

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Departamento de Farmacología
Cátedra de Farmacognosia

Potencial biofarmacéutico de los frutos de
Ilex paraguariensis St. Hilaire (Aquifoliaceae):
fitoquímica y actividades biológicas relacionadas



Autor: Farm. Laura C. Coghi
Director: Prof. Dra. Rosana Filip
Codirector: Prof. Dra. Claudia A. Anesini

2016

Agradecimientos

A la Prof. Dra. Rosana Filip por su generosidad, guía y apoyo incondicional en este trabajo y en lo personal. Por compartir conmigo su capacidad de mirar lo que otros no ven.

A la Prof. Dra. Claudia Anesini por su orientación, dedicación...¡y paciencia!

A la Dra. Paula López por convocarme para trabajar en la Cátedra de Farmacognosia y guiarme en el aprendizaje de las técnicas de Cromatografía y de Control de Calidad. Por su cariño, apoyo y confianza en mí.

Al Ing. Walter Martínez por facilitarnos las muestras de frutos y recibirnos tan cálidamente en el Establecimiento “Las Marías”.

Al Dr. Gustavo Giberti por su colaboración en la identificación botánica del material vegetal y por su invaluable aporte de bibliografía. Por su generosidad y calidez.

A la Prof. Dra. Silvina Drago por permitirnos realizar el desarrollo tecnológico bajo su dirección en el laboratorio del Instituto de Tecnología de los Alimentos perteneciente a la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral.

Al Bioq. Néstor Pellegrino y la Bioq. M. Silvia Giacomino por su colaboración en el estudio de las propiedades nutricionales.

A la Prof. Dra. Susana Gorzalczany por su colaboración con los ensayos farmacológicos y toxicológicos.

Al Odontólogo Sebastián Turner por su colaboración en el ensayo con glándulas submandibulares.

A la Sra. Norma Basualdo por su colaboración en la preparación de los extractos.

A mis compañeras de laboratorio: Rosario Alonso y Rita Lemos por compartir conmigo alegrías y tristezas. ¡Disfruto mucho de su compañía!

A María Elena. ¡Gracias por ayudarme en la compaginación!

A todos mis compañeros de la Cátedra de Farmacognosia.

Parte de los resultados presentados en el presente trabajo han sido publicados y presentados en Congresos.

Publicaciones:

“Nutritional and Phytochemical study of *Ilex paraguariensis* fruits”.

Cogoi, L., Giacomino, M. S., Pellegrino, N., Anesini, C. & Filip, R., 2012. Journal of Chemistry Volume 2013, Article ID 750623.

Presentaciones en Congresos:

“Phytochemical and pharmacological study of the ripe fruits from *Ilex paraguariensis*”.

Cogoi, L., Martino, R., Anesini, C. & Filip, R. XXII Simposio de plantas medicinais do Brasil. 18 al 21 de septiembre de 2012. Bento Gonçalves, Brasil.

“Phytochemical Study of *Ilex Paraguariensis* Fruits”.

Cogoi, L., López, P., Giacomino, M. S., Pellegrino, N., Anesini, C., Ferraro, G. E. & Filip, R. Primer Simpósio Internacional sobre Yerba mate y Salud. 17 y 18 de Octubre de 2008. Montevideo, Uruguay.

“Análisis por HPLC de Metilxantinas en frutos de *Ilex paraguariensis*”.

Cogoi, L., López, P., Ferraro, G. & Filip, R. XVI Congreso Italo – Latinoamericano de Etnomedicina “Carlos L. Spegazzini”. 4 al 8 de Septiembre de 2007. La Plata, Argentina.

Abreviaturas

$^1\text{O}_2$: oxígeno singulete

8-OH-dG: 8-hidroxi deoxiguanosina

AAPH: 2,2'-azobis-2-amidinopropano

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico

AEDBE: éster del ácido 2-aminoetil difenilbórico

AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

AP-1: proteína de activación 1

CE₅₀: concentración efectiva media

CEEM: consumo específico de energía mecánica

cm.: centímetros

cm³: centímetros cúbicos

CO₂: dióxido de carbono

DAB: diaminobencidina

DCQ: dicafeilquínico

DPPH: 2,2-difenil-1-picril hidrazilo

EA: extractos acuosos

EAA: espectrofotometría de absorción atómica

ECNT: enfermedades crónicas no transmisibles

EDTA: ácido etilendiamino tetracético

EM: extractos metanólicos

ERN: especies reactivas del nitrógeno

ERO: Especies reactivas del oxígeno

ESM: error estándar de la media

FAME: metil ésteres de ácidos grasos

FDI: fibra dietaria insoluble

FDS: fibra dietaria soluble

FDT: fibra dietaria total

FE: fase estacionaria

FM: fase móvil
g: gramos
GC: cromatografía gaseosa
GSH: glutatión
GSSG: glutatión oxidado
H₂O₂: peróxido de Hidrógeno
HEPES: sal sódica del ác. 4-(2-hidroxietyl) piperazin-1-etansulfónico
HO: radical hidroxilo
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
 λ : longitud de onda
LDL: lipoproteínas de baja densidad
M: molar
mg: miligramos
min: minutos
mm: milímetros
mM: milimolar
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio
N: velocidad de rotación del tornillo
NADPH: nicotina adenina dinucleótido fosfato oxidasas
NBT: azul de nitrotetrazolio
NF-kB: factor nuclear kB
nm: nanometros
NO: óxido nítrico
NOX: nicotina adenina dinucleótido fosfato oxidasas
O₂^{•-}: anión superóxido
°C: grados centígrados
ONOO⁻: anión peroxinitrito
PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo
PON-1: paraoxonasa 1
ppm: partes por millón

Px: peroxidasa

Qss: caudal másico sobre base seca

R²: coeficiente de correlación lineal

RDA: ingesta diaria recomendada

Rf: relación de frente

ROO: lipoperóxidos

SBS: sobre base seca

SD: desvío estándar

SOD: superóxido dismutasa

T: momento torsor

TLC: cromatografía sobre planos

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

tr: tiempo de retención

Trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

UV: luz ultravioleta

μ : micrómetros

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. Género <i>Ilex</i> | 1 |
| 2. <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hilaire..... | 2 |
| 2.1. Generalidades..... | 2 |
| 2.2. Descripción botánica..... | 3 |
| 2.3. Breve descripción histórica | 6 |
| 2.4. Cultivo..... | 7 |
| 2.5. Procesamiento industrial..... | 8 |
| 2.6. Usos | 9 |
| 2.7. Legislación y Comercio..... | 10 |
| 2.8. Composición química..... | 13 |
| 2.9. Principales actividades biológicas..... | 16 |
| 3. Frutos de <i>I. paraguariensis</i> St. Hilaire..... | 18 |
| 4. Residuos agroindustriales | 19 |
| 5. Principales grupos fitoquímicos de interés en este trabajo..... | 21 |
| 6. Daño oxidativo y antioxidantes..... | 27 |
| 6.1. Especies reactivas del oxígeno..... | 27 |
| 6.2. Sistemas de defensa antioxidante | 29 |
| 6.3. Estrés oxidativo..... | 31 |
| 6.4. Papel de las especies reactivas del oxígeno en la salud..... | 33 |
| 6.5. Papel de las especies reactivas del oxígeno en la enfermedad..... | 33 |
| 6.6. Uso de antioxidantes exógenos..... | 34 |
| 6.7. Actividad Antioxidante de la yerba mate..... | 34 |
| OBJETIVOS..... | 36 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 39 |
| 1. Material vegetal..... | 39 |
| 1.1. Procesamiento del material vegetal..... | 39 |
| 2. Solventes, reactivos, medios de cultivo y estándares de referencia..... | 39 |
| 2.1. Solventes..... | 39 |

| | |
|--|----|
| 2.2. Reactivos y medios de cultivo..... | 40 |
| 2.3. Estándares de referencia | 41 |
| 3. Equipos e Instrumental Analítico..... | 42 |
| 4. Parte I: Estudio de la composición química..... | 44 |
| 4.1. Estudio fitoquímico..... | 44 |
| 4.1.a. Extractos acetónicos..... | 44 |
| 4.1.a.1. Preparación de los extractos acetónicos para la determinación compuestos triterpénicos..... | 44 |
| 4.1.a.2. Preparación de los extractos acetónicos para la determinación de antocianinas..... | 44 |
| 4.1.a.3. Análisis de los extractos..... | 45 |
| 4.1.a.3.1. Análisis de triterpenos | 45 |
| 4.1.a.3.2. Análisis de antocianinas..... | 46 |
| 4.1.b. Extractos metanólicos..... | 49 |
| 4.1.b.1. Preparación de los extractos para la determinación de metilxantinas y polifenoles..... | 49 |
| 4.1.b.2. Análisis de los extractos..... | 49 |
| 4.1.b.2.1. Análisis de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina)..... | 49 |
| 4.1.b.2.2. Análisis de polifenoles..... | 50 |
| 4.1.c. Extractos acuosos..... | 51 |
| 4.1.c.1. Preparación de los extractos para la determinación de saponinas..... | 51 |
| 4.1.c.2. Preparación de los extractos para la determinación de metilxantinas y polifenoles | 52 |
| 4.1.c.3. Análisis de los extractos..... | 52 |
| 4.1.c.3.1. Análisis de saponinas..... | 52 |
| 4.1.c.3.2. Análisis de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina)..... | 53 |
| 4.1.c.3.3. Análisis de polifenoles..... | 53 |
| 4.2. Estudio de las propiedades nutricionales..... | 54 |
| 4.2.a. Determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa..... | 54 |
| 4.2.b. Determinación de minerales..... | 55 |
| 4.2.c. Análisis de la Composición Centesimal..... | 55 |

| | |
|--|----|
| 5. Parte II: Estudios farmacológicos y toxicológicos..... | 58 |
| 5.1. Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> | 58 |
| 5.1.a. Actividad frente al radical libre ABTS..... | 58 |
| 5.1.b. Actividad frente al radical libre DPPH..... | 59 |
| 5.1.c. Actividad inhibidora de la peroxidación lipídica. Ensayo del FTC..... | 61 |
| 5.1.d. Actividad similar enzimática..... | 62 |
| 5.2. Análisis de la actividad antioxidante en glándulas submandibulares..... | 66 |
| 5.2.a. Efecto sobre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno | 67 |
| 5.2.b. Determinación de la actividad enzimática..... | 68 |
| 5.3. Efecto sobre el tránsito intestinal..... | 69 |
| 5.4. Ensayo de toxicidad aguda..... | 70 |
| 6. Parte III: Desarrollo tecnológico de un producto alimenticio..... | 71 |
| 6.1. Procesamiento del material vegetal..... | 71 |
| 6.2. Preparación de las mezclas para extrudir..... | 73 |
| 6.3. Proceso de Extrusión..... | 73 |
| 6.3.a. Condiciones..... | 73 |
| 6.3.b. Evaluación del proceso de extrusión | 74 |
| 6.4. Evaluación de las características fisicoquímicas de los productos obtenidos.... | 75 |
| 6.5. Análisis de las harinas obtenidas por molienda de los productos extrudidos.... | 76 |
| 7. Análisis estadístico..... | 80 |
| 7.1. Estudio de la composición química..... | 80 |
| 7.1.a. Estudio fitoquímico..... | 80 |
| 7.1.b. Estudio de las propiedades nutricionales..... | 80 |
| 7.2. Estudios farmacológicos..... | 80 |
| 7.3. Desarrollo tecnológico de un producto alimenticio..... | 81 |
| 7.3.a. Determinación de la humedad de las harinas para extrudir..... | 81 |
| 7.3.b. Evaluación de las características fisicoquímicas de los productos extrudidos..... | 81 |
| 7.3.c. Análisis de las harinas obtenidas por molienda de los productos extrudidos.. | 82 |

| | |
|--|-----|
| RESULTADOS..... | 83 |
| 1. Parte I: Estudio de la composición química..... | 83 |
| 1.1. Estudio fitoquímico..... | 83 |
| 1.1.a. Extractos acetónicos..... | 83 |
| 1.1.a.1. Análisis de triterpenos..... | 83 |
| 1.1.a.2. Análisis de antocianinas..... | 86 |
| 1.1.b. Extractos metanólicos..... | 89 |
| 1.1.b.1. Análisis de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) por HPLC..... | 89 |
| 1.1.b.2. Determinación de polifenoles por HPLC..... | 92 |
| 1.1.b.3. Determinación de polifenoles totales por espectrofotometría UV – Vis..... | 98 |
| 1.1.c. Extractos acuosos..... | 99 |
| 1.1.c.1. Determinación de saponinas totales por HPLC..... | 99 |
| 1.1.c.2. Determinación de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) por HPLC..... | 102 |
| 1.1.c.3. Determinación de polifenoles por HPLC..... | 103 |
| 1.1.c.4. Determinación de polifenoles totales por espectrofotometría UV – Vis..... | 104 |
| 1.2. Estudio de las propiedades nutricionales..... | 104 |
| 1.2.a. Determinación de ácidos grasos..... | 104 |
| 1.2.b. Determinación de minerales..... | 106 |
| 1.2.c. Composición centesimal..... | 107 |
| 2. Parte II: Estudios farmacológicos y toxicológicos..... | 108 |
| 2.1. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> | 108 |
| 2.1.a. Actividad frente al radical libre ABTS..... | 108 |
| 2.1.b. Actividad frente al radical libre DPPH..... | 109 |
| 2.1.c. Actividad inhibidora de la peroxidación lipídica. Ensayo del FTC..... | 110 |
| 2.1.d. Actividad simil enzimática..... | 111 |
| 2.2. Evaluación de la actividad antioxidante en glándulas submandibulares..... | 114 |
| 2.2.a. Análisis de las glándulas submandibulares provenientes de animales control y de animales tratados con estreptozotocina..... | 114 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.b. Efecto de los extractos sobre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.. | 115 |
| 2.2.c. Efecto de los extractos sobre las enzimas antioxidantes..... | 117 |
| 2.3. Efecto sobre el tránsito intestinal..... | 119 |
| 2.4. Ensayo de toxicidad aguda..... | 119 |
| 3. Parte III: Desarrollo tecnológico de un producto alimenticio..... | 120 |
| 3.1. Características de las harinas obtenidas..... | 120 |
| 3.2. Evaluación del proceso de extrusión a 160 °C..... | 120 |
| 3.3. Evaluación de las características fisicoquímicas de los productos obtenidos... | 121 |
| 3.4. Evaluación de las características fisicoquímicas de las harinas obtenidas a partir de los productos extrudidos..... | 122 |
| DISCUSIÓN..... | 124 |
| 1. Parte I: Estudio de la composición química..... | 124 |
| 1.1. Estudio Fitoquímico..... | 124 |
| 1.1.a. Extractos acetónicos..... | 124 |
| 1.1.a.1. Compuestos triterpénicos..... | 124 |
| 1.1.a.2. Antocianinas..... | 125 |
| 1.1.b. Extractos metanólicos..... | 128 |
| 1.1.b.1. Determinación de cafeína y teobromina por HPLC..... | 128 |
| 1.1.b.2. Determinación de compuestos polifenólicos (ácidos cafeilquínicos y flavonoides) por HPLC..... | 129 |
| 1.1.b.3. Valoración de polifenoles totales por espectrofotometría UV-Vis..... | 131 |
| 1.1.c. Extractos acuosos..... | 132 |
| 1.1.c.1. Determinación de saponinas por HPLC..... | 132 |
| 1.1.c.2. Determinación de cafeína y teobromina por HPLC..... | 134 |
| 1.1.c.3. Determinación de compuestos polifenólicos (ácidos cafeilquínicos y flavonoides) por HPLC..... | 134 |
| 1.1.c.4. Determinación de polifenoles totales por espectrofotometría UV-Vis..... | 135 |
| 1.2. Estudio de las propiedades nutricionales..... | 135 |

| | |
|--|-----|
| 1.2.a. Determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa..... | 135 |
| 1.2.b. Determinación de minerales | 136 |
| 1.2.c. Determinación de la composición centesimal..... | 138 |
| 2. Parte II: Estudios farmacológicos y toxicológicos..... | 140 |
| 2.1. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> | 140 |
| 2.2. Evaluación de la actividad antioxidante en glándulas submandibulares..... | 144 |
| 2.3. Análisis del efecto sobre el tránsito intestinal..... | 148 |
| 2.4. Ensayo de toxicidad aguda..... | 149 |
| 3. Parte III: Desarrollo tecnológico de un producto alimenticio..... | 150 |
| CONCLUSIONES..... | 157 |
| RESUMEN..... | 161 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 163 |

INTRODUCCIÓN

1. GÉNERO *Ilex*

El género *Ilex* (Aquifoleaceae) comprende entre cuatrocientas y seiscientas especies distribuidas en todos los continentes según Loizeau y col. (2005) y Keller y Giberti (2011), especialmente en regiones con clima tropical y subtropical (Giberti, 1994a). Crece espontáneamente en Europa, sudeste de América del Norte, América Central, Sudamérica, sudeste de Asia, regiones centrales de África y norte de Australia, tal como se muestra en la **Figura 1**.

