

Determinación de calidad de “marcela” *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae). Parámetros fitoquímicos

Daiana S. Retta

Cátedra de Farmacognosia - IQUIMEFA (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 2° piso (1113). Buenos Aires, República Argentina.
Correspondencia: dretta@ffyb.uba.ar

Compendio de la tesis de doctorado

“Parámetros fitoquímicos para la determinación de calidad de ‘marcela’ *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae)”.

Lugar y fecha de aprobación de la tesis:

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 17 de diciembre de 2012.

Resumen

La “marcela” es una especie vegetal aromática de amplio uso en medicina tradicional en la región del Río de la Plata. Con este nombre se designa principalmente a la especie *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. –Asteraceae–, aunque también a otras especies de los géneros *Achyrocline* y *Gnaphalium*. Las partes aéreas y las inflorescencias son tradicionalmente usadas como digestivas, antiinflamatorias, antiespasmódicas y antidiabéticas. En América del Sur hay una notable demanda de “marcela”, tanto para el mercado farmacéutico como para la elaboración de productos cosméticos y bebidas amargas. Sin embargo, su provisión presenta una gran variabilidad en su calidad, dado que se encuentra frecuentemente adulterada, sustituida o contaminada, o porque hasta el momento no existe una norma local que regule su calidad. Por esta razón es importante la caracterización química de la especie *Achyrocline satureioides* en la Argentina. Con el objetivo de definir criterios de calidad de la “marcela” se realizaron análisis fitoquímicos de la especie, obtenida en varias poblaciones silvestres a lo largo de su zona de distribución natural en la Argentina. Se evaluaron los perfiles cromatográficos de las fracciones volátiles y no volátiles característicos de esta especie. Se optimizó la metodología de análisis para su control de calidad y se realizó su validación. Por otra parte, se logró su diferenciación por medio de análisis cromatográficos y su caracterización sensorial, de las otras especies más comunes utilizadas como adulterantes o sustitutas. También se evaluó la capacidad antioxidante de *A. satureioides* y se correlacionaron los resultados obtenidos con el contenido de polifenoles totales. Por último, se evaluó la actividad tripanocida en las especies *A. satureioides* y *A. flaccida*, que no resultó significativa. Los resultados obtenidos contribuyen a la definición de las especificaciones químicas para la “marcela”, de manera que garantizaran tanto su identidad, eficacia y calidad, como la contribución a asegurar su homogeneidad en el mercado local.

Palabras clave: *Achyrocline satureioides* - *Achyrocline flaccida* - *Gnaphalium gaudichaudianum* - adulterantes - calidad.
Key words: *Achyrocline satureioides* - *Achyrocline flaccida* - *Gnaphalium gaudichaudianum* - adulterants - quality.

Quality Determination of “Marcela” *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae). Phytochemical parameters

Summary

“Marcela” is an aromatic herbal species widely used in traditional medicine in the Río de la Plata region. This name refers mainly to the species *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. –Asteraceae–, but also to other species of the genus *Achyrocline*, and *Gnaphalium*. The aerial parts and inflorescences are traditionally used as digestive, anti-inflammatory, antispasmodic, and antidiabetic. There is an important demand for “marcela” in South America, not only for the pharmaceutical market, but also for cosmetic, and bitter beverages industries. However, a great variability in its quality has been detected, either because of adulteration, substitution or contamination, or due to the lack of a local norm that regulates its quality. For this reason, the chemical characterization of the species *Achyrocline satureioides* in Argentina is of main interest. Phytochemical analysis was carried out in order to define the quality specifications, supported on the analysis of a great number of natural populations in Argentina. Chromatography profiles of volatile and non-volatile fractions typical of the species were evaluated. The method of analysis for its quality control was optimized and then validated. It was also possible to differentiate this species from their most common adulterants or substitutes. Antioxidant capacity of *A. satureioides* was evaluated and the results obtained were correlated with total phenol contents. Finally, assessment of tripanocide activity in *A. satureioides*, and *A. flaccida*, showed no significance. These results contribute to the definition of the chemical specifications for this species, ensuring the identity, efficacy, and quality, as well as contributing to guarantee the homogeneity of “marcela” in the local market.

Introducción

La “marcela” es una especie vegetal de amplio uso en medicina tradicional en la región del Río de la Plata. Con este nombre se define principalmente a la especie *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. –Asteraceae–, aunque también a otras especies, como *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. y *Gnaphalium gaudichaudianum* DC. (Gattuso y col., 2008). Las partes aéreas, y fundamentalmente las inflorescencias de la especie *A. satureioides* (Fotos 1 y 2), son tradicionalmente usadas como digestivas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antidiabéticas y antiasmáticas (Ratera y Ratera, 1980; Toursarkisian, 1980; García y col., 1990). Varios autores han constatado estas y otras propiedades en ensayos *in vitro* e *in vivo* y justifican la mayoría de sus actividades por su contenido de flavonoides (Langeloh, 1988; Oliveira Simões y col., 1988; Hnatyszyn y col., 2004).

Se observa que en la Argentina y en el resto de los países del Mercosur hay una importante demanda de “marcela”, tanto para el mercado farmacéutico como para la elaboración de productos cosméticos y bebidas amargas. La provisión de este material vegetal presenta una gran variabilidad en su calidad, dado que se encuentra frecuentemente adulterada, sustituida o contaminada, o porque hasta el momento no existe una norma local que regule su calidad.

Para este trabajo de tesis se han tenido en cuenta las circunstancias expuestas previamente. En consecuencia, la caracterización química de la especie *A. satureioides* y de otras especies denominadas “marcela” es de fundamental importancia por su amplio uso en las industrias alimentaria y farmacéutica en Sudamérica. Por otra parte, resulta necesario establecer normas de calidad de los materiales que se emplean en la elaboración de medicamentos y alimentos; por esta razón, se propuso aplicar los datos obtenidos para contribuir a la definición de las

Foto 1-. Inflorescencias de *A. saturoioides*

Villa Gral. Belgrano, Córdoba, Argentina.

Foto 2-. Inflorescencias de “marcela”



Piedra Blanca, Córdoba, Argentina (Cortesía de la Dra. Susana Suárez, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba).

especificaciones químicas, de manera que garanticen su identidad, eficacia y calidad, y así asegurar su homogeneidad en el mercado local.

Objetivos

De acuerdo con las necesidades observadas, los objetivos que se plantearon fueron:

- caracterizar químicamente la especie *Achyrocline saturoioides* que crece en la Argentina;
- optimizar las metodologías de análisis para su control de calidad y, de ser necesario, validarlas;
- evaluar el contenido de activos en las distintas partes de la planta para definir la parte usada y evaluar las posibles variaciones estacionales mediante el análisis de muestras en distintos estadios de la floración;
- estudiar la variabilidad química de las muestras por diferentes metodologías;
- realizar evaluaciones sensoriales por su importancia como amargo;
- contribuir al estudio de la capacidad antioxidante y la potencial actividad tripanocida de sus extractos;
- definir criterios de calidad para la especie *A. saturoioides* de la Argentina;
- encontrar parámetros fitoquímicos que la diferencien de los adulterantes o sustitutos habitualmente empleados.

