

# Análisis de la fracción “no volátil” (flavonoides) y perfil de compuestos no polares de *Achyrocline satureioides*. Red marcela

Retta, D.<sup>1,2</sup>; Guariniello, J.<sup>3</sup>; Suárez, S.A.<sup>4</sup>; Galli, M.C.<sup>5</sup>; Van Baren, M.C.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires (UBA), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Farmacognosia. Correo electrónico: dretta@ffyb.uba.ar <sup>2</sup>Universidad de Buenos Aires (UBA), Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA), CONICET. <sup>3</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Genética “Ewald A. Favret”. <sup>4</sup>Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. <sup>5</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) San Luis, Agencia de Extensión Rural Concarán.

## Objetivo

Evaluar el contenido de flavonoides y determinar el perfil de compuestos no polares en inflorescencias cosechadas de plantas ex vitro provenientes de un genotipo selecto de marcela (*Achyrocline satureioides*) cultivado en tres ambientes: Río Cuarto, Merlo y Castelar.

## Materiales y métodos

A partir de un ejemplar de marcela originario de la localidad Dique Cruz de Piedra (San Luis) se obtuvieron individuos por multiplicación *in vitro*, utilizando un medio MS completo suplementado con 1 mg/l de BAP (Rosso *et al.*, 2015). La multibrotación se dio a partir de callo. Se recuperaron alrededor de 150 plantas, las que fueron aclimatadas y luego distribuidas a tres localidades: Río Cuarto, Merlo y Castelar para la realización de un ensayo en red (Galli *et al.*, 2016).

Las plantas se llevaron a campo a principios de la primavera de 2015. Y se implantaron a 45 cm entre plantas y 70 cm entre hileras. Se cosecharon a fines de febrero/principios de marzo de 2016 (1.<sup>a</sup> cosecha, Río Cuarto, Merlo y Castelar) y principios/mediados de abril de 2017 (2.<sup>a</sup> cosecha, Castelar) (Galli *et al.*, 2016).

Luego de evaluar el rendimiento de biomasa de inflorescencias en cada localidad se decidió estudiar el contenido de flavonoides en las muestras por HPLC y el perfil cromatográfico de los compuestos no polares por TLC.

Para ello se realizó una caracterización por TLC de la fracción no polar utilizando el sistema cromatográfico propuesto por Retta *et al.* (2010), siendo esta la fracción de interés aromático.

A partir de cada muestra remitida, se tomaron 2 g de material vegetal y se realizó una extracción por maceración en hexano, durante 40 min con agitador magnético. Se filtró por gravedad y se llevó a sequedad en evaporador rotatorio a presión reducida a una temperatura no mayor de 40 °C y se tomó el residuo con 10 ml de hexano.

Para los análisis por TLC se utilizaron placas de silica gel 60 F254 como fase estacionaria y tolueno: acetato de etilo: ácido acético glacial (9:1:III) como fase móvil. Las placas se revelaron con anisaldehído sulfúrico con posterior calentamiento.

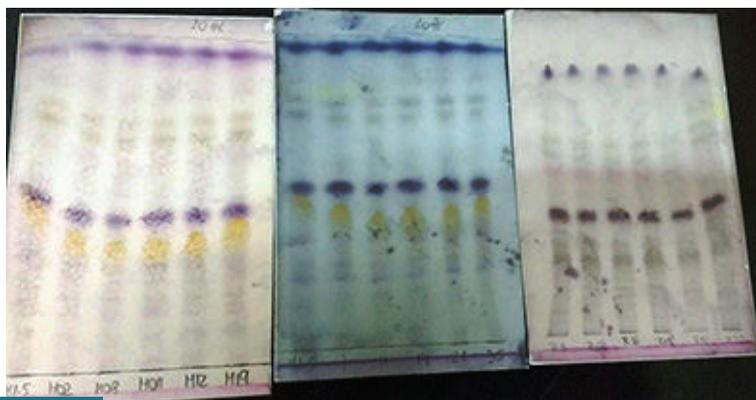
También se realizó la valoración por HPLC de los compuestos quercetina-3-metil éter (Q3ME) y quercetina, marcadores de calidad medicinal de la especie. Para ello se pesaron 5,0 g de material vegetal seco y disgregado, se agregaron 150 ml de etanol 80 % y se extrajo a reflujo por 3 horas. Los extractos fueron filtrados y evaporados a presión reducida hasta sequedad y reconstituidos cuantitativamente con 50,0 ml de etanol 80 %.

Se empleó la metodología puesta a punto y validada por Retta (2014), incorporada recientemente a la monografía de marcela de la actual Farmacopea Argentina.

## Resultados y discusión

Al primer año de cultivo se observaron diferencias significativas en el crecimiento y floración de los individuos, dentro y entre localidades. A cosecha, en Río Cuarto se produjo mayor rendimiento de inflorescencias (58,18 g) que en Merlo (11,03 g) y Castelar (8,92 g) ( $p < 0,05$ ) (Galli *et al.*, 2016).

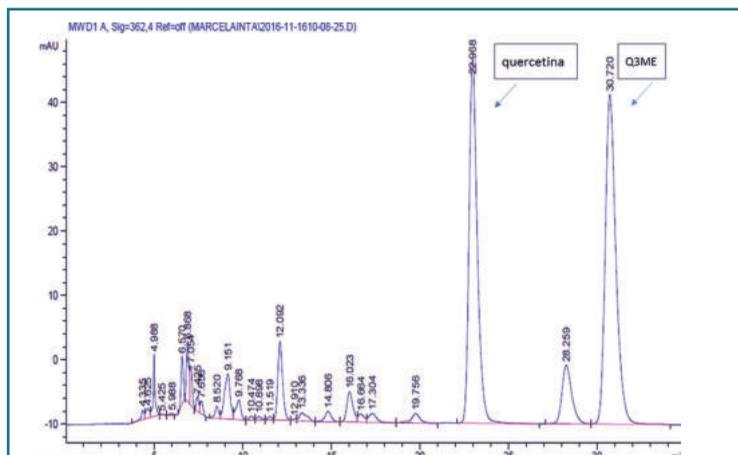
En cuanto a la caracterización de los compuestos no polares, no se observaron diferencias apreciables en los perfiles cromatográficos obtenidos entre las muestras provenientes de distintas zonas, ni con respecto a la planta madre (M1-5) (Figura 1).