Las especies presentes en la Argentina son las siguientes: *Ilex affinis* Gardner, *Ilex argentina* Lillo, *Ilex brasiliensis* (Spreng.) Loes, *Ilex brevicuspis* Reissek, *Ilex dumosa* Reissek, *Ilex microdonta* Reissek, *Ilex paraguariensis*. St. Hilaire e *Ilex theezans* Martius (ex Reissek) (Giberti, 1994b; 1998a; 2008; Keller y Giberti, 2011). De todas ellas, la más importante es *I. paraguariensis*, ya que es la materia prima utilizada para la elaboración de “yerba mate”, producto con el que se prepara una bebida típica con acción estimulante, cuyo consumo data del siglo XVI.

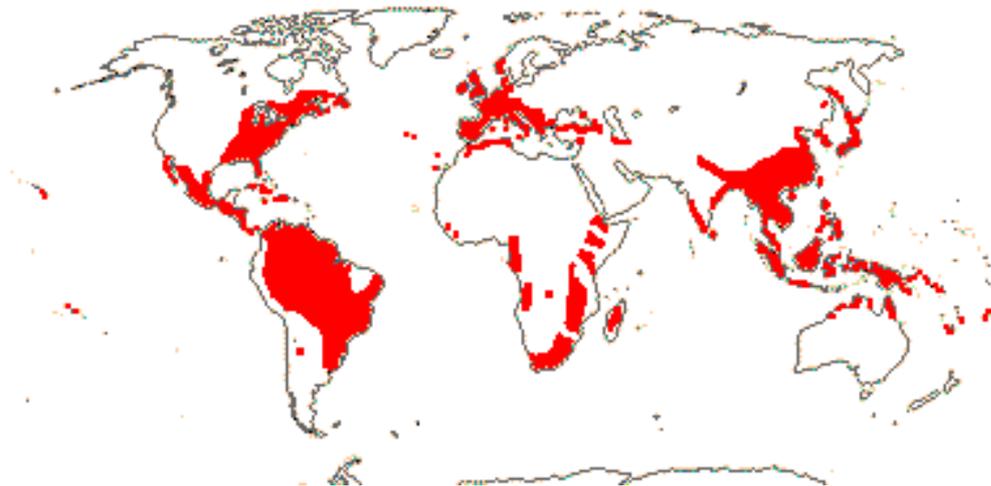


Figura 1: Distribución geográfica del género *Ilex*. Adaptado de Loizeau y col. (2005).

2. *Ilex paraguariensis* ST. HILAIRE

2.1. Generalidades

I. paraguariensis fue descrita como una nueva especie en el año 1822, por Auguste C. De Saint Hilaire, basado en sus propias colecciones obtenidas en los alrededores de Curitiba, Brasil. Sus sinónimos son: *Ilex maté* St. Hil. (1822), *Ilex paraguariensis* D. Don (1824) e *Ilex domestica* Reisseck (1861). Comúnmente se la denomina: “yerba mate”, “mate”, “té de los jesuitas” (español); “maté”, “brazilian tea”, “paraguay tea” (inglés); “erva mate”, “folha de mate” (portugués); “maté”, “thé du Paraguay” (francés); “mate”, “mate foglia”, “mate erba”, “te del Paraguay” (italiano) (Cañigual, Vila y Wichtl, 1998; Giberti, 1998b).

I. paraguariensis crece naturalmente en América del Sur, en la zona delimitada por el océano Atlántico al Este y por el río Paraguay al Oeste, entre los 18 y 30 grados de latitud Sur, como se muestra en la **Figura 2**. Se la encuentra en el noreste de Argentina, Sur de Brasil y Este de Paraguay, países donde actualmente es cultivada. En nuestro país se cultiva únicamente en dos provincias: Misiones y noreste de Corrientes, debido a las condiciones agroecológicas necesarias para su desarrollo (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, Informe N° 27 sobre Yerba mate, Agosto 2010).

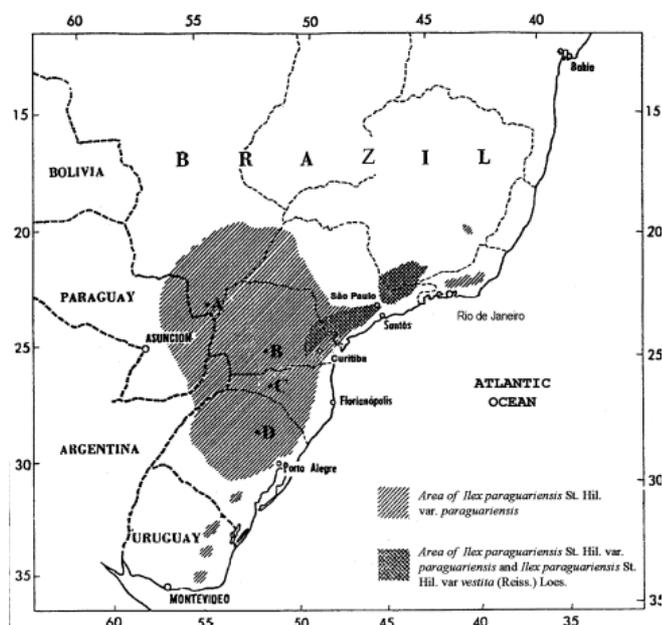


Figura 2: Distribución geográfica de *I. paraguariensis* en América del Sur. Tomado de Grondona (1954).

Los requerimientos ecológicos de esta especie, incluyen una precipitación media anual no inferior a 1.200 mm y una distribución pareja de las lluvias a lo largo del año, con un mínimo durante el trimestre más seco (invierno en la región) de 250 mm. Su área de distribución silvestre está siempre libre de déficit hídrico. La temperatura media anual requerida es de 21 a 22 °C y la temperatura mínima absoluta debe ser no menor a 6 °C (Giberti, 1992).

El cultivo de la yerba mate en Argentina reviste gran importancia socio-económica y además de presentar un elevado índice de consumo doméstico, genera ingresos por ventas en el exterior. Moviliza al sector productivo, industrial y comercial, siendo un cultivo estratégico desde el punto de vista de ocupación de mano de obra y desarrollo regional.

2.2. Descripción botánica

Sobre la base de la morfología, se pueden identificar dos variedades de *I. paraguariensis*. Estas son: *I. paraguariensis* var. *paraguariensis*, que es completamente

glabra e *I. paraguariensis* var. *vestita*, que es densamente pubescente. Ambas coexisten en áreas limitadas de Brasil (Giberti, 1994c) pero solamente la primera es cultivada.

La especie posee hojas perennes, alternas, de consistencia coriácea y de color verde oliváceo. Pueden medir hasta 8 cm de largo, tienen forma obovada, márgenes aserrados y base cuneada. Los pecíolos pueden medir hasta 15 mm de largo (Dellacasa y Bandoni, 2001).

Las flores, unisexuales, se ubican en distintos individuos por tratarse de una especie dioica, característica compartida por todas las especies del género (Giberti y Gurni, 2008). Por otro lado, corresponden al grado menos diferenciado entre las flores díclinas ya que en las flores masculinas existen rudimentos de los órganos femeninos (pistilodeo) y en las femeninas, rudimentos de los masculinos (estaminodios). Las flores masculinas se hallan reunidas en pequeñas inflorescencias cimosas en las axilas de las hojas y son mucho más numerosas que las femeninas. Las flores femeninas también están agrupadas en las axilas de las hojas, pero en general sobre pedúnculos no ramificados. Tanto las corolas de las flores masculinas como las de las femeninas son de color blanco-amarillentas y de un diámetro aproximado de 7 mm (Clos y Bellati, 1937).

La floración ocurre en primavera, de Octubre a Noviembre. Las flores permanecen abiertas durante varios días y son visitadas por muchos insectos; la polinización es entomófila, principalmente por dípteros (moscas), coleópteros e himenópteros (Ferreira, 1983) (**Figura 3**).

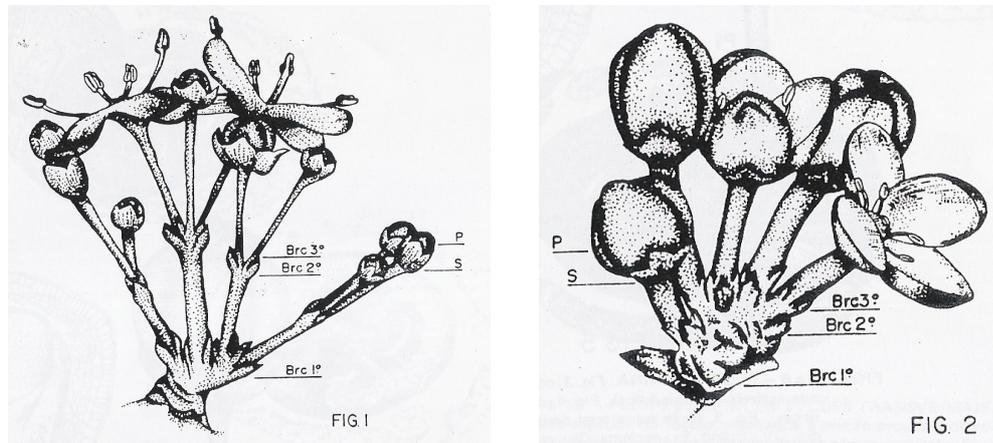


Figura 3: FIG. 1: Inflorescencia masculina. FIG. 2: Inflorescencia femenina. Tomado de: Schoenberg y Dinoutti (1989).

La fructificación se produce entre los meses de Diciembre y comienzos de Mayo. Durante el proceso de maduración, los frutos pueden alcanzar un diámetro de hasta aproximadamente 7 mm (de Araújo Mariath y col., 1995) y su coloración varía de color verde en el fruto inmaduro, luego blanco, rojo, y finalmente negro en el fruto maduro. La diseminación es endozoica (Giberti, 1992).

En muchas semillas externamente maduras es posible observar un embrión rudimentario que determina un largo período de germinación (Ferreira y Hu, 1984). El pericarpio está constituido por una epidermis con una cutícula y un parenquima de reserva no especializado. El mesocarpo está constituido por parénquima fundamental que presenta cristales (drusas y monocristales) y esclereidas. El endocarpo está constituido por los ejes vasculares y fibras esclerenquimáticas alargadas transversalmente (de Araújo Mariath y col., 1995).

Los frutos maduros en la planta viva y luego de ser desecados, se pueden observar en la **Figura 4**.



A



B

Figura 4: Frutos de *I. paraguariensis* en la planta viva (A) y secos (B). Fotos: L. Cogui (2013).

2.3. Breve descripción histórica

Los indios guaraníes que habitaban la región mesopotámica de Argentina, fueron los primeros en utilizar esta especie como bebida estimulante y este conocimiento fue transmitido a los jesuitas, quienes comenzaron a cultivarla. Los primeros cultivos datan del año 1670.

La expulsión de los jesuitas de los dominios españoles en el año 1767, representó una regresión en la historia de la yerba mate. Esta dejó de ser cultivada y solamente se aprovecharon los yerbales naturales. Este tipo de manejo forestal se prolongó hasta las primeras décadas del siglo XX. En 1897 se reinició con éxito la plantación de yerba mate en Nueva Germania (Paraguay) y Santa Ana (Argentina). A fines del siglo XIX, los esfuerzos para lograr nuevamente grandes plantaciones de *I. paraguariensis* finalmente tuvieron éxito, especialmente en Argentina (Giberti, 1992).

2.4. Cultivo

I. paraguariensis es una especie que, en condiciones naturales, puede alcanzar hasta 18 metros de altura. En condiciones de cultivo se realizan podas para obtener un porte arbustivo de una altura mucho menor (tres a seis metros) lo que facilita la labor de la cosecha.

La yerba mate en nuestro país representa el tercer cultivo industrial en orden de importancia, con más de 182.000 hectáreas de superficie implantada, según el censo nacional agropecuario del año 2002, ubicándose luego de los cultivos de algodón y de caña de azúcar, tal como se muestra en la **Figura 5**. Los cultivos industriales constituyen una categoría importante dentro de la agricultura, como también lo son los cereales, las forrajeras, hortalizas, legumbres, frutas y oleaginosas.

Estadísticas actualizadas indican un aumento de la superficie cultivada a 204.000 hectáreas en el año 2010 (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, Informe N° 27 sobre Yerba mate, Agosto 2010).

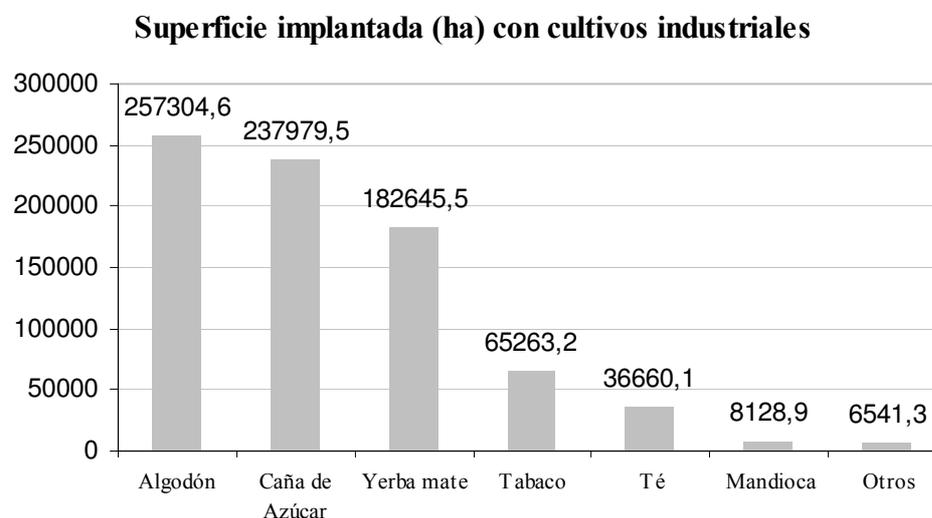


Figura 5: Superficie implantada de los cultivos industriales en Argentina. Tomado de INDEC: Censo Nacional Agropecuario (2002).

2.5. Procesamiento industrial

Las hojas y ramas jóvenes de *I. paraguariensis*, son procesadas para obtener el producto mundialmente conocido como “yerba mate”.

El proceso industrial comprende las siguientes etapas:

- 1) Cosecha: se cortan las ramas con hojas verdes utilizando para ello cuchillos o tijeras. Se separan las ramas gruesas de las finas y estas últimas se colocan en lienzos de arpillera que se anudan formando lo que se conoce con el nombre de “raídos”.
- 2) Sapecado: el sapecado se realiza dentro de las 24 horas posteriores a la cosecha y consiste en la exposición del material a la acción directa del fuego, durante 20 a 30 segundos. Durante este proceso se pierde alrededor de un 39 % de humedad.
- 3) Secado: el secado tiene lugar durante las 24 horas siguientes al sapecado. En este proceso, el material es secado por calor hasta reducir su contenido de humedad a un valor no superior al 7 %. Durante esta etapa, las hojas y tallos finos utilizados para el producto final son separados de los frutos y tallos más gruesos.
- 4) Canchado: consiste en la trituración gruesa del producto proveniente del proceso de secado con el fin de obtener trozos de material vegetal de alrededor de 1 cm², para facilitar su embolsado y transporte.
- 5) Estacionamiento: proceso necesario para que el producto adquiriera las características de sabor, aroma y color requeridas por los consumidores. Puede ser natural o acelerado. En el primero, la yerba es almacenada en un depósito a temperatura ambiente por un período de tiempo de aproximadamente 24 meses. En el estacionamiento acelerado, el material es colocado en una cámara con temperatura y humedad controlada durante un período que oscila entre 30 y 60 días.

6) Molienda: la molienda comprende sucesivas operaciones de trituración, zarandeo y mezcla. En esta etapa se separan los palos de las hojas y se almacenan en silos denominados “percheles”. Una vez concluida la separación de productos con distinto grado de trituración, estos son mezclados para obtener el producto final.

7) Envasado: en este proceso el producto final es colocado en el envase apropiado para su comercialización.

2.6. Usos

Los guaraníes utilizaban las hojas de yerba mate para preparar una bebida estimulante y transmitieron esta costumbre a los jesuitas. También era utilizada como analgésico, diurético, antiulceroso, antirreumático y digestivo. Un uso poco conocido descubierto por los jesuitas fue como material para tintura. La yerba mate canchada era utilizada para preparar una tinta negra para escritura o para teñir géneros y con ella se marcaban las bolsas donde la yerba mate era transportada. Actualmente, sus propiedades tintoreas siguen siendo utilizadas para teñir géneros a partir de preparados de yerba mate de distintas concentraciones a fin de lograr colores con tonalidades diferentes (Martínez Crovetto, 1980).

El uso más antiguo y destacado se debe a las propiedades estimulantes ya que activa las funciones mentales y físicas y ayuda a eliminar la fatiga (González Torres, 1992).

Las formas más populares de consumo incluyen la infusión y el cocimiento. La infusión es preparada en un recipiente especial (antiguamente calabaza) denominado “mate” donde la bombilla es el vehículo para ingerir la preparación. Esta forma de consumo se conoce como “mate cebado”. El cocimiento consiste en la acción del agua a temperatura cercana a la ebullición sobre la droga vegetal y es popularmente llamado “mate cocido”. En regiones de Paraguay, el mate cebado se toma frío y es conocido con el nombre de “tereré”.