Desarrollo experimental

El muestreo¹ realizado fue representativo de las áreas naturales de distribución más importantes de “marcela” en la Argentina durante la época de floración. Se colectó material silvestre y se obtuvieron además, algunas muestras comerciales. Los ejemplares de herbario fueron depositados en las respectivas universidades. También se analizaron algunos aceites esenciales de *A. saturoioides* de distintas procedencias²

A partir de estos materiales vegetales se realizó la caracterización química de los componentes volátiles y no volátiles de la “marcela”.

¹ La recolección y la identificación botánica del material estuvo a cargo de los grupos de trabajo de las doctoras Martha y Susana Gattuso, de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario; de la doctora Susana Suárez, de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba y del ingeniero agrónomo Gustavo Giberti, del Museo de Farmacobotánica “Juan A. Domínguez”, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

² Los aceites esenciales fueron obtenidos por el ingeniero agrónomo Miguel A. Elechosa y el técnico Miguel A. Juárez, del Instituto de Recursos Biológicos, INTA, Castelar, provincia de Buenos Aires. Otras muestras de aceites esenciales fueron obtenidas a partir de inflorescencias de *A. saturoioides* y enviadas por la doctora Susana Suárez, de la Universidad de Río Cuarto, Córdoba y la ingeniera agrónoma Alejandra Gil, de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

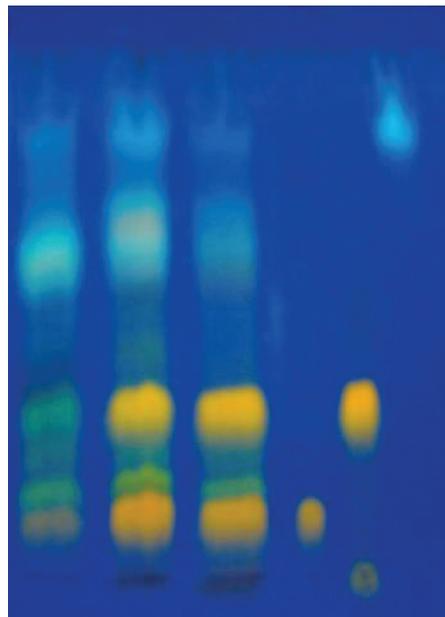
El estudio de la fracción no volátil de *Achyrocline satureioides* comprendió la realización de ensayos de identificación por cromatografía en capa delgada (CCD). El objetivo fundamental de este análisis fue encontrar un sistema cromatográfico que permitiera la identificación de la especie *A. satureioides*, y la evaluación de su pureza, considerando sus principales adulterantes y contaminantes.

Las especies del género *Achyrocline* presentan ciertas dificultades en su identificación botánica, debido a que tienen caracteres morfológicos muy semejantes entre sí (Giangualani, 1976). La dificultad en la correcta identificación del material vegetal genera usualmente casos de contaminación, debido a que la demanda actual en la región está cubierta por la colecta de material silvestre, y frecuentemente se encuentra mezclado con otras especies similares, situación que es agravada por la adulteración intencionada a causa de la escasez y la imposibilidad de acceso al material válido. Por esta razón, además se incluyó la determinación de perfiles cromatográficos discriminantes por CCD de las especies utilizadas como sustitutas (*Achyrocline flaccida* y *Gnaphalium gaudichaudianum*). La CCD es una metodología muy sencilla de implementar en un laboratorio de control de calidad.

Se comenzó con la optimización de un sistema cromatográfico por CCD que permitiera identificar a *Achyrocline satureioides* a partir de un extracto etanol 80 %. Para ello se empleó celulosa como fase estacionaria y, como fase móvil, ácido acético al 30 %; también se incorporaron como testigos los marcadores químicos y activos más importantes: quercetina, quercetina-3-metil éter (Q3ME) y ácido clorogénico. Sin embargo, se encontró que esta especie presentaba una gran similitud con otra de las especies que también es conocida como “marcela”, *A. flaccida* (Figura 1). Los perfiles cromatográficos obtenidos por CCD en el sistema cromatográfico ensayado, demuestran que presentan composiciones químicas semejantes. En cambio, se encontraron diferencias en los perfiles cromatográficos con *G. gaudichaudianum*, otro adulterante común de la “marcela”, que evidenció una composición química diferente (Figura 1).

El análisis de varias muestras permitió encontrar un sistema cromatográfico nuevo y más adecuado; fase estacionaria, silicagel, y fase móvil, tolueno: acetato de etilo: ácido acético (9:1:III), con el que se logró obtener un perfil cromatográfico característico

Figura 1- Perfil comparativo de los extractos etanol 80 % por CCD de las inflorescencias de *G. gaudichaudianum*, *A. flaccida* y *A. satureioides*



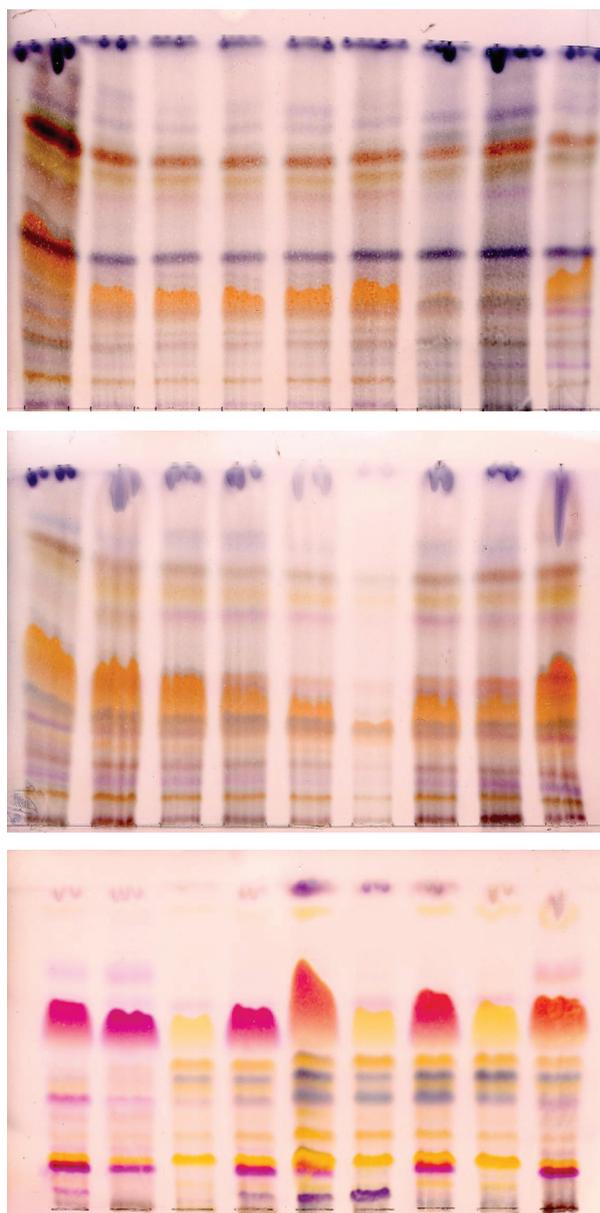
Testigos: quercetina, quercetina-3-metil éter y ácido clorogénico (de izquierda a derecha). Fase móvil empleada ácido acético 30 %. Observación al UV_{366nm}.

