L. F., Serra, P., & Casati, P. (2021). Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiologia Plantarum*, 173(3), 736-749.

Gallia, M. C. (2023). Aprovechamiento de especies vegetales de la región norpatagónica para la obtención de antioxidantes naturales mediante procesos ambientalmente favorables.

Gastaldi, B. (2019). Análisis de los compuestos fenólicos y volátiles de plantas medicinales y aromáticas del noroeste de la Patagonia Argentina, estudio de las actividades antioxidante y citotóxica. *Tesis doctoral de la Universidad Nacional de la Patagonia "San Juan Bosco"; Argentina*. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; Argentina.

Gnabre, J., Bates, R., & Huang, R. C. (2015). Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: Perspectives on combination therapy. *Journal of traditional and complementary medicine*, 5(3), 119-126.

Gómez, J., Simirgiotis, M. J., Manrique, S., Lima, B., Bórquez, J., Feresin, G. E., & Tapia, A. (2020). UHPLC-HESI-OT-MS-MS Biomolecules Profiling, Antioxidant and Antibacterial Activity of the “Orange-Yellow Resin” from *Zuccagnia punctata* Cav. *Antioxidants*, 9(2), 123.

Gómez, J., Simirgiotis, M. J., Manrique, S., Piñeiro, M., Lima, B., Bórquez, J., Feresin, G. E., Tapia, A. (2021) UHPLC-ESI-OT-MS Phenolics Profiling, Free Radical Scavenging, Antibacterial and

Nematicidal Activities of “Yellow-Brown Resins” from *Larrea spp.* *Antioxidants*, 10(2), 185. <https://doi.org/10.3390/antiox10020185>.

Guija-Guerra, H., & Guija-Poma, E. (2023). Radicales libres y sistema antioxidante. *Horizonte Médico (Lima)*, 23(2).

Haag, G. O., Valle, M. E. D., Scioli Montoto, S., Ruiz, M. E., Rosella, M. A., & Marín, G. H. (2017). Determinación de compuestos polifenólicos, terpénicos y perfil cromatográfico en distintos sistemas de *Annona cherimola* Mill." chirimoya"(Annonaceae). *Revista Científica SAFyT-AMA*, 1.

Harborne, J. B., Marby, H., & Marby, T. J. (2013). *The flavonoids*. Springer.

Heissenberg, D. M., Guerrero-Flores, G. N., de Araujo, R. L., Baptista, N. S., Leal, G. B., Brandt, S., & Delgado, M. A. (2019). Diseño de una base de datos de Plantas Medicinales de Entre Ríos, República Argentina. *Dominguezia*, 35(2), 29-33.

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15(8), 639–652.

Hernandez Garcia R., (2017). Estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de *Moringa oleifera* de diferente origen geográfico. *Tesis de grado de Facultad de Ciencias Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología Área de Fisiología Vegetal, Universidad Da Coruña*.

Hernández, T., García-Bores, A. M., Serrano, R., Ávila, G., Dávila, P., Cervantes, H., & Lira, R. (2015). Fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 18(2), 116-121.

Hidalgo, M. Á. G. (2018). Estrés oxidativo y antioxidantes. *Avances en investigación Agropecuaria*, 22(1), 29-46.

Huaraca Aparco, R., Delgado Laime, M. D. C., Tapia Tadeo, F., & Nolasco Carbajal, G. (2021). Perfil químico y actividad antioxidante de aceites esenciales de hierbas aromáticas altoandinas del Perú. *Alfa Revista de Investigación en Ciencias Agronómicas y Veterinaria*, 5(14), 153-165.

Instituto de Botánica Darwinion; REV: Fac. Agron. Univ. Nac. La Plata, 1897, 3-499.

Isla, M. I., Ezquer, M. E., Leal, M., Moreno, M. A., & Zampini, I. C. (2021). Flower beverages of native medicinal plants from Argentina (*Acacia caven*, *Geoffroea decorticans* and *Larrea divaricata*) as antioxidant and anti-inflammatory. *Journal of Ethnopharmacology*, 281, 114490.

Itza Ortiz, M. F. (2019). Phytobiotic activity of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare* and *Plectranthus amboinicus* in gram positive and gram negative bacterias. *Instituto de Ciencias Biomédicas*.

Kiesling, R. *Flora de San Juan. República Argentina; Estudio Sigma: Valladolid, Spain, 2003; Volumen II.*

Kumar, S., Jyotirmayee, K., & Sarangi, M. (2013). Thin layer chromatography: a tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 18(1), 126-132.

Llugin Tigre, R. D., & Torres Trujillo, K. G. (2023). Revisión bibliográfica descriptiva de formas farmacéuticas desarrolladas a base de extractos de plantas con acción antifúngica.

Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., & Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10), 1374.