A partir del año 1930, surgieron bebidas energizantes con yerba mate y actualmente son comercializadas en supermercados del MERCOSUR, especialmente en Brasil. También pueden encontrarse en Estados Unidos y Europa con distintas marcas comerciales (Bracesco y col., 2011). En la última década, *I. paraguariensis* tiene gran cantidad de usos incluido su empleo en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos (Vieira y col., 2008). Hay que destacar que en la década del 40 fue utilizada como materia prima para la obtención de cafeína, la cual era extraída por arrastre con vapor de agua de los brotes tiernos de la planta. El agua proveniente de la condensación del vapor en este proceso, contenía la cafeína, la cual era separada por decantación y luego purificada para su comercialización como droga química y uso en productos farmacéuticos con propiedades analgésicas (Martinez Crovetto, 1980).

2.7. Legislación y Comercio

- Legislación

La yerba mate se encuentra incluida en Códigos Oficiales de Argentina y de los principales países del mundo, debido a sus propiedades nutricionales, medicinales y funcionales.

Propiedades nutricionales:

Definición de alimento: el *Código Alimentario Argentino* (CAA) define a un “alimento” de la siguiente manera: “toda sustancia o mezcla de sustancias naturales o elaboradas que ingeridas por el hombre aporten a su organismo los materiales y la energía necesarios para el desarrollo de sus procesos biológicos. La designación "alimento" incluye además las sustancias o mezclas de sustancias que se ingieren por hábito, costumbres, o como coadyuvantes, tengan o no valor nutritivo”.

Yerba mate o yerba: El CAA define a la “yerba mate o yerba” como el “producto formado por las hojas desecadas, ligeramente tostadas y desmenuzadas, de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliácea) exclusivamente, mezcladas o no con fragmentos de ramas secas jóvenes, pecíolos y pedúnculos florales.”

La yerba mate también está incluida como alimento en las siguientes publicaciones secundarias: *Codex Alimentarius*, *Código Latinoamericano de Alimentos*, *Reglamento Bromatológico Nacional de Uruguay*; *Catálogo General de Normas Técnicas Paraguayas* y en los Códigos Alimentarios o Estándares equivalentes de Brasil y Chile (Scipioni, Ferreira, & Schmalko, 2007; Tenorio Sanz y Torija Isasa, 1991).

Propiedades medicinales:

La *Farmacopea Argentina* (FA) 7^{ma} Ed. (2003) normaliza las drogas sintéticas y naturales usadas con fines medicinales en nuestro país. La definición de “droga vegetal” incluye: “las plantas o sus partes enteras, molidas o pulverizadas (flores, frutos, semillas, tubérculos, cortezas, etc.) frescas o secas, así como los jugos, gomas, látex, aceites esenciales o fijos y otros componentes similares, que se emplean puras o mezcladas en la elaboración de medicamentos”. Esta bibliografía incluye a la yerba mate dentro de las drogas vegetales y define los parámetros de calidad necesarios para ser usada con fines medicinales. Estos parámetros de calidad ya habían sido incluidos en la bibliografía internacional, como la *British Herbal Pharmacopeia* (Farmacopea Británica de plantas medicinales (1983).

El uso medicinal de las drogas vegetales exige también pautas de seguridad y eficacia. Numerosas publicaciones de relevancia científica que contemplan la seguridad y eficacia de las plantas medicinales más importantes del mundo incluyen a la yerba mate. Entre ellas se encuentran la *Food Standards Agency* (Reino Unido), *The Complete German Commission E Monographs* (Alemania), *Physician Desk Reference (PDR) for herbal medicines* (USA), *The Committee on Herbal Medicinal Products* (HMPC) de la *European Medicines Agency* (EMA), *Farmacopea Ayurvédica* y *Martindale* (The Complete Drug Reference), entre otras.

Propiedades funcionales:

En términos generales, los alimentos funcionales son aquellos que en forma natural o procesada, contienen componentes que ejercen efectos beneficiosos para la salud además de los nutrientes y que pueden contribuir a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas y degenerativas” (Agriculture and Agri-Food Canada, 2014).

En los Estados Unidos, los alimentos funcionales se denominan “alimentos diseñados”, “nutracéuticos”, “farmacoalimentos”, “fitoalimentos”, “fitonutrientes”, “alimentos inteligentes”, “alimentos terapéuticos”, “prebióticos” y “probióticos”, entre otros (Vasconcellos, 2014).

El término “alimento funcional” fue utilizado por primera vez en el año 1984 en un proyecto iniciado por el Ministerio de Educación de Japón, a fin de dilucidar los beneficios de los alimentos en la regulación de los procesos fisiológicos de un organismo vivo (Arai, 1996). Los avances científicos y el aumento en el mercado de productos con posibles beneficios para la salud, motivaron que se creara un sistema regulatorio para alimentos funcionales, conocido como sistema FOSHU (Foods for Specified Health Uses), en el año 1991. Esta regulación se ha ido actualizando con el correr del tiempo debido al gran mercado existente de este tipo de productos en Japón (Ohama, Ikeda y Moriyama, 2006). Al 31 de Agosto de 2007, existían 703 alimentos (con 11 categorías diferentes) para usos específicos en salud, según el sistema FOSHU (Arai, Yasuoka y Abe, 2008). Hasta el momento, Japón es el único país que cuenta con una legislación para alimentos funcionales.

El mercado de los alimentos funcionales muestra una tendencia mundial de aumento tanto en ventas como en productos lanzados al mercado. La incorporación de yerba mate en preparados con propiedades funcionales (diuréticas, energizantes, antioxidantes, hipolipemiantes y como coadyuvantes en el control de peso) también ha mostrado un crecimiento importante en los últimos años (Valls y col., 2013).

- Comercio

El comercio nacional de yerba mate representa un 85 a 90 % de la producción total, lo que indica el elevado consumo doméstico. El consumo anual per cápita reportado en el año 2005 (6,7 kg) fue superado solamente por Uruguay, considerado el mayor consumidor mundial de este producto (7,8 kg. per capita anuales).

El comercio internacional representa sólo un 10 a 15 % de la producción nacional. Los destinos de exportación han ido en aumento, lo que refleja la mayor

demanda a nivel mundial. El número de países importadores de yerba mate ha crecido de 37, en el año 2000, a 46, en nuestros días. Se exporta a los 5 continentes, siendo Siria el mayor importador de nuestro producto, con el 71 % del volumen total exportado. La importación de yerba mate es poco significativa y su origen es Brasil (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, Informe: “Yerba mate value chain”, Julio 2013).

Los principales países importadores de yerba mate argentina se muestran en la **Figura 6**.

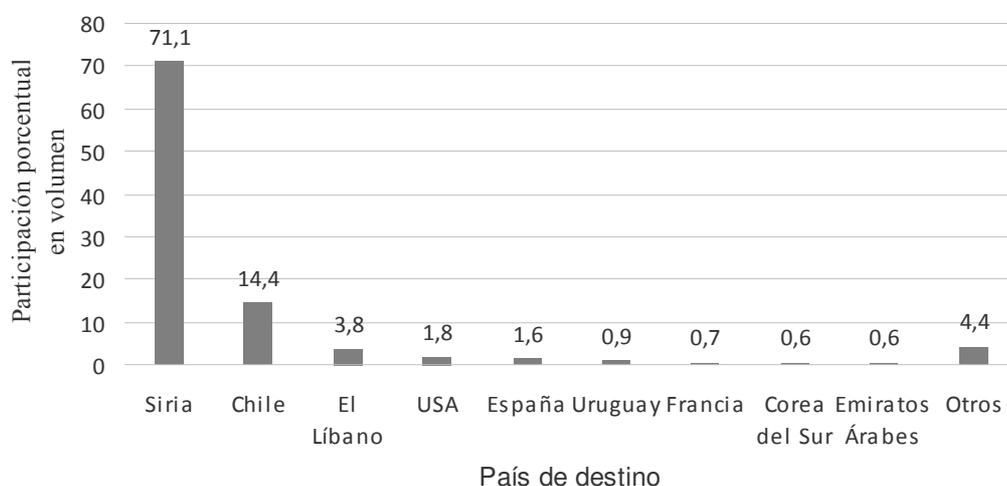


Figura 6: Principales países importadores de yerba mate argentina durante el año 2012 (Adaptado de: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, Informe: “Yerba mate value chain”, Julio 2013).

2.8. Composición química

La composición química de *I. paraguariensis* y del producto comercial “yerba mate”, ha sido y continúa siendo motivo de estudio, debido al interés en las propiedades farmacológicas de los compuestos que posee. Existe una gran variabilidad en su composición química según el origen de la materia prima y las condiciones de procesamiento industrial, que depende de cada establecimiento productor de yerba mate.

Los principales grupos fitoquímicos presentes son:

- Bases xánticas: se ha reportado la presencia de metilxantinas (cafeína y teobromina) en extractos obtenidos por decocción de *I. paraguariensis* (Filip y col., 1998). La presencia de teofilina ha sido también mencionada por otros autores (Mazzafera, 1994).

- Polifenoles: los compuestos más importantes dentro de este grupo son los cafeilderivados: ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido isoclorogénico (ácidos 3,4-dicafeilquínico, 3,5-dicafeilquínico y 4,5-dicafeilquínico) reportados en cocimientos de las hojas de *I. paraguariensis* (Filip y col., 2001).

- Flavonoides: la rutina es el flavonoide mayoritario. También se ha reportado la presencia de quercetina y canferol en decocciones de las hojas de *I. paraguariensis* (Filip y col., 2001), epicatequina y galocatequina (Bracesco y col., 2011), y naringenina (Bojić y col., 2013).

- Ácidos orgánicos: se ha reportado la presencia de los ácidos: p-cumárico, 3,4-dihidroxibenzoico, gálico (Boaventura y col., 2013), ferúlico (Bojić y col., 2013), quínico y cafeilshiquímico (Heck y de Mejía, 2007).

- Triterpenos: dentro de este grupo se encuentran los ácidos triterpénicos libres y las saponinas.

Ácidos triterpénicos: se ha reportado la presencia de ácido ursólico en un extracto etanólico de las hojas pulverizadas de *I. paraguariensis* (Gnoatto y col., 2008).

Saponinas: las saponinas triterpénicas poseen estructuras derivadas de los ácidos ursólico y oleanólico. Gnoatto y col. (2005) han reportado la presencia de 11 saponinas en extractos acuosos de las hojas de *I. paraguariensis*, en tanto que publicaciones más recientes reportan un total de 27 saponinas (de Souza y col., 2011). Las saponinas derivadas del ácido ursólico son las más importantes y corresponden a: matesaponina 1: (3-O-[β-D-glucopiranosil-(1→3)α-L-arabinopiranosil]-(28→1)- β-D-glucopiranosil

éster del ácido ursólico; matesaponina 2: 3-O- $\{\beta$ -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- $[\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)] $\}$ - α -L-arabinopiranosil-(28 \rightarrow 1)- β -D-glucopiranosil éster del ácido ursólico; matesaponina 3: 3-O- $[\beta$ -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosil]- (28 \rightarrow 1)- $[\beta$ -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil] éster del ácido ursólico y matesaponina 4: 3-O- $\{\beta$ -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- $[\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)] $\}$ - α -L-arabinopiranosil-(28 \rightarrow 1)- $[\beta$ -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil] éster del ácido ursólico (Gosmann, Schenkel y Seligmann, 1989; Gosmann y col., 1995). También se han reportado saponinas minoritarias, formas isoméricas de las matesaponinas 1 y 2, las cuales derivan del ácido oleanólico (Martinet y col., 2001).

- Lípidos: se ha reportado fitol, escualeno y derivados del estigmasterol. Entre los ácidos grasos más importantes se destacan el ácido palmítico y el ácido esteárico (Assis Jacques y col., 2006; Jacques y col., 2007).

- Aceites esenciales: estudios realizados sobre el aceite esencial obtenido a partir de la hoja verde reportan la presencia de: hexenal (E)-2 (1,50 %), α -pineno (0,51 %), heptan-2-ona (6 metil-5) (0,66 %), mirceno (1,10 %), sulfuro de furfuril metilo (1,88 %), n-octanal (0,56 %), sulfuro de furfuril metilo isómero (4,32 %), limoneno (18,22 %), linalol (12,16 %), α -terpineol (2,17 %), n-decanal (0,64 %), geraniol (1,91 %), decenal (E)-2 (1,10 %), β -(Z)-damascona (1,74 %), β -(E)-damascona (0,95 %), acetato de geranilo (7,05 %), β -(E)-ionona (2,81 %), heptadecano (0,68 %), metil hexadecanoato (2,65 %), n-heneicosano (1,19 %) y n-tricosano (1,15 %) (Markowicz Bastos y col., 2006).

- Vitaminas y Minerales: se ha reportado la presencia de Vitamina E, C, B₁, B₂ (Heck y de Mejía, 2007) y B₆ (Ramallo y col., 1998). Entre los minerales mayoritarios se encuentran: potasio, calcio, magnesio, azufre, hierro, manganeso, aluminio y fósforo. Entre los minerales minoritarios se encuentran: boro, cobre, níquel, zinc, cromo, sodio y cobalto (Heinrichs y Malavolta, 2001).

2.9. Principales actividades biológicas

El uso de la yerba mate como estimulante, antiartrítico, antirreumático, diurético, antimigrañoso, digestivo y hepatoprotector se encuentra ampliamente documentado. Publicaciones modernas destacan sus propiedades antioxidantes, antidiabéticas, hipolipidémicas y su uso como coadyuvante en terapias contra la obesidad y el sobrepeso (González Torres, 1992; Alonso, Bassagoda y Ferreira, 1992; Gupta, 1995; Gorzalczany y col., 2001; Bastos y Torres, 2003).

La acción estimulante sobre el sistema nervioso central, demostrada científicamente se debe a la presencia de metilxantinas (cafeína y teobromina) (González Torres, 1992; Benowitz, y col., 1995). La actividad colerética también fue demostrada por nuestro grupo de investigación de la Cátedra de Farmacognosia, validando su uso tradicional (Gorzalczany y col., 2001).

El efecto protector de la hiperglicemia ejercido por la yerba mate en modelos experimentales de animales, ha sido demostrado por varios autores (Arçari y col., 2011; Pereira y col., 2012; Bremer Boaventura y col., 2013). Extractos de yerba mate administrados en forma crónica (doce semanas) a ratones con diabetes inducida por estreptozotocina, produjeron una disminución significativa de la glucemia (Gorzalczany y col., 2009). Por otro lado, extractos de *I. paraguariensis* mostraron un efecto inhibitorio sobre las reacciones de glicación no enzimática que ocurren como complicación de la diabetes, en concentraciones similares a los agentes antiglicantes utilizados (aminoguanidina y carnosina) en modelos proteicos (Gugliucci y Menini, 2002; Lunceford y Gugliucci, 2005).

Extractos de yerba mate administrados a ratones obesos, sometidos a una dieta con alto contenido de lípidos, mostraron la capacidad de modular la expresión de diversos genes relacionados con la obesidad, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), leptina, interleukina-6, angiotensinógeno, adiponectina y resistina. También se observó una marcada disminución en la ganancia de peso, adiposidad y una restauración de los niveles séricos elevados de colesterol, triglicéridos, LDL-colesterol y glucosa (Arçari y col., 2009). Stein y col. (2005) reportaron la actividad

antihipercolesterolemica de los extractos de *I. paraguariensis* en ratas alimentadas con dietas altas en colesterol. En otro modelo experimental de síndrome metabólico se observó una disminución de la trigliceridemia y un aumento de la diuresis (Gorzalczany y col., 2009). La disminución en la lesión aterosclerótica ejercida por la yerba mate en conejos también fue reportada (Pamplona Mosimann, Wilhelm-Filho y Da Silva, 2006).

El efecto sobre el metabolismo de lípidos también ha sido observado en humanos. Infusiones de yerba mate administradas a individuos hipercolesterolémicos durante 40 días, produjeron una disminución en el LDL-colesterol (13,1 %) y un aumento en el HDL-colesterol (6,2 %). Individuos normolipidémicos sometidos al mismo tratamiento, también presentaron una disminución del LDL-colesterol (8,7 %) y un aumento del HDL-colesterol (4,4 %) (De Moraes col., 2009).

La administración de cápsulas conteniendo una mezcla de hojas de *I. paraguariensis*, semillas de Guaraná (*Paullinia cupana*) y hojas de Damiana (*Turnera difusa* var. aphrodisiaca) produjeron una disminución significativa en el peso corporal y un retraso en el vaciado gástrico, en pacientes con sobrepeso (Andersen y Fogh, 2001).

La actividad cardioprotectora también ha sido reportada en la última década. Extractos de *I. paraguariensis* fueron capaces de atenuar la disfunción miocárdica provocada por isquemia y reperfusión, en corazones aislados de rata (Schinella, Fantinelli y Mosca, 2005). El efecto vasorelajante dependiente de endotelio producido por estos extractos fue reportado por otros autores (Muccillo Baisch, Johnston y Paganini Stein, 1998).