de cada una de las especies estudiadas, conocidas como “marcela”, a partir de extractos no polares, y que permite diferenciarlas entre sí (Figura 2). Este análisis por CCD permitiría minimizar errores por contaminación y falsificación (Retta y col, 2010a).

La comercialización de la “marcela” se realiza actualmente mediante el acopio de todas las partes aéreas florecidas. Por esta razón también se realizó la determinación de polifenoles totales por espectrofotometría UV/Vis en las distintas partes de la planta (tallos, hojas e inflorescencias). De esta manera, se pudo evaluar qué aporte tenían cada una de las partes respecto al contenido total de activos. Se encontró que *A. satureioides* presenta mayor contenido de polifenoles totales en sus inflorescencias que en las otras partes de la planta.

Varios autores han informado que *A. satureioides* presenta una cantidad significativa de flavonoides; entre ellos, quercetina y Q3ME (Sonaglio y col., 1986; De Souza y col., 2002; Morquio y col., 2004; Díaz y Heinzen, 2006). Estos compuestos serían responsables de varias de las actividades biológicas que presenta la “marcela” y que avalan sus principales usos medicinales como hepatoprotectora,

Figura 2- Perfiles obtenidos por CCD de varias poblaciones de inflorescencias de “marcela”



A. satureioides (arriba), *A. flaccida* (medio) y *G. gaudichaudianum* (abajo).

antioxidante, antiespasmódica, antiinflamatoria, miorrelajante, fotoprotectora y antibacteriana (Gut-kind y col., 1984; Langeloh, 1988; Oliveira Simões, 1988; Oliveira Simões y col., 1988; Kadarian y col., 2002; Hnatyszyn y col., 2004; Morquio y col., 2004; 2005). Así, se profundizó en el estudio de los flavonoides como parte de la caracterización química para el control de calidad.

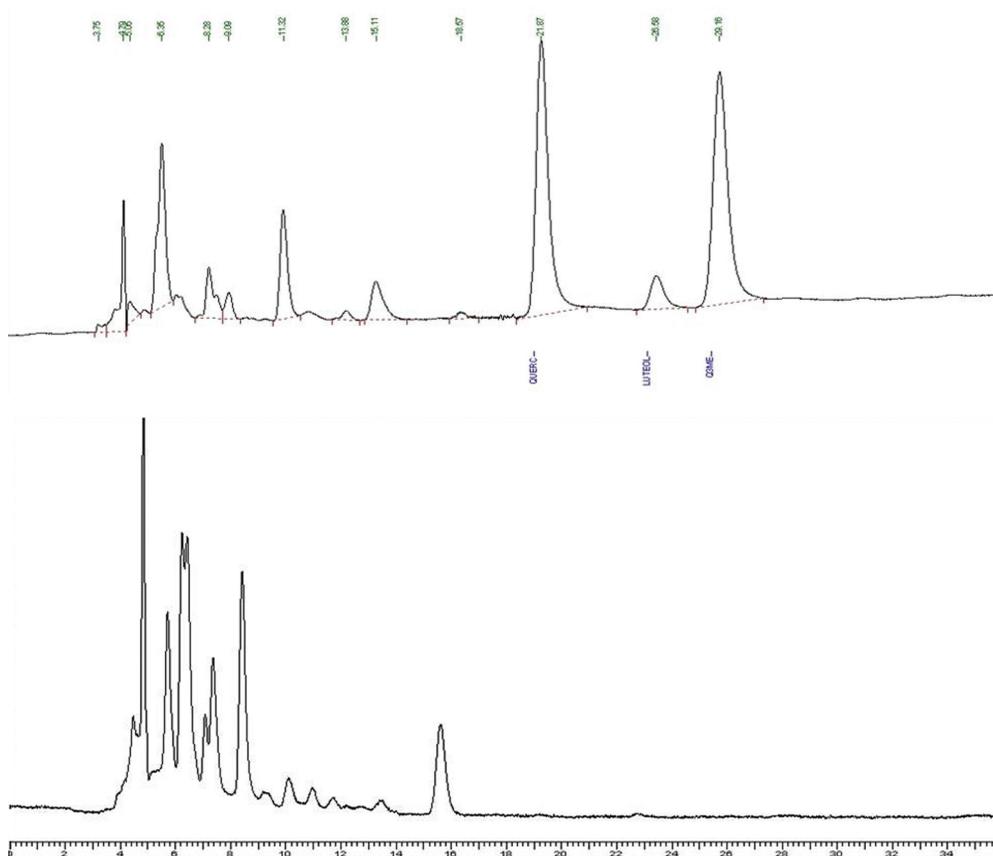
Se tomó como referencia la técnica analítica para la determinación de flavonoides (quercetina y luteolina) por cromatografía líquida de alta eficiencia-detector de arreglo de diodos (CLAE-DAD) en “marcela”, incluida en la Farmacopea Brasileira IV Ed. (2001). Sin embargo, la metodología extractiva no resultaba exhaustiva y, en consecuencia, se decidió optimizarla. La extracción de los flavonoides de interés de sus inflorescencias se favoreció con una extracción a reflujo con etanol 80 %, en lugar de acetato de etilo en Soxhlet.

Se propuso entonces una nueva metodología de extracción y se incluyó la cuantificación no solo de quercetina, sino también de Q3ME, que además de ser un compuesto mayoritario en la “marcela” es un compuesto activo (van Puyvelde y col., 1989; Dok-Go y col., 2003; Takeara y col., 2003; Rubio y col., 2006). La cuantificación de luteolina, indicada en la Farmacopea Brasileira se descartó porque se encuentra en muy baja concentración en las poblaciones de la Argentina (Retta y col., 2011a).