**Figura 1.** TLC de muestras provenientes de Merlo, Castelar y Río Cuarto, respectivamente. FE: sílica gel 60 F254; FM: tolueno: acetato de etilo: ácido acético glacial (9:1:iii); Revelador: anisaldehído sulfúrico.

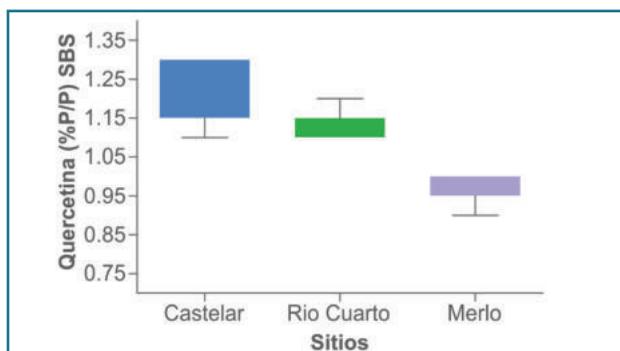
En cuanto a la valoración de los flavonoides por HPLC (Figura 2) se observaron diferencias en el porcentaje de quercetina entre los sitios ( $P=0,0003$ ). Al comparar de a pares Castelar y Merlo difieren significativamente ( $P < 0,001$ ) y Río Cuarto se diferencia de Merlo ( $P > 0,05$ ), no así de Castelar (Figura 3A).

También se observaron diferencias en el porcentaje de quercetina-3-metil éter entre los sitios ( $P=0,0003$ ). Al comparar de a pares existen diferencias entre Castelar y Merlo ( $P < 0,001$ ), Castelar y Río Cuarto ( $P < 0,01$ ), y Río Cuarto y Merlo ( $P < 0,05$ ). Todos los análisis se realizaron por duplicado (Figura 3B).

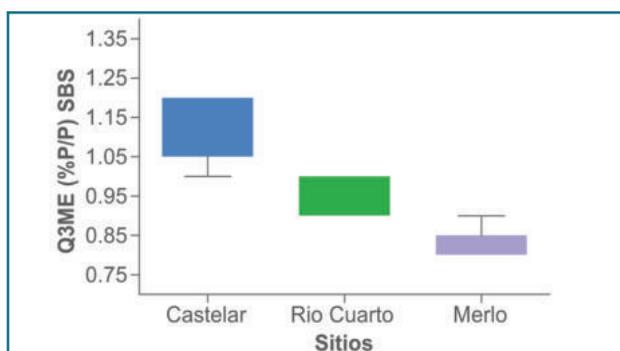


**Figura 2.** Perfil cromatográfico\* obtenido por HPLC para la valoración de quercetina y quercetina-3-metil éter (Q3ME) en muestras provenientes de Merlo, Castelar y Río Cuarto.

\* columna Phenomenex Luna 2-C18 -250 mm × 4.6 mm × 5 μm-a 362 nm.



(A) Valoración de quercetina



(B) Valoración de quercetina-3-metil éter (Q3ME)

**Figura 3.** Valoración de quercetina (A) y quercetina-3-metil éter (Q3ME) (B) mediante HPLC de muestras provenientes de Merlo, Castelar y Río Cuarto. Box plot. Aún no se realizó la cuantificación de flavonoides del segundo año de cosecha.

## Conclusiones

Considerando que los metabolitos secundarios quercetina y quercetina 3-metil éter se producen en respuesta al ambiente, en aquellos sitios donde las plantas estuvieron sometidas a condiciones más estresantes (presentaron menor ajuste a las condiciones ambientales), los porcentajes de metabolitos secundarios fueron mayores. Es por ello que en Merlo (ambiente de procedencia de las plantas madres) se observaron los menores valores de referencia.

## Bibliografía

- GALLI, M.C.; RISSO, O.A.; BARBERO, I.L.; GUARINIELLO, J.; OVIEDO, A.L.; ROSSO, C.; SUÁREZ, S.A.; ESCANDÓN, A.S. 2016. Evaluación del crecimiento y rendimiento de “marcela” provenientes de micropropagación en tres ambientes: Merlo, Río Cuarto y Castelar. XXXIX Congreso Argentino de Horticultura. Santa Fe.
- RETTA, D.S. 2014. Determinación de calidad de “marcela” *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae). Parámetros fitoquímicos. Compendio de tesis. Dominguezia 30(2), 5-17
- RETTA, D.S.; FERNANEZ PENUTO, R.; CORREA, M.; GATTUSO, M.; GATTUSO, S.; BANDONI, A. 2010. Diferenciación de las especies *Achyrocline satureioides*, *A. flaccida* y *Gnaphalium gaudichaudianum* por sus perfiles cromatográficos. BLACPMA 9(2), 93-99.
- ROSSO, C.; IANNICELLI, J.; ESCANDÓN, A.S. 2015. Ajuste de la micropropagación *in vitro* de marcela. Segundas Jornadas Rioplatenses de Flora Nativa, diálogos, integración y tendencias. Buenos Aires.