Cabe destacar la actividad antiparkinsoniana ejercida por los extractos de *I. paraguariensis* en ratones (Milioli y col., 2007), la actividad anticarcinogénica en células HepG2 (Ramirez-Mares, Chandra y De Mejía, 2004), la actividad antibacteriana ejercida sobre *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* (Burris y col., 2011; Burris y col., 2012), la actividad antifúngica contra *Malassezia furfur* (Filip, Davicino y Anesini, 2010), la actividad antiviral contra Herpes simple tipo I (Müller y col., 2007) y la actividad inhibidora de la neutrofilo-elastasa humana. La actividad *Antiage* (preventiva del envejecimiento) ha sido mencionada en los últimos años (Xu y otros, 2009).

3. FRUTOS DE *I. paraguariensis* St. Hilaire

La clasificación botánica de los frutos de *I. paraguariensis* varía según el autor considerado y son las siguientes: drupa (Reissek, 1861), nuculanídeo (Hertel, 1954), baya-drupa (Edwin y Reitz, 1967), núcula (Giberti, 1979) y drupoide (Kuniyoshi, 1983). En nuestro trabajo hemos adoptado la clasificación del Dr. Gustavo Giberti, botánico especialista en el género *Ilex* quien describe el fruto en núcula, con 4 o 5 pirenos (propágulos) uniseminados.

La fructificación comienza en Diciembre. Los frutos inmaduros son verdes y al madurar su color cambia a blanco, rojo y finalmente rojo oscuro-negro en el fruto maduro.

La maduración de los frutos puede definirse como una secuencia de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Durante este proceso, se producen alteraciones a tres niveles: físico, metabólico y de la expresión génica. Se producen modificaciones de las rutas metabólicas, desaparición del mRNA y de las proteínas sintetizadas antes de iniciarse la maduración, aparición de nuevos RNAs, degradación de las clorofilas y la síntesis “de novo” de pigmentos, como las antocianinas. Las variaciones cuali-cuantitativas de los metabolitos primarios y secundarios que tienen lugar durante este proceso producen cambios en las propiedades nutricionales y farmacológicas del órgano vegetal.

El interés de nuestro trabajo se centró en el fruto maduro y en estado de maduración. De acuerdo a nuestra minuciosa búsqueda bibliográfica, no existen referencias científicas sobre el estudio nutricional, fitoquímico y/o farmacológico de los frutos maduros de *I. paraguariensis*, como así tampoco sobre los frutos en proceso de maduración.

Existen algunos datos referidos al fruto verde, es decir, en estado de inmadurez fisiológica. Se cita la presencia de triterpenos libres como ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido rotúndico y saponinas derivadas de los mismos (Taketa, Breitmaier y Schenkel, 2004; Peixoto y col., 2012); ácido clorogénico, cafeína y teobromina (Schubert y col., 2007; Borré y col., 2010).

4. RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Los residuos son materiales que se generan durante las actividades de producción y que pueden o no tener valor económico.

En el sector agrícola primario, los residuos se generan en las fases intermedias de los procesos productivos, como resultado de labores agronómicas (podas, recolección de flores, frutos, etc.). En los sectores agrícolas secundarios, el residuo se genera en el proceso de transformación del producto agrícola en producto alimentario, como en el caso de la yerba mate. De especial interés son los materiales susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor agregado de aprovechamiento social y/o de interés económico.

El problema al que se enfrentan los residuos agroindustriales, es la falta de capacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final. Por otro lado, es necesaria una legislación específica para promover la gestión de este tipo de materiales, que asegure un buen manejo desde su generación hasta su disposición final. Con frecuencia, al hablar sobre el tema, se utilizan en forma indistinta los términos: “subproductos”, “desechos” y “residuos” como sinónimos, sin embargo, existe una diferencia conceptual entre ellos.

Un “subproducto” es un producto secundario de origen y características conocidas, generalmente útil, comercializable y por lo tanto con valor agregado, que resulta de un proceso industrial.

El término “desecho” hace referencia a aquellos materiales que no poseen atributos de interés para ser utilizados en algún proceso y por lo tanto, no tienen ningún valor comercial. Son completamente desechados.

Los “residuos” pueden o no tener valor comercial porque son poco comunes, porque se generan en bajas cantidades o porque no se conoce su composición. Sin embargo, pueden resultar de valor si algunos de sus constituyentes, aun en baja proporción, pueden ser utilizados.

Con el fin de buscar una oportunidad de aprovechamiento de los residuos agroindustriales, es necesario caracterizarlos para conocer la composición química cuali-cuantitativa. Este parámetro, junto con el volumen generado, es de suma importancia para definir las tecnologías más apropiadas para su aprovechamiento. El fin del aprovechamiento de un residuo sin valor comercial, es generar un producto utilizable.

Son varios los ejemplos de residuos que se generan en la industria agroalimentaria. Por ejemplo, la industria cervecera utiliza sólo el 8 % del grano de cebada y la del café, sólo el 9,5 %. La industria del aceite de palma utiliza sólo el 9 % de la materia prima y la del papel, menos del 30 %. Todo el material remanente constituye un residuo cuyo aprovechamiento es motivo de estudio (Saval, 2012).

Algunas de las principales tendencias actuales en cuanto al aprovechamiento de residuos agroindustriales, están relacionadas con la producción fermentativa de metabolitos de interés, como las celulasas, las hemicelulasas, las xilanasas y las pectinasas, enzimas inducibles de aplicación en la industria textil, química y de alimentos. Otras temáticas de interés son la generación de biocombustibles, el mejoramiento de suelos mediante *compost* y la elaboración de suplementos alimenticios para animales (Castilho, Medronho y Alves, 2000; Manios, 2004; Kaur y Saxena, 2004; Atabani y col., 2012).

Con respecto a la industria yerbatera, los frutos de *I. paraguariensis* constituyen un residuo que en la actualidad no representa ningún valor comercial. Inevitablemente se encuentran presentes en la cosecha y posterior procesamiento del material vegetal y deben ser separados a fin de que el producto comercial cumpla con las especificaciones del CAA (máximo 0,5 % de semillas y drupas). Por tal motivo, se invierte una gran cantidad de energía para el secado del vegetal y sólo una parte del mismo (hojas y tallos jóvenes) resulta de interés comercial. En la actualidad los frutos son descartados y utilizados simplemente como abono. Datos no oficiales sugieren que la Argentina podría generar cerca de 560 toneladas por año de este residuo y la producción anual global podría exceder las 1700 toneladas por año.

5. PRINCIPALES GRUPOS FITOQUÍMICOS DE INTERÉS EN ESTE TRABAJO

- Triterpenos

Generalidades:

Los triterpenos son compuestos que poseen 30 átomos de carbono y en su esqueleto hidrocarbonado pueden reconocerse seis unidades isopreno. Pueden ser acíclicos o cíclicos. Estos últimos poseen una estructura policíclica normalmente tetra o pentacíclica y casi siempre se encuentran hidroxilados en C₃. Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, particularmente en las resinas, y pueden presentarse como ésteres o glicósidos. Dentro del grupo de los triterpenos pentacíclicos, se destacan el ácido ursólico y su isómero, el ácido oleanólico (**Figura 7**).

El ácido ursólico se encuentra presente en varias especies vegetales comestibles, por ejemplo, la albahaca, las manzanas, las cerezas y en distintas especies pertenecientes al género *Vaccinium* (Pathak y col., 2007).

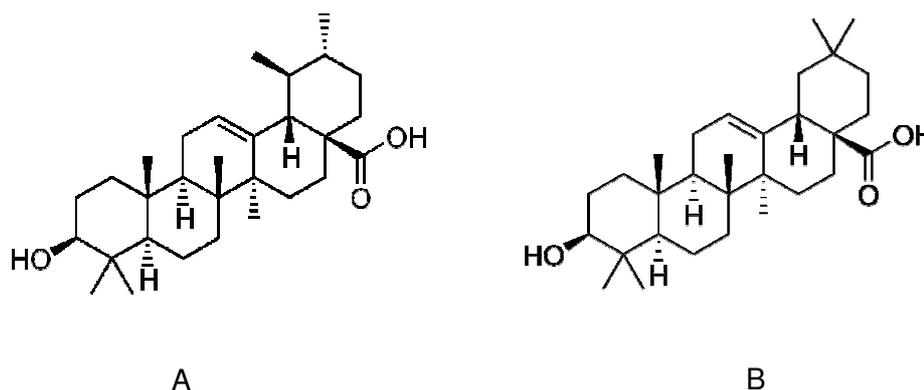


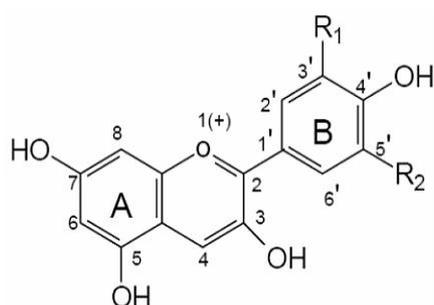
Figura 7: Estructura química del ácido ursólico (A) y ácido oleanólico (B)

- Antocianinas

Generalidades:

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles. Se acumulan en las vacuolas de las células vegetales y son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul (Wagner, 1982) razón por la cual son detectables por el ojo humano (Strack y Wray, 1994).

Pertencen a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 carbonos. Las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (**Figura 8**).



| | |
|---------------|---------------------|
| Pelargonidina | $R_1=R_2=H$ |
| Cianidina | $R_1=OH, R_2=H$ |
| Peonidina | $R_1=OCH_3, R_2=H$ |
| Delfinidina | $R_1=R_2=OH$ |
| Petunidina | $R_1=OCH_3, R_2=OH$ |
| Malvidina | $R_1=R_2=OCH_3$ |

Figura 8: Estructura y sustituyentes de las antocianidinas. Adaptado de Durst y Wrolstad (2001).

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3' y/o 5' con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad.

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas (**Figura 9**). La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas, a valores de pH inferiores a dos, prácticamente el 100 % del pigmento se encuentra en su forma más estable, el ión oxonio o catión flavilio (AH^+), de color rojo intenso. A valores de pH más altos, ocurre una pérdida del protón y la adición de agua en la

posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemiacetal (B) y la forma chalcona (C) de cadena abierta. Tanto el hemiacetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7, se presentan las formas quinoidales (A) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Hutchings, 1999).

Las antocianinas pueden encontrarse como estructuras monoméricas o poliméricas. Las antocianinas monoméricas son sensibles a los cambios de pH, variando de color reversiblemente, a diferencia de los compuestos poliméricos (He col., 2012). El espectro de absorción UV-Visible (250-700 nm) de las antocianinas monoméricas muestra un máximo de absorción a 520 nm, a pH 1, banda ausente a pH 4,5. Esta propiedad es utilizada con fines cuali-cuantitativos (Lee, Durst y Wrolstad, 2005).

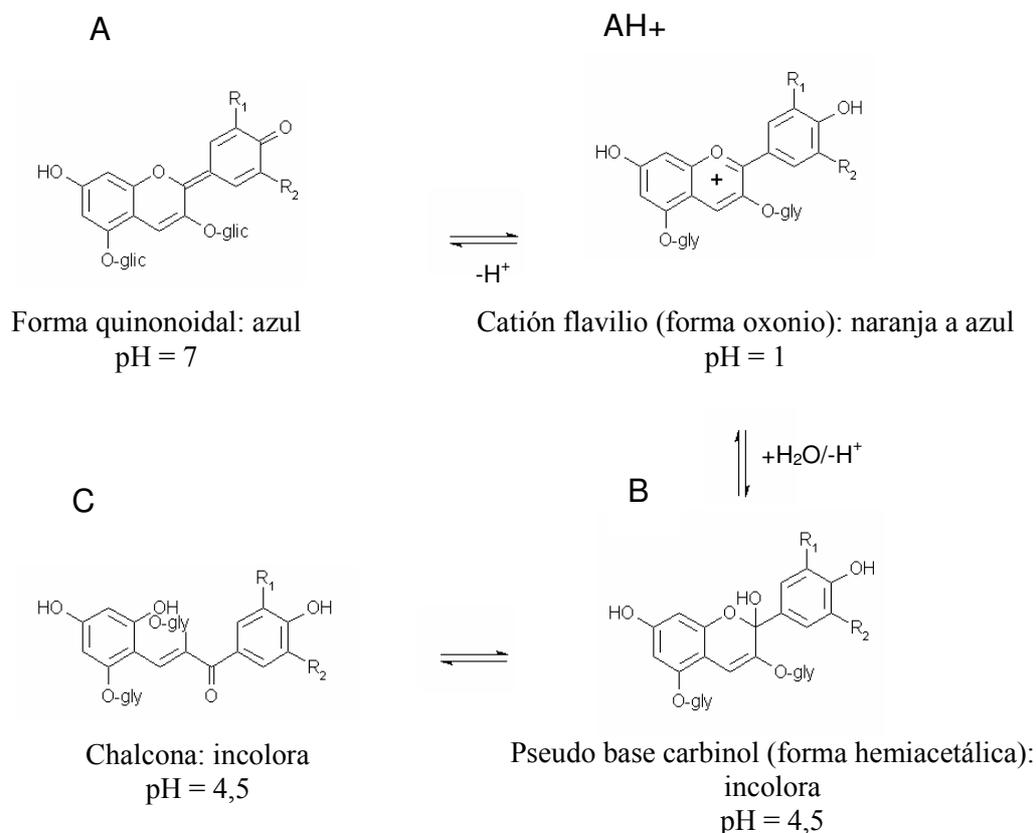
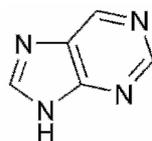


Figura 9: Estructuras químicas predominantes de las antocianinas a diferentes pH. Adaptado de Coultate (1984).

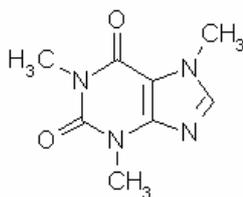
- Metilxantinas

Generalidades:

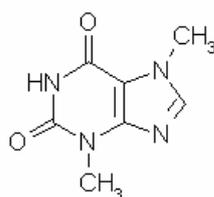
Las metilxantinas pertenecen al grupo de compuestos conocidos como “bases xánticas”, que son alcaloides derivados de la purina (**Figura 10**). Algunos de los derivados de la purina son, por ejemplo, la adenina y la guanina, las cuales forman parte de los ácidos nucleicos. Las metilxantinas cafeína, teofilina y teobromina están presentes en diversas plantas como la Nuez de Cola, el Guaraná, el Café, el Té, el Cacao y también la Yerba mate (Paquette, 1999; Tránsito López Luengo, 2003).



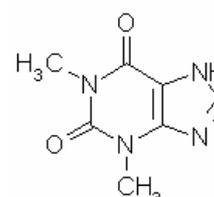
Purina



Cafeína



Teobromina



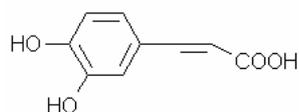
Teofilina

Figura 10: Estructuras químicas de la purina y sus derivados: cafeína, teobromina y teofilina

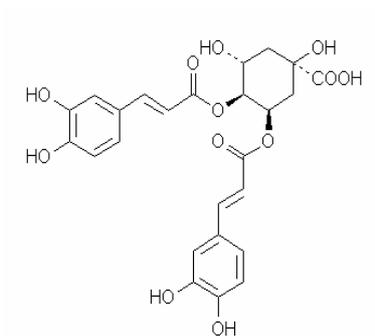
- Ácidos cafeilquínicos

Generalidades:

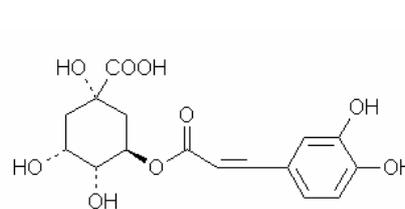
El ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico) está ampliamente distribuido en el reino vegetal y puede encontrarse unido a ácidos carboxílicos derivados del ciclohexano, por ejemplo, al ácido quínico, formando los llamados ácidos cafeilquínicos. De acuerdo con el número de grupos cafeilos que esterifiquen al ácido quínico, se obtendrán los ácidos monocafeilquínicos, dicafeilquínicos o tricafeilquínicos. Las estructuras químicas de los compuestos analizados en este trabajo: ácido cafeico, ácido clorogénico (3-cafeilquínico), y ácidos dicafeilquínicos: ácido 3,4-dicafeilquínico, ácido 3,5-dicafeilquínico y ácido 4,5-dicafeilquínico se muestran en la **Figura 11**.