También se determinó el contenido de quercetina y Q3ME por CLAE-DAD en las distintas partes de la planta por separado (tallos, hojas e inflorescencias) y en materiales en distintos estadios fenológicos (pre-floración, floración y posfloración) con el método optimizado. Los objetivos de estas determinaciones fueron poder establecer la parte de la planta que debe ser usada con fines medicinales y evaluar posibles variaciones del contenido de activos con la fenología de la planta. Se encontró que *A. satureioides* presentó alto contenido de los flavonoides quercetina y Q3ME en sus inflorescencias y que estas concentraciones decaen abruptamente en los otros órganos vegetales (partes aéreas sin inflorescencias) (Figura 3).

Por otra parte, se demostró que el contenido de flavonoides en sus inflorescencias es mayor cuando la planta se encuentra en floración plena. Se observó además, que los perfiles cromatográficos obtenidos por CLAE presentaron algunas diferencias cualitativas según el estadio de floración del material (Retta y col., 2011a).

Para incluir el método analítico en una propuesta de norma farmacopeica, se realizó la validación del método optimizado que se empleó en el análisis por CLAE, según normas internacionales de referencia (ICH, 2005). Se evaluó especificidad, linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, y se calcularon los límites de cuantificación y detección de los compuestos marcadores. También se evaluó la

Figura 3- Perfil cromatográfico por CLAE de *A. satureioides*

Inflorescencias (arriba) y partes aéreas sin inflorescencias (abajo).

robustez de la metodología optimizada de extracción de flavonoides.

De los resultados obtenidos se concluyó que el método es idóneo, preciso y útil para la determinación de los flavonoides bajo estudio en muestras de “marcela” en las condiciones validadas. También se comprobó que el método propuesto para la extracción de los flavonoides de interés es robusto.

Por último, se analizaron varias poblaciones de *A. satureioides* recolectadas en las áreas más representativas de su distribución natural con la metodología validada. Este análisis tuvo como objetivos conocer el contenido promedio poblacional de los flavonoides de interés en las inflorescencias de esta especie en la Argentina y verificar si el perfil cromatográfico resultaba característico, independientemente de la zona de recolección.

El contenido promedio de quercetina y Q3ME en las inflorescencias de *A. satureioides* ($n = 20$) fue de $0,73 \pm 0,21$ y $0,64 \pm 0,28$ (% P/P), respectivamente. Estos valores resultaron mucho mayores que los requeridos por la Farmacopea Brasileira (2001).

También, se realizó la cuantificación de flavonoides por CLAE-DAD en las inflorescencias de las otras especies mencionadas como adulterantes usuales (*A. flaccida*, *G. gaudichaudianum*) y en una única muestra disponible de *A. brittoniana* Deble *et* Marchiori, con fines comparativos.

Se encontró que *A. flaccida* presentó un perfil cromatográfico similar al de *A. satureioides*. El contenido promedio poblacional de quercetina y Q3ME en esta especie ($n = 11$) fue de $1,12 \pm 0,33$ y $0,81 \pm 0,21$ (% P/P), respectivamente, mientras que las muestras de *G. gaudichaudianum* ($n = 7$),

se caracterizaron por presentar muy bajo contenido de quercetina ($0,11 \pm 0,03$ % P/P) y ausencia de Q3ME. En *Achyrocline brittoniana* se observó de manera preliminar, dado que solo se contó con una muestra, que presentó quercetina y Q3ME en sus inflorescencias en cantidades similares a *A. satureioides*, hecho que también se evidenció por CCD.

La Farmacopea Brasileira IV Ed. (2001) también incluye en la monografía de “marcela” la determinación de flavonoides totales –previa hidrólisis– por espectrofotometría UV/Vis, razón por la que se realizó esta determinación en algunas muestras de *A. satureioides*. En forma paralela se repitió el análisis pero variando el solvente de extracción. Se empleó etanol 80 % en lugar de acetona y se compararon los resultados obtenidos. Se encontró que con ese solvente de extracción se obtuvieron cantidades mayores de flavonoides totales. A partir de estos resultados se concluyó que la acetona no resulta eficiente para la extracción de los compuestos que se analizaron (Farmacopea Brasileira IV Ed., 2001), en cambio, sí lo es el etanol 80 %.

La “marcela” tiene un aroma intenso y característico, y un sabor amargo particular, uno de sus usos más importantes es el de saborizante en la industria de aperitivos. Esta especie además presenta un potencial

aromático interesante para la industria perfumística.

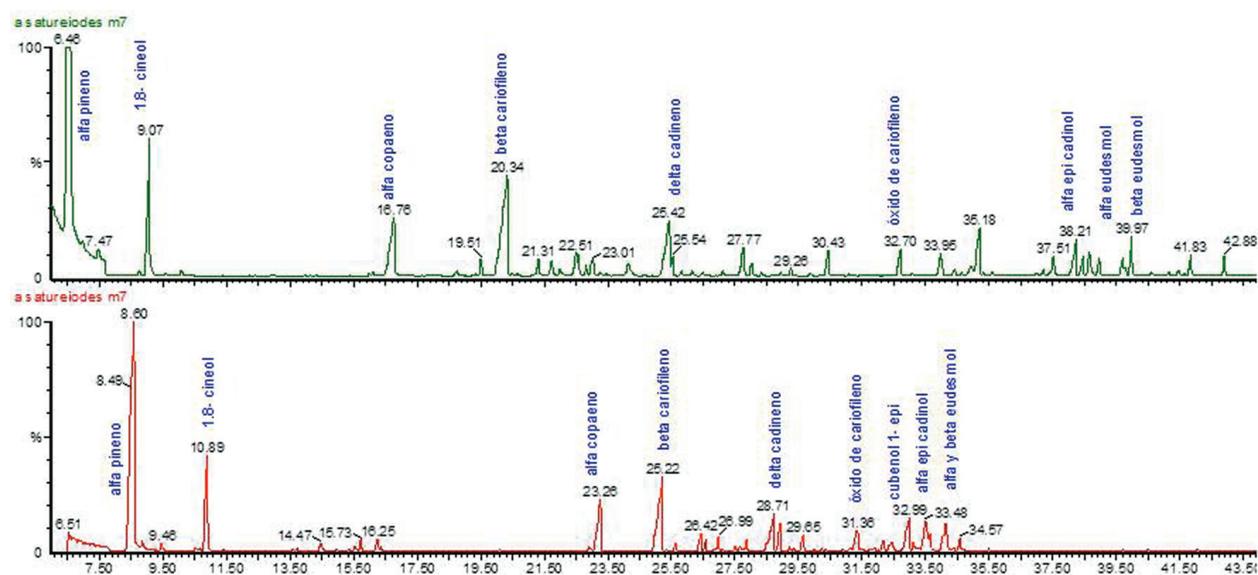
Para el estudio de la fracción volátil se realizó la determinación del rendimiento y composición cuali-cuantitativa del aceite esencial de *A. satureioides* por cromatografía gaseosa-detector de ionización de llama-espectrometría de masa (GC-FID-MS), obtenido a partir de las inflorescencias ($n = 6$) y de las partes aéreas florecidas ($n = 15$). Los objetivos de las determinaciones mencionadas fueron conocer el perfil cromatográfico de la fracción volátil y evaluar la composición química que caracteriza a esta especie en la Argentina.