Lorenzo, M. E., Casero, C. N., Gómez, P. E., Segovia, A. F., Figueroa, L. C., Quiroga, A., & Baroni, M. V. (2020). Antioxidant characteristics and antibacterial activity of native woody species from Catamarca, Argentina. *Natural Product Research*, 36(4), 885-890.

Misaraime Tacuri, M. E. (2023). Capacidad antioxidante, fenoles totales y flavonoides de veinte variedades de la semilla de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua". *Ayacucho 2022*.

Martino, R. F., Alonso, M. D. R., & Anesini, C. A. (2013). *Larrea divaricata* Cav. una planta con gran potencial en fitoterapia. *Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires. Revista BIFASE*.

Martínez, C. D., Vargas, C. R., & Arancibia, S. R. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med*, 46(6), 229-235.

Martins, S., Amorim, E. L., Sobrinho, T. J. P., Saraiva, A. M., Pisciotano, M. N., Aguilar, C. N., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Industrial Crops and Products*, 41, 306-311.

Mattera, R., Benvenuto, M., Giganti, M. G., Tresoldi, I., Pluchinotta, F. R., Bergante, S. & Bei, R. (2017). Effects of polyphenols on oxidative stress-mediated injury in cardiomyocytes. *Nutrients*, 9(5), 523.

Micucci, P. G., Alonso, M. D. R., Turner, S. A., Davicino, R. C., & Anesini, C. A. (2011). Antioxidant and antimicrobial activities of *Larrea divaricata* Cav. aqueous extract on vitamin C from natural orange juice.

Morán-Santibañez, K., Vasquez, A. H., Varela-Ramirez, A., Henderson, V., Sweeney, J., Odero-Marah, V., Fenelon, K., & Skouta, R. (2019). *Larrea tridentata* extract mitigates oxidative stress-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Antioxidants*, 8(10), 427.

Moreno, L. V. H., Baquero, L. C. P., & Hernández-Rodríguez, P. (2020). Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de plantas medicinales empleadas para el control de infecciones urinarias. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 16(1), 43-56.

Moreno, M. A., Bojorges, H., Falco, I., Sanchez, G., Lopez-Carballo, G., Lopez-Rubio, A., Zampini, I. C., Isla, M. I., & Fabra, M. J. (2020). Active properties of edible marine polysaccharide-based coatings containing *Larrea nitida* polyphenols enriched extract. *Food Hydrocoll*, 102, 105595.

Moreno, M. A., Córdoba, S., Zampini, I. C., Mercado, M. I., Ponessa, G., Sayago, J. E., & Isla, M. I. (2018). Argentinean *Larrea* dry extracts with potential use in vaginal candidiasis. *Natural Product Communications*, 13(2), 1934578X1801300215.

Morello, J. (1951). El bosque de algarrobo y la estepa de jarilla en el Valle de Santa María (Provincia de Tucumán). *Darwiniana*, 315-347.

Núñez Sellés, A. J. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública*, 37, 644-660.

Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1-1.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. Ediciones de la OMS, Organización Mundial de la Salud, 20 Avenue Appia, 1211 Ginebra 27, Suiza.

Palacio, L., Cantero, J. J., Cusidó, R., & Goleniowski, M. (2011). Phenolic compound production by *Larrea divaricata* Cav. plant cell cultures and effect of precursor feeding. *Process biochemistry*, 46(1), 418-422.

Patagonia Extraandina, J. B. (2002). Usos tradicionales de las plantas en la meseta patagónica.

Peralta, I. N. (2019). *Larrea divaricata* Cav.: Estudio de la actividad antioxidante frente a estrés oxidativo inducido y estudio de los parámetros farmacocinéticos. *Tesis doctoral*

Peralta, I., Marrassini, C., Saint Martin, M., Cogoi, L., Alonso, M. R., Gugliucci, A., & Anesini, C. (2022). *Larrea divaricata*: anti-inflammatory and antioxidant effects on macrophages and low density lipoproteins. *BMC complementary medicine and therapies*, 22(1), 84.

Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1.

Qadir M. A., Shahzadi S. K., Bashir A., Munir A., & Shahzad S. (2017). Research Article Evaluation of Phenolic Compounds and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Common Herbs.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Renger, B. (1998). Contemporary thin-layer chromatography in pharmaceutical quality control. *Journal of AOAC International*, 81(2), 333-340.

Rico López, E. (2015). Estudio de la actividad antimicrobiana y antioxidante de propóleos de distintos orígenes. *Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València..*

Rocha, C., Reynolds, N. D., & Simons, M. P. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32, 139-145.

Roche Llerena, V. (2023). Extracción de metabolitos secundarios de hojas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*): caracterización fisicoquímica, evaluación y aprovechamiento de biomasa. *Master's thesis, Tesis (MC). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Mérida. Departamento de Física Aplicada.*

Rondina, R. V., Bandoni, A. L., & Coussio, J. D. (2008). Especies medicinales argentinas con potencial actividad analgésica. *Dominguezia*, 24(1), 47-69.