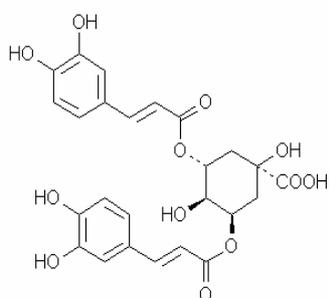
Ácido cafeico



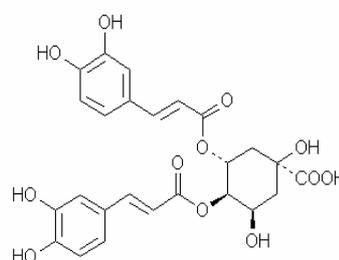
Ácido 3,4-dicafeilquínico



Ácido clorogénico



Ácido 3,5-dicafeilquínico



Ácido 4,5-dicafeilquínico

Figura 11: Estructuras químicas del ácido cafeico, ácido clorogénico y ácidos 3,4; 3,5 y 4,5-dicafeilquínicos

6. DAÑO OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

6.1. Especies reactivas del oxígeno

El término “especies reactivas del oxígeno” (ERO) define a una serie de entidades químicas que son capaces de oxidar a moléculas de relevancia biológica, provocando en las mismas modificaciones o inclusive la pérdida total de su actividad. Cuando el nitrógeno participa en la formación de especies químicas oxidantes, estas pueden denominarse “especies reactivas del nitrógeno” (ERN).

Ejemplos de ERO y ERN son moléculas en estado excitado como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), radicales libres como el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) o moléculas con uniones químicas inestables como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lipoperóxidos (ROO) y anión peroxinitrito (ONOO^-).

Existen fuentes endógenas y exógenas de ERO. En células con metabolismo aerobio, la principal fuente de ERO es la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias. Normalmente los electrones son transferidos a lo largo de la cadena de transporte de electrones para la reducción del oxígeno a H_2O , sin embargo, aproximadamente un 1 a 3 % de los electrones escapan del sistema para producir anión superóxido (Birben y col., 2012). Un gran número de enzimas como la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintetasa y el sistema del citocromo P 450 y organelas como las mitocondrias y los peroxisomas, producen ERO como un subproducto metabólico. También existen enzimas cuya función principal es la producción de ERO, estas son las nicotina adenina dinucleótido fosfato oxidasas (NADPH oxidasas o NOX). Las enzimas NOX son proteínas unidas a las membranas cuya función es la transferencia de electrones a través de estas, donde el oxígeno es el final receptor para convertirse en anión superóxido. Estas se pueden encontrar en leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos, los cuales generan una gran cantidad de anión superóxido una vez producida la fagocitosis, para lograr una acción bactericida.

También existen fuentes exógenas de radicales libres como son: el humo del cigarrillo, la exposición al ozono, la hiperoxia (condición a la que están expuestos los

buzos y que puede llegar a tener consecuencias fatales), las radiaciones ionizantes y la exposición a metales pesados como el hierro, cobre, cadmio, mercurio, níquel, plomo y arsénico, presentes en aire y agua contaminados, suelo o alimentos (Birben y col., 2012). Debido a su alta reactividad, las ERO experimentan transiciones de una especie a otra, tal como se muestra en la **Figura 12**. Típicamente, la reacción se inicia con la transferencia de un electrón al oxígeno para formar el anión superóxido, el cual luego dismuta a peróxido de hidrógeno en forma espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa. El anión superóxido no es capaz de atravesar las membranas, tiene una vida corta y su efecto es a nivel local, pero la enzima superóxido dismutasa lo convierte en H_2O_2 el cual sí es capaz de atravesar membranas biológicas y tiene mayor vida media. Cuando el anión superóxido reacciona con óxido nítrico, se forma el peroxinitrito. Las enzimas mieloperoxidasas catalizan la reacción que convierte al H_2O_2 en ácido hipocloroso y oxígeno singulete. Finalmente, la reacción conocida como “Fenton” utiliza un catión Fe^{2+} para formar el radical hidroxilo a partir del H_2O_2 (Brieger y col., 2012).

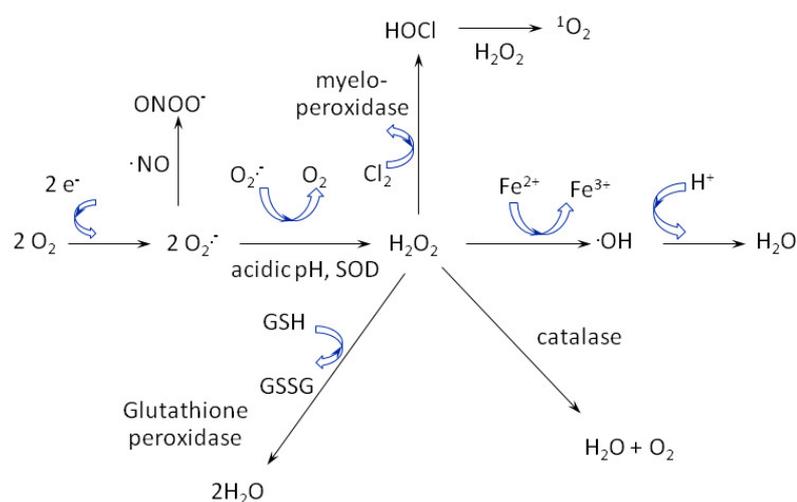


Figura 12: Formación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Fuente: Brieger y col. (2012).

6.2. Sistemas de defensa antioxidante

Los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa antioxidante que usualmente son efectivos en bloquear el efecto negativo de las ERO y ERN. Estos sistemas pueden ser enzimáticos o no enzimáticos, y la actividad antioxidante puede estar dada por los siguientes mecanismos: a) supresión en la formación de ERO/ERN por inhibición de los sistemas enzimáticos que las generan o quelando los metales que intervienen en la formación de radicales libres, b) atrapando las ERO/ERN o c) aumentando el sistema de defensa antioxidante (Khlebnikov y col., 2007; Gutteridge y Halliwell, 2010).

Los principales sistemas enzimáticos antioxidantes con que cuenta el organismo, son las enzimas superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas.

Como la principal ERO producida por una variedad de fuentes es el anión superóxido, la enzima superóxido dismutasa es de suma importancia para las células. Existen 3 tipos de superóxido dismutasas que varían en su localización. La Cu/Zn-SOD se ubica en el citosol y peroxisomas. (Keller y col., 1991; Crapo y col., 1992). La Mn-SOD se localiza en la matriz mitocondrial (Weisiger y Fridovich, 1973) y la EC-SOD (extra celular) se ubica en la matriz extracelular, especialmente en áreas con alta concentración de fibras de colágeno tipo 1 (Petersen y col., 2004).

El peróxido de hidrógeno producido por acción de las superóxido dismutasas o por acción de otras oxidasas es reducido a agua por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Ghademarzi y Moosavi-Movahedi, 1997; Jurkovič, Osredkar y Marc, 2008). Se han descrito 4 tipos de GSH-Px. La GSH-Px 1 (celular) es ubicua y reduce tanto al H₂O₂ como a peróxidos lipídicos, aunque no reduce peróxidos lipídicos esterificados. Estos últimos son reducidos por la enzima GSH-Px 4 que se localiza tanto en el citosol como unida a las membranas. La GSH-Px 2 se localiza en el citosol de las células epiteliales gastrointestinales, donde reduce peróxidos incorporados a través de la dieta. La GSH-Px 3 (extracelular) es el único miembro de la familia que se ubica en el compartimiento extracelular y se cree que es uno de los antioxidantes más importantes

con que cuentan los mamíferos (Chu, Doroshov y Esworthy, 1993; Arthur, 2000; Imai y Nakagawa, 2003).

Los antioxidantes no enzimáticos son, en su mayoría, incorporados a través de la dieta. Comprenden compuestos de bajo peso molecular como las vitaminas C y E, β -caroteno, ácido úrico, glutatión y polifenoles (Birben y col., 2012; Brieger y col., 2012). Las estructuras de los antioxidantes mencionados se muestran en la **Figura 13**.

La vitamina C (ácido ascórbico) es una vitamina soluble en agua que tiene actividad antioxidante tanto a nivel intra como extracelular atrapando radicales libres. También reconstituye a la vitamina E que ha reaccionado con radicales libres (Padayatty y col., 2003).

La vitamina E (α -tocoferol) es una vitamina liposoluble que se concentra en el interior hidrofóbico de las membranas plasmáticas y es la principal defensa contra las agresiones a la membrana. Actúa donando electrones a los radicales que se producen durante la peroxidación lipídica (Brigelius-Flohé y Traber, 1999). También interviene en la apoptosis de células cancerígenas (Sylvester, 2007).

El glutatión es un tripéptido (L- γ -glutamil L -cisteinil L -glicina) que contiene un grupo tiol. Es muy abundante en todos los compartimientos celulares y es el principal antioxidante soluble. La tasa glutatión reducido versus glutatión oxidado (GSH/GSSG) es un indicador muy importante de estrés oxidativo. Interviene en la detoxificación del H_2O_2 y de los lipoperóxidos a través de la GSH-Px. El GSH dona su electrón al H_2O_2 para reducirlo a H_2O y O_2 , y el GSSG vuelve a convertirse en GSH por la acción de las enzimas GSH-reductasas, que utilizan NADPH como dador de electrones. El GSH es cofactor de diversas enzimas detoxificantes como la GSH-Px y GSH-S-transferasa e interviene en la reconstitución de las vitaminas C y E a sus formas activas (Masella y col., 2005; Corti y col., 2008; Birben y col., 2012).

Los carotenoides son pigmentos presentes en las plantas. Se descubrió que el β -caroteno es capaz de reaccionar con los radicales peroxilo, hidroxilo y superóxido. Ejercen su efecto antioxidante a bajas presiones parciales de oxígeno pero pueden tener un efecto prooxidante a mayores concentraciones del mismo (Birben y col., 2012).

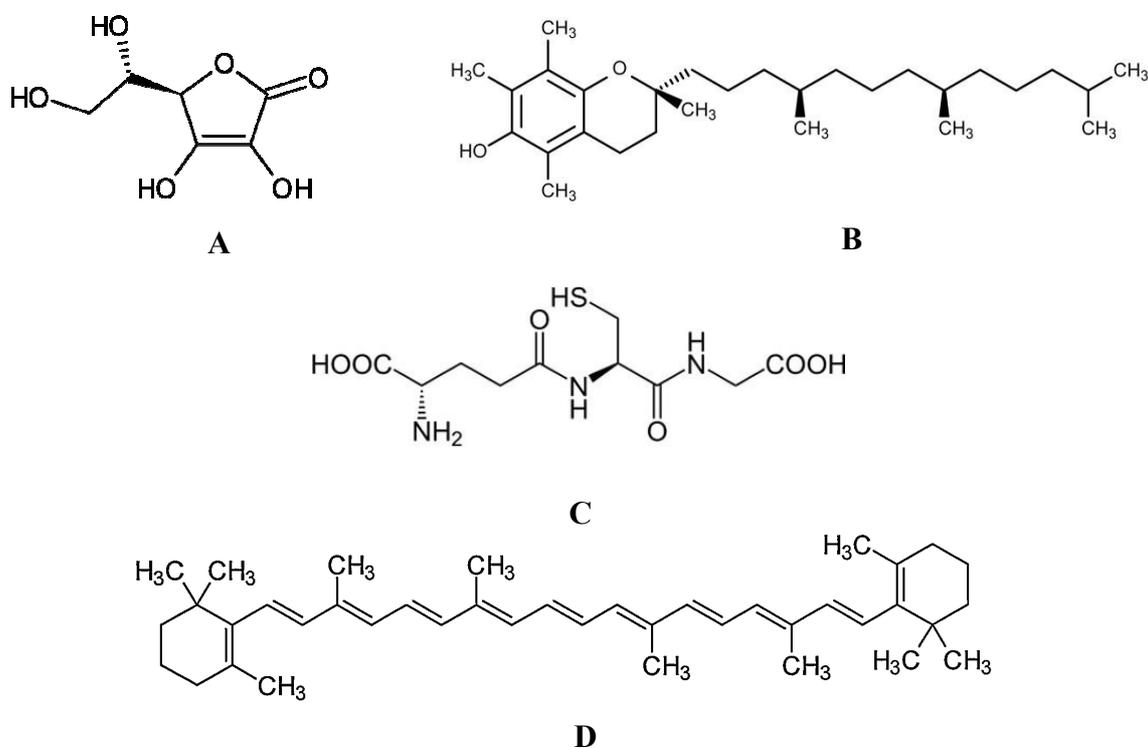


Figura 13: Estructura química de algunos antioxidantes no enzimáticos: Vitamina C (A), Vitamina E (B), Glutación (C) y β -Caroteno (D).

6.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo puede definirse como un aumento en la concentración de ERO, resultado de un desbalance entre la producción y destrucción de los mismos. Puede ser consecuencia de un aumento en la generación de ERO y/o una disminución en las defensas antioxidantes del organismo.

La producción de ERO se encuentra aumentada en muchas patologías y también se ha demostrado que su producción aumenta con la edad a la vez que muchos de los mecanismos de defensa antioxidante disminuyen, y que estos cambios son más significativos en células no proliferativas como las neuronas y los cardiomiocitos (Betteridge, 2000; Poljsak, Šuput, y Milisav, 2013; Poljsak, Šuput, y Milisav, 2013).

Debido a su alta reactividad, las ERO reaccionan rápidamente con todos los tipos de moléculas biológicas y pueden causar daño a muchos componentes celulares y extracelulares como el ADN, proteínas y lípidos.

Las ERO pueden llevar a modificaciones del ADN de diversas formas como por ejemplo la degradación de bases, rupturas de cadenas simples o dobles, modificaciones en la unión de bases o azúcares, mutaciones, traslocaciones y entrecruzamiento (crosslinking) con proteínas. La mayoría de estas alteraciones son altamente relevantes en la carcinogénesis, envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y autoinmunes (Birben y col., 2012). Una de las alteraciones predominantes, resultado del daño oxidativo al ADN, es la formación de 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OH-dG), razón por la cual ha sido ampliamente utilizada como marcador de estrés oxidativo (Valavanidis, Vlachogianni y Fiotakis, 2009). Numerosos estudios consideran que la 8-OH-dG excretada en la orina podría considerarse un factor de riesgo para cáncer, aterosclerosis y diabetes (Kasai, 1997; Cooke y col., 2000; Wua y col., 2004). Las ERO también pueden inducir la expresión de diversos genes involucrados en la transducción de señales. La alteración en la relación normal entre GSH/GSSG provoca la activación de factores de transcripción involucrados en la respuesta inflamatoria como el factor nuclear κ B (NF- κ B), proteína de activación 1 (AP-1), factor nuclear de células T activadas y el factor 1 inducible por hipoxia. La activación de NF- κ B da como resultado la activación de diversos genes relacionados con la defensa antioxidante. La NF- κ B también regula la expresión de genes que participan en la respuesta inmune, la angiogénesis, y la proliferación y diferenciación de células (Birben y col., 2012).

Debido a que las ERO pueden inducir la peroxidación lipídica, son capaces de producir alteraciones en la bicapa lipídica de la membrana celular que llevan a la modificación de su fluidez y a la alteración de sus funciones fisiológicas (de la Haba y col., 2013). Productos de la peroxidación lipídica tales como el malondialdehído y los aldehídos insaturados son capaces de inactivar muchas proteínas celulares por formación de uniones entrecruzadas (cross linkages).

En las proteínas, pueden producir fragmentaciones en las cadenas peptídicas, alteraciones en las cargas eléctricas, entrecruzamiento y oxidación de aminoácidos específicos, que pueden llevar a un aumento en la susceptibilidad a la proteólisis y degradación por enzimas específicas. La oxidación de proteínas también puede llevar a la formación de agregados proteicos insolubles que son la base molecular de varias enfermedades, particularmente las patologías neurodegenerativas.

6.4. Papel de las especies reactivas del oxígeno en la salud

A concentraciones bajas y reguladas, las ERO están involucradas en muchos procesos fisiológicos vitales.

Los macrófagos y neutrófilos, intervienen en la respuesta inmune mediante la generación de ERO para producir la muerte microbiana a través de la fagocitosis.

Las enzimas NOX participan en la diferenciación celular, crecimiento, proliferación, regulación del citoesqueleto, migración y contracción.

Las ERO también están involucradas en procesos biosintéticos, como por ejemplo, la iodación de las hormonas tiroideas por acción de la tiroperoxidasa para la cual el H_2O_2 actúa como cofactor. También se ha reportado su participación en procesos como la inflamación, la regulación del tono vascular, la regulación de la fisiología del músculo esquelético y la función cognitiva (Liu y col, 2003; Alfadda y Sallam, 2012; Brieger y col., 2012).

6.5. Papel de las especies reactivas del oxígeno en la enfermedad

Cuando se produce un desbalance entre la producción de ERO y los sistemas de defensa antioxidante, las ERO intervienen en un amplio rango de patologías como el cáncer (Waris y Ahsan, 2006), los desórdenes neurológicos (Sayre, Smith y Perry, 2001), la aterosclerosis (Warnholtz y col., 1999), la hipertensión (Kerr y col., 1999), la isquemia (Ferrari y col, 2004), la diabetes (Maritim, Sanders y Watkins, 2003), el síndrome de distrés respiratorio agudo (Quinlan, Evans y Gutteridge, 1994), la fibrosis

pulmonar idiopática (Rahman y col., 1999), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Bowler, Barnes y Crapo, 2004), el asma (Comhair y col., 2005) y la enfermedad periodontal (Sharma y Sharma, 2011), entre otras.

6.6. Uso de antioxidantes exógenos

Cuando ocurre un desbalance en la regulación de la concentración de ERO, es importante la incorporación de antioxidantes a través de la dieta, de manera de contribuir a mejorar las defensas antioxidantes del organismo.