Los resultados obtenidos del estudio de la composición química de todas las muestras analizadas fueron sometidos a un análisis estadístico multivariado. Se aplicó el análisis de los componentes principales (ACP) y el análisis por conglomerados mediante el uso del programa InfoStat (2008).

Los rendimientos de aceite esencial en muestras de inflorescencias de *A. satureioides*, calculados sobre droga seca, fueron de 0,1-0,4 % (V/P), y en muestras de partes aéreas, fueron de 0,2-0,3 % (V/P).

Las composiciones químicas de los aceites esenciales estudiados presentaron altas concentraciones de alfa-pineno y beta-cariofileno, tanto en las inflorescencias como en las partes aéreas en floración (Figura 4).

Figura 4-. Perfil cromatográfico por GC del aceite esencial de *A. satureioides*



Columna polar (arriba), columna no polar (abajo).

Según el análisis estadístico multivariado realizado sobre la matriz de los datos químicos obtenidos, las muestras se dividieron en dos grupos, tanto por ACP, como en el análisis por conglomerados. Estas agrupaciones se deben a diferencias en su composición química, particularmente en el contenido de alfa pineno. Las posibles causas de estas variaciones que generaron los agrupamientos no se lograron explicar por diferencias relacionadas con la procedencia del material vegetal o con la fecha de colecta; estos resultados se atribuyeron a otras variables no contempladas en este estudio.

También se analizaron por GC-FID-MS los aceites esenciales de las inflorescencias de *A. flaccida* y *G. gaudichaudianum*, con fines comparativos. No existían en la bibliografía datos informados hasta el momento, de manera que su estudio también constituyó una contribución a la caracterización química de estas especies (Retta y col., 2009; 2011b).

Los rendimientos de aceite esencial en muestras de inflorescencias de *A. flaccida*, calculados sobre droga seca, fueron de 0,1-0,8 % (V/P) (n = 11), y resultaron mayores que en *A. saturoioides*.

La composición química del aceite esencial de *A. flaccida* se caracterizó por presentar, como en *A. saturoioides*, altas concentraciones de alfa-pineno y beta-cariofileno. El perfil cromatográfico fue muy similar al obtenido con *A. saturoioides*. Según el análisis estadístico las muestras se agruparon en dos conjuntos bien definidos, nuevamente alfa-pineno fue el compuesto discriminante. En esta especie la agrupación podría presentar una correlación con los orígenes geográficos de las muestras estudiadas (Retta y col., 2009).

En el caso de *G. gaudichaudianum*, las muestras de inflorescencias (n = 4) presentaron valores de rendimiento de aceite esencial bajos, 0,1-0,2 % (V/P), calculados sobre droga seca. Los compuestos mayoritarios fueron, como en las otras dos especies estudiadas, alfa-pineno y beta-cariofileno. Estadísticamente se diferenció solo una de las muestras ensayadas, de origen comercial. Los compuestos que más contribuyeron en ese agrupamiento fueron óxido de cariofileno y espatulenol. El perfil cromatográfico presentó similitudes respecto a los obtenidos con las especies *A. saturoioides* y *A. flaccida*. Si bien las tres especies presentan el mismo aroma típico, estas características olfativas no se percibieron en el aceite esencial.

Con los valores promedio de los compuestos mayoritarios de las tres especies estudiadas, se realizó el análisis estadístico comparativo, empleando el análisis de conglomerados y el APC.

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que las muestras se agruparon siguiendo un comportamiento taxonómico. Además, según el análisis por APC, se demostró que los compuestos que contribuyeron a ese agrupamiento fueron los terpenos más pesados, que se encontraron en mayor proporción en *G. gaudichaudianum* (Figura 5).

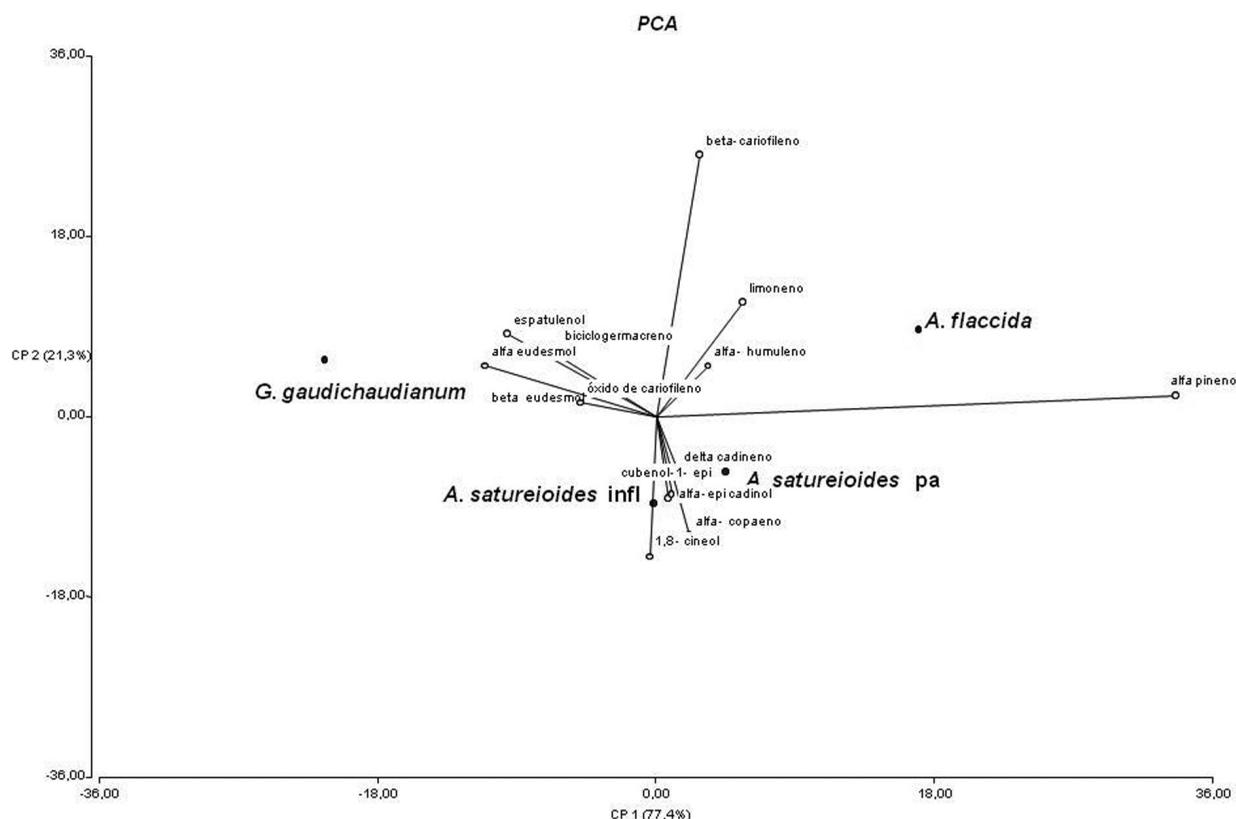
Con el objetivo de profundizar en el estudio de los compuestos responsables del aroma y el sabor de la especie *A. saturoioides* se realizaron análisis organolépticos. Se aislaron por microextracción en fase sólida (SPME) los compuestos volátiles de las inflorescencias y del extracto hexánico, y se analizaron por GC-FID-MS. Tanto las inflorescencias como el extracto hexánico de la “marcela” presentan aroma intenso, agradable, muy persistente y característico. Se eligió esta metodología porque resulta apropiada para la detección de compuestos de alta volatilidad, y que son los que, en general, contribuyen a definir el aroma de un producto o matriz determinada.