Ruiz, S. C., García, E. M., Nediani, T., Zimmerman, M., Nazareno, M. A., & Martínez, S. L. (2019). Potencial antioxidante y Actividad antimicrobiana de extractos de hojas de Mistol (*Zizyphuz*

*mistol*), Algarrobo blanco (*Prosopis alba*) y Tusca (*Acacia aroma*) procedentes de Santiago del Estero, Argentina. *Foro de la Alimentación, la Nutrición y la Salud*.

Sánchez-Valle, V., & Méndez-Sánchez, N. (2018). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Médica Sur*, 20(3), 161-168.

Santos de Lima, S., da Silva, S., Moreira C. B., Lage C. L. S., & Sato A., (2017). Effect of auxin and cytokinin on phenolic content of *Baccharis myriocephala* DC. (Asteraceae) produced *in vitro*. *Journal of Medicinal Plants Researc*, 11, 642-647

Sgariglia, M. A., Soberon, J. R., Sampietro, D. A., & Vattuone, M. A. (2010). Cromatografía: conceptos y aplicaciones.

Sharif, M. S., Kadhim, A. S., & Warid, F. (2023). Antibacterial Activity Test To Ethanol And Aqueous Extracts Of Fruit Cucurbita Pepo On Multi-Antibiotic Resistance Bacterial Strains Isolated From Human Urinary Tract Infections. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 2140-2156.

Sherma, J., & Fried, B., (2003). Handbook of thin-layer chromatography. CRC press.

Simirgiotis, M. J., Bórquez, J., & Schmeda-Hirschmann, G. (2013). Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC–DAD–ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *L. chequén*. *Food chemistry*, 139(1-4), 289-299.

Simirgiotis, M. J., Quispe, C., Bórquez, J., Mocan, A., & Sepúlveda, B. (2016). High resolution metabolite fingerprinting of the resin of *Baccharis tola* Phil. from the Atacama Desert and its antioxidant capacities. *Industrial Crops and Products*, 94, 368-375.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M., (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Skouta, R., Morán-Santibañez, K., Valenzuela, C. A., Vasquez, A. H., & Fenelon, K. (2018). Assessing the antioxidant properties of *Larrea tridentata* extract as a potential molecular therapy against oxidative stress. *Molecules*, 23(7), 1826.

Skrajda-Brdak, M., Dąbrowski, G., & Konopka, I. (2020). Edible flowers, a source of valuable phytonutrients and their pro-healthy effects—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 103, 179-199.

Tamokou, J. D. D., & Mbaveng, A. T. K. (2017). Especies y hortalizas medicinales de África. Potencial terapéutico contra enfermedades metabólicas, inflamatorias, infecciosas y sistémicas, (207-237). Especies y vegetales medicinales de África (8) - Actividades antimicrobianas de las especias y hortalizas medicinales africanas.

Turner, S., Davicino, R., Alonso, R., Ferraro, G., Filip, R., & Anesini, C. (2011). Potential use of low-NDGA *Larrea divaricata* extracts as antioxidant in foods. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 159-164.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant physiology*, 4, 315-344.

WFO (2023): World Flora Online. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org>. Accessed on: 01 Dec 2023

Valero, J. C. V., & Alvarado, J. M. C. (2023). Resistencia antibiótica bacteriana en infecciones de vías urinarias y los principales microorganismos causales. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria Pentaciencias*, 5(3), 594-607.

Vallejo-Rosero, Y. J., Barrios-Correa, L., & Anaya-Gil, J. (2021). La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. *Revista de Química*, 35(2), 19-25.

Vermerris, W., & Nicholson, R. (2007). Phenolic compound biochemistry. Springer Science & Business Media.

Viada Pupo, E., Gómez Robles, L., & Campaña Marrero, I. R. (2017). Estrés oxidativo. *Correo científico médico*, 21(1), 171-186.

Vieyra, M. I. G., Arellano, J. E. J., García, J. A. G., Carmona, A. S., & Guerrero, K. L. R. (2022). Perfil Fitoquímico y capacidad antioxidante de tés de flores de plantas medicinales. *Jóvenes en la Ciencia*, 16.

Vivot, E. P., Sánchez, C., Cacik, F., & Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, docencia y tecnología*, (45), 131-146.

Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate analysis in metabolomics. *Current metabolomics*, 1(1), 92-107.

Zampini, I. C., Cudmani, N., & Isla, M. I. (2007). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 41(3), 385-393.

Zuloaga, F. O., Belgrano, M. J., & Zanotti, C. A. (2019). Actualización del catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur. *Darwiniana, nueva serie*, 7(2), 208-278.