Antioxidantes como las vitaminas C y E, los carotenoides y los polifenoles son hoy en día considerados los principales agentes antioxidantes exógenos (Poljsak, Šuput y Milisav, 2013).

Una mayor ingesta de frutas y vegetales está asociada con un menor daño celular *in vitro* y menor estrés oxidativo. Los estudios clínicos demuestran que una dieta rica en frutas, vegetales, granos, legumbres y ácidos grasos omega-3 sería de suma importancia en la prevención de diversas enfermedades tales como las enfermedades coronarias, accidentes cerebrovasculares y enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2 (Willett, 2006). Publicaciones reportan que el riesgo de padecer cáncer en personas que consumen dietas altas en frutas y vegetales es 50 % menor que en aquellos que consumen poca cantidad de estos alimentos (Steinmetz y Potter, 1991a y b).

También se ha reportado que la ingesta de antioxidantes incorporados a través de la dieta, resulta de utilidad para disminuir el avance o revertir los procesos involucrados en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Butterfield y col., 2002).

6.7. Actividad antioxidante de la yerba mate

Numerosas publicaciones reportan la actividad antioxidante de la yerba mate, la cual sería de utilidad para el tratamiento o prevención de las patologías asociadas con el estrés oxidativo.

Se ha reportado la capacidad de *I. paraguariensis* y de la yerba mate de inactivar radicales libres. Por ejemplo, extractos de *I. paraguariensis* y de yerba mate demostraron tener actividad antioxidante evidenciada a través de la inactivación del radical libre 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) (Rivelli y col., 2007; Anesini y col., 2012).

La capacidad de inhibir la peroxidación lipídica también ha sido reportada. Extractos de *I. paraguariensis* produjeron una disminución significativa en los productos de la oxidación lipídica evaluada mediante la oxidación de liposomas con cloruro de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH) (Filip y col., 2000). Por otro lado, tanto los extractos de *I. paraguariensis* como los de yerba mate, produjeron una disminución significativa en los niveles de peroxidación lipídica del ácido linoleico (Anesini y col., 2012). Gugliucci y Stahl (1995) reportaron que extractos de *I. paraguariensis* fueron capaces de inhibir la iniciación y la propagación de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida por cobre o por agua oxigenada.

Los extractos de *I. paraguariensis* y de yerba mate también demostraron tener actividad sobre ciertas enzimas antioxidantes. Extractos acuosos de *I. paraguariensis* evitaron la pérdida de la actividad de la enzima paraoxonasa-1 (PON-1), una enzima antioxidante presente en las HDL con efectos cardioprotectores, cuando fue expuesta a estrés oxidativo generado por cloruro de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH) (Menini y col., 2007). Por otro lado, extractos de *I. paraguariensis* y de yerba mate produjeron un incremento significativo tanto en los niveles de peroxidasa secretada como en la actividad enzimática total, en un modelo de glándulas submandibulares de rata (Filip y col., 2007).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar científicamente los frutos de *I. paraguariensis* investigando la composición química, los compuestos bioactivos y las actividades farmacológicas relacionadas con la presencia de dichos compuestos.

Realizar el desarrollo tecnológico de un producto alimenticio para evaluar la factibilidad de incorporar los frutos a un producto tipo *snack*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos fueron:

- Analizar los principales grupos fitoquímicos presentes y los compuestos bioactivos más importantes dentro de cada grupo.
- Aportar datos sobre las propiedades nutricionales.
- Estudiar las actividades farmacológicas relacionadas con la composición química: a) actividad antioxidante y b) efecto sobre el tránsito intestinal.
- Aportar datos de toxicidad.
- Realizar el desarrollo de un producto alimenticio para evaluar su utilidad en la industria alimentaria.
- Investigar la viabilidad de su uso en el desarrollo de productos alimenticios con propiedades antioxidantes.
- Reportar datos científicos que permitan su potencial utilización en áreas vinculadas a la salud humana.

El trabajo de tesis se divide en tres partes: Parte I, II y III

Parte I: Estudio de la composición química

Se planteó como objetivos:

- a) Investigar los grupos fitoquímicos característicos de esta especie (triterpenos, metilxantinas y compuestos fenólicos) utilizando extractos de diferente polaridad y cuantificar los principios activos mayoritarios presentes en cada grupo.

- b) Estudiar la composición centesimal y los componentes de interés nutricional (minerales, carbohidratos, proteínas, fibra dietaria, lípidos y composición de ácidos grasos) presentes.

Parte II: Estudios farmacológicos y toxicológicos

Se planteó como objetivos:

- a) Estudiar la capacidad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos, estos últimos preparados según la forma de uso popular, utilizando diferentes modelos farmacológicos *in vitro* y un modelo biológico. Dentro de los modelos *in vitro* se emplearon métodos de determinación directos, indirectos y métodos específicos, como la acción sobre radicales libres, la inhibición de la peroxidación lipídica y la actividad símil enzimática, respectivamente. Como modelo biológico se utilizó un modelo de estrés oxidativo empleando glándulas salivales de rata, el cual fue inducido por la administración de estreptozotocina como agente oxidante.
- b) Determinar la acción de los frutos sobre el tránsito intestinal
- c) Evaluar la toxicidad aguda.

Parte III: Desarrollo tecnológico de un producto alimenticio

Se planteó como objetivos:

- a) Elaborar productos extrudidos tipo *snack* utilizando harina de frutos en mezcla con harina de maíz, en distintas condiciones experimentales.

- b) Determinar los parámetros fisicoquímicos indicadores del grado de aceptabilidad del producto por parte de los potenciales consumidores.
- c) Evaluar la capacidad antioxidante de los productos finales obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

En este trabajo de investigación se utilizaron los frutos de *I. paraguariensis* que fueron provistos por la empresa “Las Marías S.A.”, establecimiento ubicado en el Km. 739 de la Ruta 14, Gobernador Virasoro, Provincia de Corrientes, Argentina.

El material vegetal fue identificado por el Dr. Gustavo C. Giberti, botánico especialista en el género *Ilex*. Un espécimen de dicho material se encuentra guardado e identificado en el Herbario de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, N° BACP: BAF 2 (serie 2007/10/13).

El estudio se realizó sobre los frutos maduros cosechados en los meses de abril del año 2007 (Lote 1) y 2013 (Lote 2). Este material vegetal fue utilizado para los estudios de composición química y ensayos farmacológicos.

En diciembre de 2010 fueron cosechados los frutos en proceso de maduración (Lote 3). Este material vegetal se utilizó para la realización del desarrollo tecnológico de un producto alimenticio.

1.1. Procesamiento del material vegetal

El material vegetal correspondiente al Lote 1 y al Lote 3 fue muestreado *a posteriori* de las etapas de sapecado y secado (correspondientes al proceso de industrialización de la yerba mate).

El Lote 2 fue cosechado del material vivo (*in situ*) y analizado inmediatamente.

2. SOLVENTES, REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO Y ESTÁNDARES DE REFERENCIA

2.1. Solventes:

Todos los solventes empleados en este trabajo fueron de grado analítico marca Merck[®], J.T.Baker[®] o Sintorgan[®], excepto los solventes empleados para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que fueron grado HPLC marca J. T. Baker[®].

El agua que se empleó en todos los ensayos fue destilada o ultrapura (18.2 MΩ.cm) obtenida con un equipo Labconco[®] Waterpro PS.

Las fases móviles utilizadas en HPLC fueron filtradas a través de filtros de poliamida Sartorius[®] Stedim por vacío y las soluciones fueron inyectadas a través de filtros de 0,45 μ de tamaño de poro con membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), marca Millipore[®], Millex HV.

2.2. Reactivos y medios de cultivo

Los reactivos y medios de cultivo utilizados y su origen comercial fueron los siguientes:

a) Sigma[®]: éster del ácido 2-aminoetil difenilbórico (AEDBE) (≥ 97 %) para TLC, 2-hidroxi propil-γ-ciclodextrina, trizma base (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (≥ 99,9 %) y ác. linoleico (≥ 99 %), RPMI 1640 AutoModTM para cultivos celulares, estreptomycin (≥ 720) UI/mg (SBS), sal disódica del ácido etilendiamino tetracético (EDTA) dihidrato (99 %), ác. sulfanílico (ACS) (99 %), sal sódica del ác. 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-etansulfónico (HEPES) (≥ 95 %), estreptozotocina (≥ 98 %), Anexina V FITC, kit para detección de apoptosis, L-glutamina 99.0-101.0%, penicilina G (sal sódica), suero fetal bovino estéril filtrado, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT) (≥ 97.5 %), timidina tritiada (pureza radioquímica ≥ 95 %), fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF, por sus siglas en inglés) (≥ 98.5 %), ioduro de propidio (≥ 94.0 %), y alfa amilasa termoestable.

b) Merck[®]: fosfato monoácido de sodio (Na₂HPO₄), fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄), carbonato de sodio (NaCO₃), reactivo Folin – Ciocalteu, cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), bicarbonato de sodio (NaHCO₃), cloruro de magnesio (MgCl₂), cloruro de calcio (CaCl₂), y N-(1- naftil) etilendiamina.

c) Fluka[®]: ác. 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) (≥ 98 %), amiloglucosidasa (TDF 100-A) y adrenalina (EP).

d) Aldrich[®]: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox[®]) (97 %), y ác. 2-tiobarbitúrico.

e) Sigma Aldrich[®]: óxido de mercurio (HgO) (ACS, ≥ 99.0 %), cloruro de azul de nitrotetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés) para biología molecular, 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (≥ 99 %).

f) Anedra[®]: tiocianato de amonio (ACS), hidróxido de sodio (NaOH) (98 %) lentejas, azul de tripán (Direct blue 14) para microscopía.

g) Biopack[®]: persulfato de potasio (K₂S₂O₈) p.a., sulfato de potasio (K₂SO₄) BioXtra p.a. (ACS), tricloruro férrico hexahidratado p.a.

h) Parafarm[®]: peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (30 volúmenes).

i) Cicarelli[®]: ác. tricloroacético p.a. (ACS).

j) Supelco[®]: butilhidroxitolueno grado analítico.

k) Rhom & Hass Co.[®]: 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil polietilenglicol (triton x 100).

l) Francisco H Walz S.C.A.: nitrito de sodio

2.3. Estándares de referencia

Los estándares de referencia utilizados y sus correspondientes orígenes comerciales fueron los siguientes:

a) Sigma[®]: ácido clorogénico (≥ 95 %), ácido cafeico (≥ 98 %), ácido gálico (97,5 – 102,5 %), rutina trihidrato (95 %), quercetina (≥ 95 %), teobromina ($\geq 98,5$ %), teofilina (≥ 99 %), cafeína (*ReagentPlus*[®]), ácido L-ascórbico (vitamina C) (≥ 98 %), peroxidasa de rábano tipo II (150-250 U/mg), peróxido de hidrógeno 30 % (grado ACS), cianidina 3-glucósido (≥ 95 %), cianidina-3,5-di-O-glucósido (≥ 90 %), cloruro de delfinidina (≥ 95 %), y mezclas de metil ésteres de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés) FAME Mix C4-C24 (grado analítico).

b) Fluka[®]: malvidin 3-galactósido (≥ 95 %).

- c) Supelco[®]; NHI-C FAME Mix (grado analítico).
- d) Extrasynthese[®]: cinarina (ác. 1,3-dicafeilquínico) IUPAC ($\geq 99\%$).
- e) Carl Roth[®]: canferol (3,4',5,7-tetrahidroxiflavona) ($\geq 99\%$),
- f) Aldrich[®]: ácido ursólico ($\geq 90\%$), ácido oleanólico ($\geq 97\%$), cloruro de pelargonidina, y ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox[®]) (97%).

3. EQUIPOS E INSTRUMENTAL ANALÍTICO

En este trabajo se utilizaron equipos e instrumental analítico calibrado y certificado. Los mismos se detallan a continuación:

Limpiador y clasificador Bravender[®], Labofix (selección de los frutos).

Molino eléctrico a cuchillas Arthur H. Thomas[®] (molienda Lote 1); molino a rolos estriados Bühler[®] AG y molino CYCLOTEC[®] (molienda Lote 3).

Mezcladora planetaria marca Yelmo[®] (mezcla de harinas).

Extrusor monotornillo marca Brabender[®] 20 DN.

Balanza analítica Mettler[®] AT201 (sensibilidad ± 0.01 mg)

Evaporador rotatorio marca BÜCHI[®], Waterbath B-480

Liofilizador marca Virtis[®], Sentry 8XL (-70 °C y 100 militorr)

Baño con ultrasonido marca Branson[®], 2510

Agitador a vibración Maxi-Mix 1, type 16700 Mixer

Medidor de pH marca Hanna[®], HI 2211.

Espectrofotómetro marca Jasco[®], V-630

Espectrofotómetro marca Beckman[®] Q8 123

Lector de placas de ELISA Microplate Reader Benchmark. Bio-Rad[®]

Cromatografo líquido marca Varian[®] serie 9000 provisto de una bomba modelo 9012, un detector espectrofotométrico UV modelo 9050, un detector con arreglo de fotodiodos modelo 9065 y una válvula de inyección de volumen fijo Rheodyne[®] con un loop de 20 microlitros.

Cromatógrafo gaseoso marca Perkin Elmer[®], Clarus 500 equipado con un detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés) y software TotalChrom[®].

Espectrómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer[®] modelo AA400.

Mezclador Sorvall Omni Mixer, DuPont[®] (homogeneización de tejidos)

Citómetro de flujo FACSCalibur[™], Becton-Dickinson. La determinación de células sanguíneas se realizó en un hemocitómetro Neubauer[®].

4. PARTE I: ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las investigaciones se realizaron utilizando el material vegetal correspondiente al Lote 1, con excepción del análisis de antocianinas, donde se utilizó el Lote 2 (material vegetal fresco).

4.1. Estudio fitoquímico

Se prepararon extractos con solventes de distinta polaridad y se utilizaron distintos métodos de extracción según los grupos fitoquímicos de interés en este trabajo.

4.1.a. Extractos acetónicos

Los extractos acetónicos se prepararon con dos fines: a) investigación de compuestos triterpénicos y b) investigación de antocianinas

4.1.a.1. Preparación de los extractos acetónicos para la determinación compuestos triterpénicos

Se utilizó el método descrito por Claude y col. (2004). Se pesaron exactamente alrededor de 5,0000 g de frutos y se agregaron 15 ml de acetona. Se calentó a Baño María (40 °C) durante 10 minutos y se filtró por papel. Se repitió el procedimiento de extracción dos veces más. Los filtrados fueron reunidos y llevados a sequedad en evaporador rotatorio.

4.1.a.2. Preparación de los extractos acetónicos para la determinación de antocianinas

Se utilizó un método específico para la extracción de antocianinas descrito por Rodríguez-Saona y Wrolstad (2001). Se pesaron exactamente alrededor de 50,0000 g de

frutos frescos, los cuales fueron molidos en un mortero. Seguidamente, se agregaron 50.0 ml de acetona, se agitó durante 5 minutos y se filtró por vacío. El marco fue extraído con 50.0 ml de una mezcla de acetona: HCl 0.01 % (70:30), 2 veces. Los filtrados fueron reunidos y colocados en una ampolla de decantación. A continuación, se agregaron 2 volúmenes (100 ml) de cloroformo. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 2500 rpm. La fase acuosa fue separada y concentrada en evaporador rotatorio a presión reducida, a una temperatura inferior a 40 °C durante 10 minutos. El extracto concentrado fue trasvasado cuantitativamente a un matraz aforado y llevado a volumen de 50,0 ml con HCl 0,01 %. Este procedimiento de extracción también fue aplicado al Lote 1, con fines comparativos.

4.1.a.3. Análisis de los extractos

4.1.a.3.1. Análisis de triterpenos

Se utilizó la cromatografía sobre planos (TLC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

- TLC:

Solución Muestra: el extracto acetónico obtenido según se indica en el punto 4.1.a.1. se solubilizó en acetona, se trasvasó a un matraz aforado de 10,0 ml y se llevó a volumen con el mismo solvente.

Sistema cromatográfico:

Fase estacionaria (FE): silicagel 60 F₂₅₄.

Fase móvil (FM): tolueno: acetato de etilo (7:3)

Solución de referencia: ácido ursólico al 0,1 % en metanol

Siembra: solución Muestra y solución de referencia (40 µl en banda de 0,5 cm)

Revelador: ácido sulfúrico al 5 % en metanol y posterior calentamiento en estufa a 100 °C durante 20 minutos.

- HPLC:

Se utilizó el método descrito por Claude y col. (2004), quienes emplearon un compuesto derivado de la ciclodextrina como modificador químico de la fase móvil.

Solución Muestra: el extracto acetónico obtenido según el punto 4.1.a.1. se solubilizó en una mezcla de metanol: acetona (50:50) y se trasvasó cuantitativamente a un matraz aforado de 10,0 ml. Se llevó a volumen con el mismo solvente. Se tomaron 0,4 ml de esta solución y se homogeneizaron con 0,6 ml de fase móvil carente de ciclodextrina.