Los resultados obtenidos fueron similares para las inflorescencias y para el extracto hexánico obtenido de las inflorescencias, pero no lograron explicar los atributos sensoriales que se perciben olfativamente en la “marcela”, es decir, que no se pudieron identificar los compuestos que se relacionan con el perfil olfativo de la planta. Los perfiles cromatográficos de los volátiles analizados se encontraron, en ambos casos, enriquecidos en los terpenos más volátiles también característicos del aceite esencial de la especie, con diferencias cuantitativas entre las inflorescencias y el extracto hexánico.

Estos resultados indican que el aroma de la “marcela” podría estar dado por una mezcla de varios compuestos o, lo que es más probable, que esté dado por algún compuesto que se encuentre en mínima cantidad, incluso trazas y, por lo tanto, no detectado.

Con respecto al estudio de las características del sabor, se realizaron dos evaluaciones sensoriales con muestras de *A. saturoioides*, *A. flaccida* y *G. gaudichaudianum* con el fin de caracterizar el perfil palativo de cada especie, y encontrar posibles diferencias en sus atributos sensoriales. La primera de las evaluaciones estuvo a cargo de un panel de expertos en sabores de la industria alimentaria, que realizó la degustación de las muestras y describió

Figura 5-. Biplot obtenido por APC a partir del análisis comparativo de las esencias analizadas



los atributos sensoriales que, según su experiencia, mejor caracterizaban a cada una de las especies.

La segunda evaluación estuvo a cargo de profesionales especializados en estudios sensoriales y consistió en realizar ensayos de agrupamientos, ensayos de amargor y astringencia, con las tres especies. Los resultados obtenidos fueron luego analizados mediante técnicas estadísticas de escalamiento multidimensional, análisis de correspondencia y análisis de conglomerados, utilizando los programas SPSS (2006) e Infostat (2008).

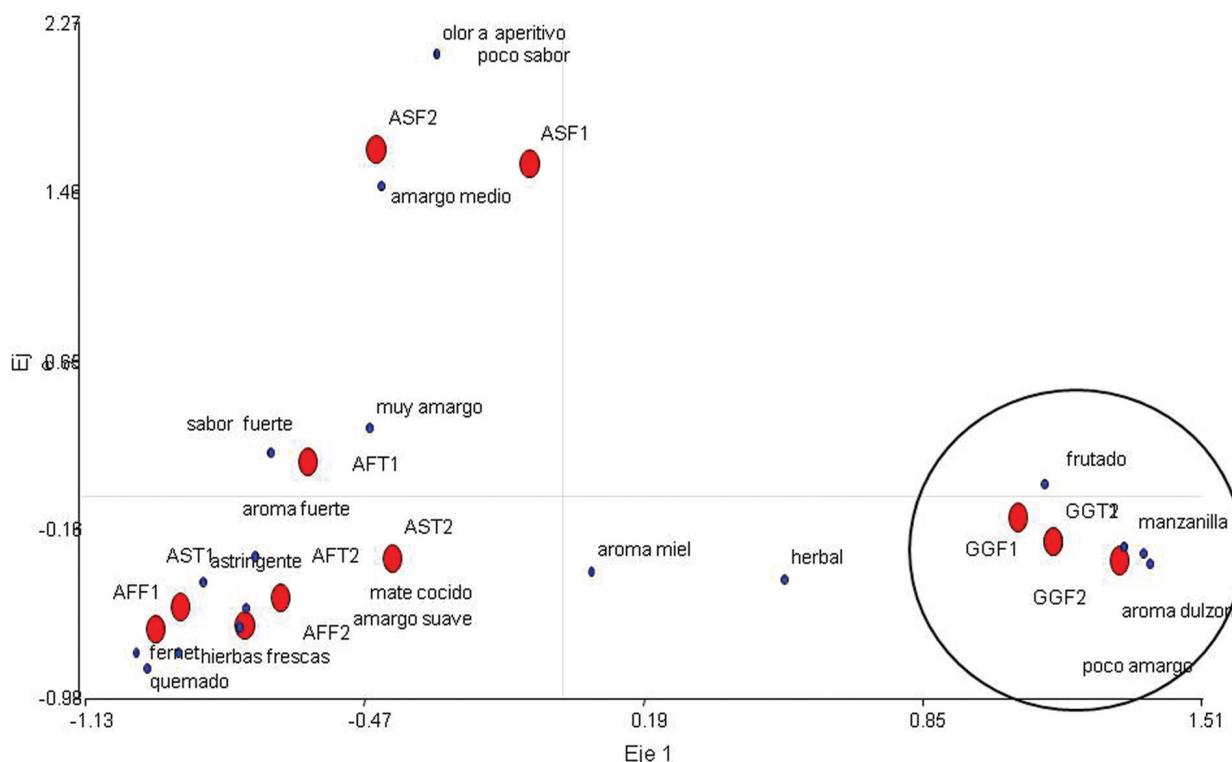
Según una primera evaluación, *A. flaccida* presentó mayor intensidad de amargor y astringencia que el resto, y *G. gaudichaudianum* presentó la menor intensidad de las tres. Además, se observó que si se emplean las partes aéreas florecidas se obtiene un extracto con una mayor intensidad de amargor y astringencia que si se emplean únicamente las inflorescencias. Estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos en una segunda evaluación sensorial, en la que además, se establecieron agrupamientos por similitud entre las tres muestras evaluadas.

Estos agrupamientos permitieron diferenciar a la especie *G. gaudichaudianum*, tanto en la muestra obtenida a partir de partes aéreas florecidas como de las inflorescencias, en un grupo distinto a los otros por su perfil frutal, dulzón y menos amargo y astringente (Figura 6). Estas percepciones fueron además, correspondidas con los resultados obtenidos en el ensayo de amargor y astringencia, donde se encontraron valores menores para esta especie respecto del resto.

Para correlacionar los resultados del análisis sensorial con el contenido de compuestos hidroxifenólicos, se realizó su determinación por espectrofotometría UV en las tres especies.

Los resultados obtenidos demuestran que no se evidenció correlación entre las percepciones de amargor y astringencia y el contenido de fenoles totales. La especie *A. flaccida* resultó ser la más intensa de las tres; sin embargo, fue la especie *A. satureioides* (tanto en sus partes aéreas como en sus inflorescencias) la que presentó mayor contenido de compuestos polifenólicos. Por otra parte, no se encontraron

Figura 6- Análisis de correspondencia de los atributos sensoriales



A. saturoioides (AS), *A. flaccida* (AF) y *G. gaudichaudianum* (GG).

diferencias significativas entre el contenido de fenoles entre *A. flaccida* y *G. gaudichaudianum*, mientras que sus perfiles sensoriales resultaron francamente diferentes. Estos resultados permiten inferir que las distintas percepciones de sabor e intensidad en estas especies no están solo relacionadas con el contenido de compuestos polifenólicos, sino también pueden estar condicionadas por el perfil aromático característico de cada especie.

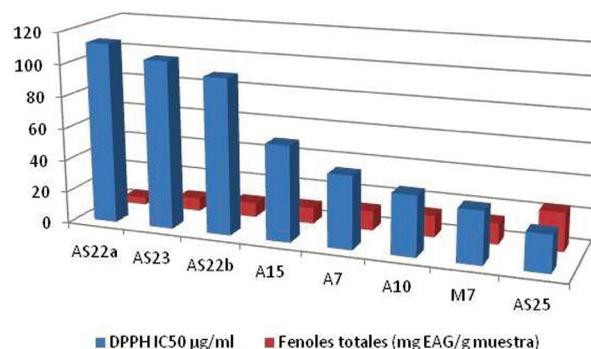
Finalmente, se aprovecharon las distintas fracciones obtenidas para evaluar la capacidad antioxidante (medida como el porcentaje de disminución de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y el cálculo de la concentración inhibitoria del 50 % (IC₅₀) y su relación con el contenido de polifenoles en 8 muestras de *A. saturoioides*, y, por último, la posible acción tripanocida, incluida como parte de la caracterización biológica y con fines comparativos entre *A. saturoioides* y *A. flaccida*.

Mediante la evaluación de la capacidad antioxidante y la determinación del contenido de polifenoles en muestras de *A. saturoioides*, se observó una amplia dispersión en los resultados obtenidos tanto en

la capacidad antioxidante (con valores de IC₅₀ desde 4,47 a 23,98 µg/ml) como en el contenido de fenoles (23,0 a 112,6 mg EAG –equivalente de ácido gálico– /g muestra). Se encontró que existe correlación entre ambas determinaciones en un amplio rango de concentración (Ferraro y col., 2008) (Figura 7).

Respecto a la posible acción tripanocida, no se observó efecto significativo en ninguna de las dos especies en las condiciones de trabajo empleadas.

Figura 7- Contenido de polifenoles totales e IC₅₀



Conclusiones

De acuerdo con los objetivos iniciales planteados para este trabajo, se lograron caracterizar química y sensorialmente las poblaciones de la especie *A. saturoioides* que se encuentran en la Argentina.

Se describieron los perfiles cromatográficos característicos de la especie por todas las metodologías empleadas (CCD, CLAE-DAD y GC-FID-MS).

Los resultados obtenidos por CLAE y espectrofotometría UV/Vis, permiten concluir que la parte de la planta con mayor contenido de flavonoides y polifenoles activos son las inflorescencias; por lo tanto, para usos medicinales se debería emplear únicamente esta parte de la planta. Las partes aéreas totales de la especie diluyen la droga vegetal. Esta conclusión es relevante, dado que el material comercializado actualmente como “marcela”, en general suele presentarse como partes aéreas con mínima cantidad (en peso) de inflorescencias.

Los resultados obtenidos por GC-FID-MS permiten concluir que las principales características aromáticas de *A. saturoioides* no se deben a su aceite esencial, sino a otros compuestos que podrían formar parte del resinoide y, que posiblemente se encuentren en trazas.

El aceite esencial de la “marcela” no mostró tener una característica que permitiera diferenciarla de las otras especies. Por otra parte, no se encontraron en la bibliografía bioactividades de importancia relacionadas con el aceite esencial que justifiquen su determinación. Su bajo contenido y la baja incidencia en su valor comercial—dado que sus propiedades aromáticas no se encuentran relacionadas con su contenido o composición— hacen que la determinación del contenido de aceite esencial en *A. saturoioides* no sea necesario como ensayo en el control de calidad farmacéutico de ese material.

Respecto a los ensayos sensoriales realizados con *A. saturoioides*, *A. flaccida* y *G. gaudichaudianum*, se concluye que sería preferible el empleo de las partes aéreas florecidas—en lugar de las inflorescencias únicamente— porque presentan atributos sensoriales más intensos. Sin embargo, las percepciones de sabor e intensidad en estas especies no estarían determinadas únicamente por el contenido de compuestos polifenólicos, sino que también estarían condicionadas al perfil aromático característico de cada especie (Retta y col., 2010b).

A partir del análisis de las otras dos especies estudiadas, *A. flaccida* y *G. gaudichaudianum*, se presume que *G. gaudichaudianum* es la que presentó diferencias más evidentes por todas las metodologías empleadas, e incluso presentó atributos sensoriales más alejados del resto. Estos resultados permiten presumir que la utilización de esta especie como materia prima saborizante o aromática no es equivalente a *A. saturoioides*; se considera entonces como un adulterante o contaminante no deseable. Por otra parte, tampoco sería válida su sustitución para usos medicinales porque esta especie no presenta los mismos compuestos activos que *A. saturoioides*.

Además, las diferencias entre *A. saturoioides* y *A. flaccida* resultaron menos evidentes, tanto en la fracción volátil como no volátil, pues ambas especies presentan los mismos compuestos marcadores y en similar concentración. Sensorialmente se encontraron leves diferencias. Sin embargo, el empleo de la especie *A. flaccida* como un sustituto válido de *A. saturoioides* estaría supeditado a otros estudios multidisciplinarios que permitan avalar esta situación desde otros puntos de vista, como el toxicológico o ecológico.

Los resultados obtenidos generan un aporte a la definición de especificaciones químicas de *A. saturoioides* de manera que garanticen tanto su identidad, eficacia y calidad y, además, contribuyen a asegurar su homogeneidad en el mercado local. Incluso estos resultados pueden ser tenidos en cuenta al momento de seleccionar los mejores materiales para los procesos de domesticación de esta especie vegetal.