Soluciones de referencia: se pesaron exactamente alrededor de 1,00 mg de ácido ursólico y 1,00 mg ácido oleanólico y se colocaron en viales por separado. Se añadieron 2,0 ml de metanol utilizando una pipeta de doble aforo. A continuación, se tomaron 0,2 ml de esta solución y se mezclaron con 0,8 ml de fase móvil sin ciclodextrina hasta obtener una solución homogénea.

Condiciones cromatográficas: como fase estacionaria se utilizó una columna C18, de 150 mm de largo por 4,60 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula, Agilent[®], Eclipse XDB.

Para la preparación de la fase móvil se utilizaron 3 componentes: acetonitrilo (A), *buffer* fosfato 0.02 molar pH 3,5 (B) y 2-hidroxi propil- γ -ciclodextrina (C). La fase móvil utilizada fue: A: B (50:50) + C (7,5 mM disuelta en el *buffer*). Flujo: 1,2 ml/min. λ de detección: 203 nm.

Las soluciones se inyectaron por triplicado y se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2 %.

4.1.a.3.2. Análisis de antocianinas

- Caracterización:

El extracto acetónico en medio ácido obtenido según 4.1.a.2., presentó una coloración roja. Se alcalinizó el medio (pH 4,5) con acetato de sodio 0,4 M y se observó

ausencia de color, lo que permitió caracterizar a las antocianinas (Lee, Durst y Wrolstad, 2005). Este procedimiento también se realizó sobre los frutos procesados (Lote 1) y la reacción fue negativa.

- Espectrofotometría UV-Visible: Análisis cuali-cuantitativo

La identificación y cuantificación de las antocianinas se realizó mediante el método de pH diferencial descrito por Lee, Durst y Wrolstad (2005).

Solución madre: 4,0 ml del extracto acetónico obtenido según se indica en el punto 4.1.a.2. fueron trasvasados cuantitativamente a un matraz aforado y llevados a un volumen de 50,0 ml con agua.

Soluciones *buffer*: la solución *buffer* a pH 1 se preparó con KCl 0,025M. La solución *buffer* a pH 4,5 se preparó con acetato de sodio 0,4 M. En ambos casos se ajustó el pH con HCl.

Soluciones Muestra: se tomaron 200 μ l de la solución madre y se mezclaron con 800 μ l de cada una de las soluciones *buffer*, se obtuvieron las Soluciones Muestra: 1 (pH 1) y 2 (pH 4,5).

Análisis cualitativo (Identificación): se determinó el espectro de absorción (250-700 nm) de las Soluciones Muestra 1 y 2.

Análisis cuantitativo: se midió la Absorbancia de las Soluciones Muestra 1 y 2 a 520 nm y 700 nm dentro del período comprendido entre los 20 y 50 minutos posteriores a la preparación de las mismas.

La concentración de antocianinas, expresada como cianidina 3-glucósido se calculó según la siguiente fórmula:

$$\frac{A \times PM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

Donde:

$A = \text{Absorbancia Muestra (A}_{520\text{nm}} - \text{A}_{700\text{nm}}) \text{ pH } 1 - \text{Absorbancia Muestra (A}_{520\text{nm}} - \text{A}_{700\text{nm}}) \text{ pH } 4,5$

PM = Peso molecular de cianidina-3-glucósido: 449,2 g/mol

FD = Factor de dilución

l = Paso de la celda en cm

$\epsilon = \text{Coeficiente de Extinción Molar del cianidina-3-glucósido en } \text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

$10^3 = \text{Factor de conversión de g a mg}$

- HPLC: Análisis cualitativo

El análisis por HPLC se realizó de acuerdo con el método descrito por Berente y col. (2000).

Solución Muestra: extracto acetónico obtenido según el punto 4.1.a.2.

Soluciones de referencia: se prepararon soluciones de concentración exactamente conocidas, cercanas a 1 mg/ml, con los siguientes estándares de referencia: cianidina 3-glucósido, cianidina 3,5-di-O-glucósido, malvidina 3-galactósido, cloruro de pelargonidina y cloruro de delphinidina en metanol. Las mismas fueron convenientemente diluidas para obtener soluciones de concentración 0,04 mg/ml.

Condiciones cromatográficas: como fase estacionaria se utilizó una columna C18, de 250 mm de largo por 4,60 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula, Phenomenex[®], Luna (2).

Para la composición de la fase móvil se preparó una solución *buffer* fosfato utilizando KH_2PO_4 10 mM y H_3PO_4 (pH 1,6).

La fase móvil consistió en una mezcla de Solvente A: acetonitrilo: *buffer* fosfato (5:95) y Solvente B: acetonitrilo: *buffer* fosfato (50:50). Gradiente: 10 % de B a 45 % de B en 30 minutos, de 45 % de B a 100 % de B en un minuto y 100 % de B durante 10 minutos. Flujo: 1 ml/min. Temperatura de trabajo: 50 °C. λ de detección: 518 nm.

Las soluciones se inyectaron por triplicado y se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2 %.

4.1.b. Extractos metanólicos

4.1.b.1. Preparación de los extractos para la determinación de metilxantinas y polifenoles

El método de extracción estuvo dirigido a la obtención de extractos metanólicos enteros. Para ello, se pesaron exactamente alrededor de 500,00 mg de frutos, a los que se agregaron 50 ml de metanol y se calentó a reflujo durante 30 minutos. Se filtró por papel y se repitió el proceso de extracción sobre el marco. Los filtrados fueron reunidos y llevados a sequedad a presión reducida en evaporador rotatorio.

4.1.b.2. Análisis de los extractos

4.1.b.2.1. Análisis de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina)

Se tomó como referencia el método descrito por Filip y col. (1998).

Solución Muestra: se preparó un disolvente compuesto por una mezcla de agua: ácido acético (98:2) (Solvente A). El extracto metanólico obtenido según se indica en el punto 4.1.b.1. se solubilizó en una mezcla de Solvente A: metanol (80:20) con ayuda de ultrasonido. Se llevó a un volumen de 25,0 ml en matraz aforado con el mismo solvente.

Soluciones de referencia: con los estándares de cafeína y teobromina, se prepararon soluciones de concentraciones exactamente conocidas, cercanas a 0,3 mg/ml, utilizando como disolvente la mezcla: Solvente A: metanol (80:20). Las mismas fueron diluidas convenientemente con el mismo solvente para obtener concentraciones aproximadas de 0,03 mg/ml.

Condiciones cromatográficas: como fase estacionaria se utilizó una columna C18, de 250 mm de largo por 4,60 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula, Phenomenex[®], Luna (2).

La fase móvil consistió en una mezcla de Solvente A y Solvente B: metanol. Gradiente: 17 % B a 20 % B en 10 minutos, 20 % B durante 5 minutos, 20 % B a 23 %

B en 10 minutos, y 23 % B a 100 % B en 5 minutos. Flujo: 1 ml/min. λ de detección: 273 nm.

Las soluciones se inyectaron por triplicado y se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2 %.

4.1.b.2.2. Análisis de polifenoles

- HPLC

Se realizó el análisis de polifenoles (ácidos cafeilquínicos y flavonoides) de acuerdo con el método descrito por Filip y col. (2001).

Solución Muestra: el extracto metanólico obtenido según se indica en el punto 4.1.b.1. se solubilizó en 25,0 ml de metanol. Se realizó una dilución al medio con Solvente A.

Soluciones de referencia: se prepararon “Soluciones Madre” (SM) de concentraciones exactamente conocidas, en metanol, de los siguientes estándares de referencia (concentración aproximada): ácido clorogénico, ácido cafeico y cinarina (0,015 mg/ml); rutina, quercetina y canferol (0,02 mg/ml). Para el análisis por HPLC las mismas fueron diluidas al medio con Solvente A.

Condiciones cromatográficas: se utilizó una columna C18, de 250 mm de largo por 4,60 mm de diámetro interno y 5 μ m de tamaño de partícula, Phenomenex[®], Luna (2).

La fase móvil consistió en una mezcla de Solvente A y Solvente B. Gradiente: 15 % B a 40 % B en 30 minutos, 40 % B a 75 % B en 10 minutos, 75 % B a 85 % B en 5 minutos, y 85 % B a 100 % B en 5 minutos. Flujo: 1,2 ml/min. λ de detección: 325 nm (ácidos cafeilquínicos), 255 nm (rutina y quercetina) y 263 nm (canferol).

En todos los análisis, las soluciones se inyectaron por triplicado y se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2 %.

- Espectrofotometría UV-Visible

Se realizó la determinación de polifenoles totales según lo especificado en la Norma ISO 14502-1 (2005).

El material de vidrio utilizado fue lavado con HNO₃ 15 % V/V, enjuagado con agua destilada y secado en estufa, previo a su uso.

Solución Muestra: el extracto metanólico obtenido según se indica en el punto 4.1.b.1. se solubilizó en agua de manera de obtener una solución de concentración: 1000 µg/ml.

Estándar de referencia: ácido gálico

Curva de calibración: se prepararon soluciones de concentraciones crecientes de ácido gálico en agua, abarcando el rango de 10 - 50 µg/ml.

Procedimiento: 1,0 ml de Solución Muestra o de cada solución del Estándar, se trasvasaron cuantitativamente a un tubo de ensayo. Se añadieron 5,0 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluído 1/10 y se homogeneizó la solución con ayuda de un agitador a vibración. Transcurrido un tiempo (3-8 min) se añadieron 4,0 ml de una solución de Na₂CO₃ al 7,5 %. Se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Se midió la Absorbancia a 765 nm, utilizando como blanco, agua.

El ensayo fue considerado válido ya que la Absorbancia del blanco fue inferior a 0,010.

4.1.c. Extractos acuosos

Los extractos acuosos se prepararon con tres fines: a) investigación de saponinas b) investigación de metilxantinas y c) investigación de polifenoles, reproduciendo las formas de uso popular.

4.1.c.1. Preparación de los extractos para la determinación de saponinas

Se pesaron exactamente alrededor de 15,000 g de frutos, a los que se agregaron 100 ml de agua destilada. Se calentó a ebullición durante 10 minutos y se filtró por papel. El extracto obtenido fue trasvasado cuantitativamente a un matraz aforado de

100,0 ml y se llevó a volumen con el mismo solvente (Gnoatto, Schenkel y Bassani, 2005).

4.1.c.2. Preparación de los extractos para la determinación de metilxantinas y polifenoles

Se prepararon infusiones al 5 % (F. A. VII Ed.) de los frutos. Los extractos fueron reunidos y posteriormente liofilizados.

4.1.c.3. Análisis de los extractos

4.1.c.3.1. Análisis de saponinas

La determinación de saponinas totales se realizó según el método descrito por Gnoatto, Schenkel y Basani (2005).

Solución Muestra: el extracto acuoso obtenido según el punto 4.1.c.1. se sometió a una hidrólisis ácida con 15 ml de ácido clorhídrico concentrado, calentando a a reflujo durante 2 horas. Se dejó enfriar y la solución se trasvasó cuantitativamente a una ampolla de decantación. Se añadieron 50 ml de cloroformo, se mezcló por inversión y se separaron las fases. Este procedimiento fue repetido dos veces más hasta agotamiento del extracto acuoso. Las fracciones clorofórmicas fueron reunidas en un balón y llevadas a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo obtenido fue solubilizado en 3 ml de cloroformo a los cuales se añadieron 50 ml de metanol. Esta solución fue trasvasada cuantitativamente a un matraz aforado de 100,0 ml y se llevó a volumen con metanol. A continuación se realizó una dilución 1/10 con acetonitrilo. Se obtuvo el extracto acuoso hidrolizado.

Solución de referencia: se pesó exactamente alrededor de 1,00 mg de ácido ursólico y se solubilizó en 10,0 ml de metanol. Para el análisis, se tomaron 2,0 ml de esta solución, los cuales fueron trasvasados cuantitativamente a un matraz aforado de 5,0 ml y se llevó a volumen con acetonitrilo.

Condiciones cromatográficas: se utilizó una columna C18, de 150 mm de largo por 4,60 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula, Phenomenex[®], Luna (2).

La fase móvil utilizada consistió en una mezcla de acetonitrilo: agua (70:30). Flujo: 1,0 ml/min. λ de detección: 203 nm.

Las soluciones se inyectaron por triplicado y se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2 % entre inyecciones.

4.1.c.3.2. Análisis de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina)

El análisis de metilxantinas se realizó de acuerdo con lo descrito en el punto 4.1.b.2.1.

Solución Muestra: se pesaron exactamente alrededor de 100,0 mg del extracto obtenido según el punto 4.1.c.2. y se trasvasaron cuantitativamente un matraz aforado de 25,0 ml, se agregaron 2 ml de agua y se llevó a volumen con metanol. Se tomaron 2,0 ml de esta solución y se llevaron a un volumen de 10,0 ml en matraz aforado con Solvente A.

4.1.c.3.3. Análisis de polifenoles

- HPLC

El análisis de polifenoles por HPLC según se detalla en el punto 4.1.b.2.2.

El extracto obtenido según el punto 4.1.c.2. se solubilizó en metanol con ayuda de ultrasonido y se trasvasó cuantitativamente a un matraz aforado de 25,0 ml. Se llevó a volumen con el mismo solvente. 5,0 ml de esta solución fueron diluidos a 10,0 ml con Solvente A.

En todos los análisis, las soluciones se inyectaron por triplicado y se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2 %.

- Espectrofotometría UV-Vis

Muestras: el extracto acuoso obtenido según el punto 4.1.c.2. fue solubilizado en agua de manera de obtener concentraciones comprendidas entre 300 y 400 µg/ml.

Curva de calibración: se realizó una curva de calibración con ácido gálico abarcando el rango de concentraciones comprendido entre 10 y 50 µg/ml.

Procedimiento: se utilizó el procedimiento descripto en el punto 4.1.b.2.2.

4.2. Estudio de las propiedades nutricionales

El estudio de las propiedades nutricionales se realizó en colaboración con la Cátedra de Bromatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) con la participación de la Bioq. María Silvia Giacomino y del Bioq. Néstor Pellegrino.

4.2.a. Determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa (GC)

Se prepararon extractos hexánicos. Para ello, se pesaron exactamente alrededor de 9,0000 gramos de frutos los que fueron empaquetados en una columna de vidrio de 3 cm de diámetro y 50 cm de largo. Se realizó una percolación con hexano hasta agotamiento de la droga. Se evaporó el solvente hasta obtener un residuo de peso constante.

Solución Muestra: el extracto hexánico fue derivatizado para su posterior análisis por cromatografía gaseosa. La derivatización consistió en la obtención de los metil ésteres de los ácidos grasos, por transmetilación, de acuerdo con el procedimiento indicado en la Norma ISO 12966-2 (2011).

Sustancias de referencia: las siguientes mezclas de metil ésteres de ácidos grasos fueron utilizadas: FAME Mix C4-C24 marca Sigma[®] y NHI-C FAME Mix marca Supelco[®].

Condiciones cromatográficas: se empleó una columna capilar SPTM-2560 de 100 m x 0,25 mm y 0,2 µm. La temperatura se programó de la siguiente manera: 150 °C

durante un minuto y luego un gradiente desde 150 °C a 210 °C durante 20 minutos (5 °C/min). El puerto de inyección y el detector (FID) se mantuvieron a 240 °C y 280 °C respectivamente. El gas carrier empleado fue nitrógeno y el flujo 1.3 ml/min.

4.2.b. Determinación de minerales

La determinación de minerales se realizó de acuerdo con la técnica descrita por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (2000). Para ello, se pesaron exactamente alrededor de 0,5 g de frutos los cuales fueron sometidos a un proceso de digestión con 15 ml de una mezcla de HNO₃/HClO₄ (2:1 V/V) a 140 °C durante 6 horas. Posteriormente, se diluyó la muestra con agua ultra purificada. La determinación de minerales se realizó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA). Los estándares de referencia utilizados fueron los siguientes: sodio, potasio, hierro, cobre, zinc, calcio y magnesio.

4.2.c. Análisis de la Composición Centesimal

El análisis de la composición centesimal se realizó de acuerdo con las técnicas descritas por la AOAC (2000).

- Humedad

Se pesaron exactamente aproximadamente 5,0 g de frutos y se colocaron en pesafiltros previamente tarados. Se dejó en estufa de vacío (50 mm de Hg) a 70 °C hasta obtener un peso constante.

- Cenizas

Se pesaron exactamente aproximadamente 3,0 g de frutos y se colocaron en una cápsula de porcelana previamente tarada. A continuación se llevaron a calcinación en mufla a 550 °C hasta obtener un peso constante.

- Materia grasa

Se pesaron exactamente 5,0 g de frutos y se colocaron en un cartucho adecuado dentro de un Soxhlet. Se realizó un proceso de extracción con éter de petróleo (punto de ebullición 35 – 65 °C) durante 4 horas y el extracto etéreo obtenido fue evaporado en evaporador rotatorio hasta sequedad. Se determinó el peso del residuo.