Referencias bibliográficas

- De Souza, K.C.B.; Schapoval, E.E.S.; Bassani, V.L. (2002). “LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline saturoioides* preparations”. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28: 771-777.
- Díaz, C.; Heinzen, H. (2006). “Variaciones en el perfil de flavonoides y en la cantidad de quercetina libre en diferentes extractos de *Achyrocline saturoioides*”. *Lat. Am. J. Pharmacy* 25: 574-757.
- Dok-Go, H.; Lee, K.H.; Kim, H.J.; Lee, E.H.; Lee, J.; Song, Y.S.; Lee, Y.H.; Jin, C.; Lee, Y.S.; Cho, J. (2003). “Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin

- and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*". *Brain Res.* 965: 130-136.
- Farmacopeia Brasileira (2001). 4ª Ed. Ateneu, Rio de Janeiro.
- Ferraro, G.; Anesini, C.; Ouviaña, A.; Retta, D.; Filip, R.; Gattuso, M.; Gattuso, S.; Hnatyszyn, O.; Bandoni, A. (2008). "Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline satureioides* flowers from different zones in Argentina". *Lat. Am. J. of Pharmacy* 27(4): 626-628.
- García, G.; Campos, R.; De Torres, R.; Broussalis, A.; Ferraro, G.; Martino, V.; Coussio, J. (1990). "Antiherpetic activity of some Argentine medicinal plants". *Fitoterapia* 61: 542-546.
- Gattuso, M.; Cortadi, A.; Rodríguez, M. V.; Mc Cargo, J.; Retta, D.; Bandoni, A.; Ferraro, G.; Gattuso, S. (2008). "Caracteres florales en la identificación de *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline flaccida* y *Gnaphalium gaudichaudianum* (Asteraceae-Inuleae)". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(5): 247-256.
- Giangualani, R. (1976). "Las especies argentinas del género *Achyrocline* (Compositae)". *Darwiniana* 20: 549-576.
- Gutkind, G.; Norbedo, C.; Mollerach, M.; Ferraro, G.; Coussio, J.; De Torres, R. (1984). "Antibacterial activity of *Achyrocline flaccida*". *Journal of Ethnopharmacol.* 10: 319-321.
- Hnatyszyn, O.; Moscatelli, V.; Rondina, R.; Costa, M.; Arranz, C.; Balaszczuk, A.; Coussio, J.; Ferraro, G. (2004). "Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig *corpus cavernosum*". *Phytomedicine* 11: 366-369.
- ICH *Harmonised tripartite guideline* (2005). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1).
- InfoStat (2008). *InfoStat, versión 2008*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Editorial Brujas, Córdoba.
- Kadarian, C.; Broussalis, A.; Miño, J.; López, P.; Gorzalczany, S.; Ferraro, G.; Acevedo, C. (2002). "Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC". *Pharmacological Res.* 45: 57-61.
- Langeloh, A. (1988). "Atividade antiespasmódica do extrato alcoólico de marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC)". *Vittalle* 3: 66.
- Morquio, A.; Ferreira, M.; Arredondo, F.; Blasina, F.; Echeverry, C.; Abin, J.A.; Dajas, F. (2004). "Estudio comparativo de compuestos polifenólicos, actividad citoprotectora y antioxidante en especies autóctonas del género *Achyrocline*". *Estudios de domesticación y cultivos de especies medicinales y aromáticas nativas*. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) Serie FPTA-INIA 11.
- Morquio, A.; Rivera-Megret, F.; Dajas, F. (2005). "Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* ('marcela')". *Phytother. Res.* 9: 486-490.
- Oliveira Simões, C.M. (1988). "Antiinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically". *Fitoterapia* 59: 419-421.
- Oliveira Simões, C.M.; Schenkel, E.; Bauer, L.; Langeloh, A. (1988). "Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae." *Journal of Ethnopharmacol.* 22: 281-293.
- Ratera, E.; Ratera, M. (1980). *Plantas de la Flora Argentina empleadas en la medicina popular*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 81.
- Retta, D.; Gattuso, M.; Gattuso, S.; Di Leo Lira, P.; van Baren, C.; Ferraro, G.; Bandoni, A. (2009). "Essential oil composition of *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. (Asteraceae) from different locations of Argentina". *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 877-881.
- Retta, D.; Fernández Penuto, R.; Correa, M.; Gattuso, M.; Gattuso, S.; Bandoni, A. (2010a). "Diferenciación de las especies *Achyrocline satureioides*, *A. flaccida* y *Gnaphalium gaudichaudianum* por sus perfiles cromatográficos". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(2): 93-99.
- Retta, D.; van Baren, C.; Bandoni, A.; Galmarini, M.; Zamora, M. (2010b). "Evaluación sensorial de tres especies de Marcela (*Achyrocline satureioides*) y su relación con el contenido de compuestos fenólicos". Resumen del VI Simposio Iberoamericano de Análisis sensorial, San Pablo, Brasil.
- Retta, D.; López, P.; Gattuso, M.; Gattuso, S.; Filip, R.; Ferraro, G.; Bandoni, A. (2011a). "Optimization and validation of the quantitative assay of flavonoids in *Achyrocline satureioides* and *A. flaccida*". *Lat. Am. J. Pharm.* 30(7): 1360-1365.

- Retta, D.; Di Leo Lira, P.; van Baren, C.; Bandoni, A. (2011b). "Análisis cuali-cuantitativo del aceite esencial de *Gnaphalium gaudichaudianum* DC. por GC-FID-MS". Resumen VI Simposio Brasileiro Oleos Esenciais, Campinas, Brasil.
- Rubio, S.; Quintana, J.; López, M.; Eiroa, J.; Triana, J.; Estévez, F. (2006). "Phenylbenzopyrones structure-activity studies identify betuletol derivatives as potential antitumoral agents." *Eur. J. Pharmacol.* 548: 9-20.
- Sonaglio, D.; Petrovick, P.; Bassani, V. (1986). "Padronizacao de extractos vegetais: extrato hidroalcoólico de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae (Marcela): Comparação entre cromatografia líquida de alta eficiencia e cromatografia em papel/ultravioleta". *Caderno de Farmácia* 2: 55-74.
- SPSS versión 15.0 (2006). Inc. Chicago, IL.
- Takeara, R.; Albuquerque, S.; Lopes, N.P.; Lopes, J.L.C. (2003). "Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart. (Vernonia, Asteraceae)". *Phytomedicine* 10: 490-493.
- Toursarkissian, M. (1980). *Plantas Medicinales de la Argentina*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 25.
- van Puyvelde, L.; De Kimpe, N.; Costa, J.; Munyjabo, V.; Nyirankuliza, S.; Hakizamungu, E.; Schamp, N. (1989). "Isolation of flavonoids and a chalcone from *Helichrysum odoratissimum* and synthesis of helichrysetin". *J. Nat. Prod.* 52: 629-633.