- Proteínas

Se pesó exactamente aproximadamente 1,0 g de frutos y se colocaron en un tubo de digestión. Se agregó ácido sulfúrico concentrado, catalizador ($K_2SO_4 - HgO$) y se llevó a un calefactor hasta la oxidación total de la materia orgánica. El sulfato de amonio formado a partir del nitrógeno presente en la muestra fue destilado por arrastre con vapor de agua. El amoníaco liberado se recogió en una solución de ácido bórico al 4 % y fue valorado con ácido sulfúrico 0,1 N.

- Fibra dietaria

Se determinó el contenido de fibra dietaria total (FDT), fibra dietaria soluble (FDS) y fibra dietaria insoluble (FDI).

Se pesó exactamente alrededor de 1,0 g de frutos, las cuales fueron sometidas a una digestión enzimática secuencial mediante el empleo de α – amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa.

La fracción de FDI se separó por filtración, se lavó con agua caliente y fue llevada a sequedad en estufa.

La FDS se obtuvo manteniendo en contacto el filtrado obtenido con cuatro volúmenes de etanol al 95 % durante 60 minutos. El precipitado formado (FDS) fue filtrado y llevado a sequedad en estufa.

Sobre ambas fracciones (FDI y FDS) se realizó la determinación de cenizas y proteínas para realizar las respectivas correcciones en el resultado final.

- Hidratos de carbono

El contenido de hidratos de carbono se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Hidratos de carbono (\%)} = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ grasas} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ fibra})$$

5. PARTE II: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS

Los estudios farmacológicos de actividad antioxidante fueron realizados sobre los extractos acuosos y metanólicos, preparados según se detalla en los puntos 4.1.b.1. y 4.1.c.2.

La actividad antioxidante del ácido clorogénico (uno de los compuestos mayoritarios presentes en los extractos) fue determinada en forma paralela con los extractos en los modelos *in vitro*. Las concentraciones utilizadas guardaron relación con la concentración de este compuesto presente en las muestras ensayadas.

5.1. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*

5.1.a. Actividad frente al radical libre ABTS

La determinación de la actividad antioxidante frente al radical libre: ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) se realizó según la técnica descrita por Re y col. (1999).

Preparación de la solución de ABTS: 100 μ l de una solución acuosa de $K_2S_2O_8$ (19 mg/ml) se trasvasaron cuantitativamente a un matraz aforado de 10,0 ml y se llevó a volumen con una solución de ABTS en agua (1,08 mg/ml). Se dejó reposar en la oscuridad durante 16 horas y al momento de ser utilizada se mezcló con etanol absoluto en una relación de 1: 13,6. La Absorbancia de la solución obtenida estuvo comprendida dentro del rango $0,7 \pm 0,03$ ($\lambda = 734$ nm).

Preparación de las soluciones Muestra: los extractos metanólicos y acuosos fueron diluidos convenientemente con agua destilada en el tubo de reacción hasta obtener, a partir de los mismos, las siguientes concentraciones: 1, 10, 100 y 1000 μ g/ml en el tubo de reacción. Los blancos de muestra fueron preparados con agua destilada.

Preparación de las soluciones de ácido clorogénico: el ácido clorogénico estándar fue diluido en metanol para obtener las siguientes concentraciones en el tubo de reacción: 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000 μ g/ml. Se realizó un blanco con metanol.

Soluciones de referencia: se utilizó el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox[®]) como estándar de referencia antioxidante. Se prepararon soluciones etanólicas en el rango de concentraciones comprendido entre 2 y 22 μM en el tubo de reacción. Se realizó una curva de calibración.

Procedimiento: se tomaron 10 μl de cada solución Muestra o de cada solución de ácido clorogénico o solución de referencia y se trasvasaron a un vial. Se añadieron 990 μl de la solución de ABTS, se homogeneizó y se midió la Absorbancia a 734 nm a los 3 minutos de realizada la dilución.

El porcentaje de eliminación del radical libre ABTS se determinó según la siguiente ecuación:

$$\% \text{Eliminación} = \frac{(A_b - A_x)}{A_b} \times 100$$

Donde A_b es el valor correspondiente a la Absorbancia del ABTS y A_x es el valor de Absorbancia correspondiente a las muestras o al estándar.

5.1.b. Actividad frente al radical libre DPPH

La actividad antioxidante medida a través de la capacidad eliminadora del radical libre difenil picrilhidrazilo (DPPH) se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Blois (1958).

Preparación de las soluciones Muestra: los extractos acuosos y metanólicos fueron diluidos en los solventes que le dieron origen, de forma de obtener soluciones con las siguientes concentraciones finales en el tubo de reacción: 1, 10, 10^2 , 10^3 y 10^4 $\mu\text{g/ml}$. Se prepararon blancos de muestra utilizando agua destilada o metanol, según el caso.

Preparación de las soluciones de ácido clorogénico: el ácido clorogénico estándar de referencia fue diluido en metanol para obtener las siguientes concentraciones en el tubo de reacción: 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$. Se realizó un blanco con metanol.

Soluciones de referencia: se utilizó vitamina C como estándar de referencia antioxidante. Se prepararon soluciones acuosas abarcando el rango comprendido entre 0, 1 y 1000 µg/ml en el tubo de reacción.

Procedimiento: se tomaron 100 µl de cada solución Muestra o de cada solución de ácido clorogénico o solución de referencia antioxidante y se colocaron en un vial. Se añadieron 400 µl de *buffer* Tris-clorhídrico 100 mM y 500 µl de una solución de DPPH 500 µM en etanol absoluto. Se incubó en oscuridad durante 20 minutos y se leyó la Absorbancia a 517 nm.

Se realizó un control de DPPH preparado con *buffer* Tris-clorhídrico 100 mM.

La actividad antioxidante se determinó mediante la comparación de la Absorbancia obtenida con las soluciones Muestra, soluciones de ácido clorogénico o estándar con la obtenida con el control de DPPH. Los resultados se expresaron de acuerdo con la siguiente ecuación:

Actividad eliminadora de radicales DPPH (% respecto al control) = [(Absorbancia Muestra – Absorbancia control) / Absorbancia control] x 100.

La actividad antioxidante expresada como concentración efectiva media (CE₅₀) se calculó con la siguiente fórmula (Alexander y col., 1999).

$$CE_{50} = \text{Antilog } D - \left\{ \left[(A - 50 \% \text{ respuesta máxima}) X \right] / Y \right\}$$

Donde:

A = Valor inmediato superior al 50 % de la respuesta máxima

B = Valor inmediato inferior al 50 % de la respuesta máxima

D = log concentración correspondiente a la respuesta A

C = log concentración correspondiente a la respuesta B

X = D – C

Y = A – B

5.1.c. Actividad inhibidora de la peroxidación lipídica. Ensayo del FTC

La actividad inhibidora de la peroxidación lipídica se determinó de acuerdo con el método de Osawa y Namiki (1981), modificado por Sanches-Moreno, Larrauri y Saura-Calixto (1998). Este método se basa en determinar la capacidad de las muestras para inhibir la peroxidación lipídica del ácido linoleico. Este ácido se oxida originando peróxidos, que a su vez reaccionan con el cloruro ferroso, oxidándolo. El hierro oxidado como Fe^{+++} reacciona con el tiocianato de amonio dando tiocianato férrico, de color rojizo, que absorbe a 500 nm. Una disminución en la Absorbancia es indicativa de actividad antioxidante.

Preparación de las soluciones Muestra: los extractos acuosos y metanólicos fueron diluidos en los solventes que le dieron origen de forma de obtener soluciones con las siguientes concentraciones finales en el tubo de reacción: 1000, 5000, 10000 y 15000 $\mu\text{g/ml}$. Se realizaron blancos de muestra utilizando agua destilada y metanol.

Preparación de las soluciones de ácido clorogénico: el ácido clorogénico estándar fue diluido en metanol para obtener las siguientes concentraciones en el tubo de reacción: 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$. Se realizó un blanco con metanol.

Solución de referencia: se utilizó una solución acuosa de vitamina C estándar (control positivo antioxidante) de manera de obtener una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ en el tubo de reacción.

Procedimiento: se colocaron 1600 μl de cada solución Muestra o solución de ácido clorogénico o solución de referencia antioxidante en un tubo de vidrio y se agregaron 3200 μl de *buffer* fosfato pH 7, 1600 μl de agua ultra pura y 1600 μl de ácido linoleico (2,5 % en etanol absoluto). Se incubó en un baño termostático a 37 °C durante 4 días. Cada 24 horas se tomaron 50 μl de muestras de cada tubo y se hicieron reaccionar con 50 μl de tiocianato de amonio (30 %) y 50 μl de cloruro ferroso (0,02 M) en presencia de etanol al 75 %. Se incubaron durante 3 minutos en oscuridad y se determinó la Absorbancia a 500 nm. Se realizó un control con *buffer* fosfato pH 7.

La actividad antioxidante se determinó por comparación entre la Absorbancia obtenida con las soluciones Muestra o con cada solución de ácido clorogénico o solución de referencia antioxidante y la obtenida con el control, en el tiempo de máxima oxidación del ácido linoleico (96 horas de incubación en baño termostático a 37 °C). Se calculó la actividad antioxidante con la siguiente fórmula:

Inhibición de la peroxidación lipídica (% respecto al control) = [(Absorbancia Muestra-Absorbancia control)/ Absorbancia control] x 100

La concentración efectiva media de la actividad antioxidante (CE₅₀) fue calculada según el método de Alexander y col. (1999) tal como se describe en el punto 5.1.b.

5.1.d. Actividad símil enzimática

- Actividad catalasa

La determinación de la actividad catalasa (CAT) se realizó de acuerdo con el método descrito por Carrillo y col. (1991). Este método evalúa la capacidad de un extracto o un compuesto de descomponer el H₂O₂ en O₂ y H₂O. El H₂O₂ absorbe a 240 nm, por lo tanto, una disminución en la Absorbancia indica la capacidad eliminadora del H₂O₂.

Preparación de las soluciones Muestra: los extractos acuosos y metanólicos fueron diluidos en los solventes que les dieron origen de manera de obtener soluciones con las siguientes concentraciones en el tubo de reacción: 0,1, 1, 10, 100 y 700 µg/ml. Los blancos de muestra se prepararon con agua destilada y metanol.

Preparación de las soluciones de ácido clorogénico: el ácido clorogénico estándar fue diluido en metanol para obtener concentraciones en el tubo de reacción dentro del rango comprendido entre 0,05 y 5000 µg/ml. Se realizó un blanco con metanol.

Procedimiento: se colocaron 100 μl de las soluciones Muestra o soluciones de ácido clorogénico en el tubo de reacción a los cuales se añadieron 2850 μl de *buffer* fosfato 50 mM (pH 7). Se homogeneizó con ayuda de un agitador a vibración y se trasvasó cuantitativamente a una cubeta para lectura espectrofotométrica. Inmediatamente antes de comenzar la lectura se añadieron 50 μl de H_2O_2 0,35 M para poder observar la cinética de la reacción a través de la variación de la Absorbancia con el tiempo.

La actividad catalasa se determinó en forma cinética, midiendo el cambio en la Absorbancia por minuto ($\Delta \text{Abs}/\text{min}$) a 240 nm durante 5 minutos.

Con el $\Delta \text{Abs}/\text{min}$ promedio (velocidad promedio) de las soluciones Muestra o soluciones de ácido clorogénico determinado en la porción lineal de la curva, se calculó la concentración de H_2O_2 degradado por minuto, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar a 25°C y pH 7 del H_2O_2 ($0,0394 \mu\text{M}/\text{min}/\text{cm}^2$) (Nelson y Kiesow, 1972). Una vez calculada la concentración de H_2O_2 degradado por minuto se calculó la actividad catalasa teniendo en cuenta que 1 unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima requerida para descomponer 1 μM de H_2O_2 .

- Actividad peroxidasa

La determinación de la actividad peroxidasa (Px) se realizó según el método descrito por Herzog y Fahimi (1973). Este método evalúa la capacidad de un extracto o compuesto de reducir al H_2O_2 a agua, y oxidar al mismo tiempo a la sustancia 3,3'-diaminobencidina (DAB). La DAB se oxida originando un compuesto de color marrón que puede ser determinado espectrofotométricamente a 465 nm.

Preparación de las soluciones Muestra: los extractos acuosos y metanólicos fueron diluidos en los solventes que les dieron origen de forma de obtener soluciones con las siguientes concentraciones en el tubo de reacción: 500, 1000, 2000, 4000, 6000 y 8000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El blanco de muestra se preparó con agua destilada.

Preparación de las soluciones de ácido clorogénico: el ácido clorogénico estándar fue diluido en metanol para obtener concentraciones en el tubo de reacción dentro del rango comprendido entre 50 y 500 µg/ml. Se realizó un blanco con metanol.

Preparación de la solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB): se preparó una solución extemporánea de concentración 5×10^{-4} en *buffer* Krebs – Henseleit (pH 7,4). El *buffer* Krebs – Henseleit se preparó con los siguientes compuestos (mM): NaCl (125); KCl (4,0); NaHCO₃ (25); PO₄HNa (0,6); MgCl₂ (0,1) y CaCl₂ (1).

Preparación de la solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂): se preparó una solución acuosa extemporánea de H₂O₂ a partir de H₂O₂ de 30 volúmenes haciendo una dilución 1/86.

Soluciones de referencia: se prepararon soluciones de peroxidasa de rábano picante de concentraciones conocidas.

Procedimiento: se colocaron 100 µl de cada solución Muestra o ácido clorogénico o solución de referencia, en el tubo de reacción. Se añadieron 875 µl de solución de DAB y 25 µl de solución de H₂O₂. Se determinó el cambio en la Absorbancia por minuto (Δ Abs/min) a partir del agregado del peróxido de hidrógeno a 465 nm, a intervalos de 30 segundos por un lapso de 5 minutos. Para calcular la actividad peroxidasa se determinó el Δ Abs/min promedio (velocidad promedio) de la Muestra en la porción lineal de la curva obtenida y se interpoló en la curva de calibración obtenida con el estándar de referencia (Δ Abs/min en función de la concentración de enzima).

- Actividad superóxido dismutasa

La determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Carrillo y col. (1991). Este método se basa en la capacidad de un extracto o un compuesto de inhibir la oxidación espontánea de la adrenalina a adenocromo, a través de la reducción del oxígeno. La adrenalina se auto-oxida a pH 10,7 y forma un compuesto llamado adenocromo de color rosado-rojizo que presenta absorción a 480 nm.

Preparación de las soluciones Muestra: los extractos metanólicos y acuosos fueron diluidos en los solventes que les dieron origen para obtener soluciones con las siguientes concentraciones en el tubo de reacción: 7, 10, 70, 100, 400, 700 y 1000 µg/ml. Se prepararon blancos de muestra utilizando agua destilada y metanol.

Preparación de las soluciones de ácido clorogénico: el ácido clorogénico estándar fue diluido en metanol para obtener concentraciones en el tubo de reacción dentro del rango comprendido entre 0,05 y 5000 µg/ml. Se realizó un blanco con metanol.

Procedimiento: se colocaron 50 µl de las soluciones Muestra o ácido clorogénico estándar en el tubo de reacción, se adicionaron 910 µl de *buffer* fosfato 0,05 M, pH 10,7 (48,32 ml PO₄HNa₂ 0,05 M + 1,68 ml NaOH 0,05 M), y en el momento de comenzar la reacción se agregaron 40 µl de adrenalina 2 mM. Luego del agregado de la adrenalina; se midió la formación del adenocromo espectroscópicamente a 480 nm en función del tiempo (cada 10 segundos) durante 5 minutos.

Se realizó un control de auto-oxidación de la adrenalina preparado con 960 µl del *buffer* fosfato 0,05 M, pH 10,7 y 40 µl de adrenalina.

La actividad SOD se calculó determinando el Δ Abs/min promedio (velocidad promedio) de la Muestra o ácido clorogénico estándar obtenido en la porción lineal de la curva y el Δ Abs/min promedio (velocidad promedio) de la adrenalina (control de auto-oxidación). Luego se calculó el porcentaje de inhibición de la oxidación de la adrenalina según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = [\Delta \text{Abs/min adrenalina (control de auto-oxidación)} - \Delta \text{Abs/min Muestra}] / \Delta \text{Abs/min adrenalina (control de auto-oxidación)} \times 100$$

La actividad SOD se calculó teniendo en cuenta que 1 U SOD inhibe la auto-oxidación de la adrenalina en un 50 %.

5.2. Análisis de la actividad antioxidante en glándulas submandibulares

Se realizó la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos acuosos y metanólicos en glándulas submandibulares de animales sanos y de animales con diabetes inducida por la administración de estreptozotocina.

Animales de experimentación: los animales fueron manipulados de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (Número: 220612-1), y de acuerdo con la guía de cuidados y uso experimental de animales del *U.S. Department of Health, Education and Welfare* (DHEW Publication, NIH 80-23).

Se utilizaron ratas hembra (30 animales) pertenecientes a la cepa Wistar con un peso comprendido entre 150 y 200 g. Los animales fueron mantenidos en un cuarto con atmósfera e iluminación controladas (22 ± 2 °C, fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) y fueron alimentados con Purina[®] Chow y con agua *ad libitum*. El día anterior a los experimentos fueron sometidos a un ayuno de 24 horas.

Inducción de diabetes por estreptozotocina: la mitad de los animales (15) se usaron como control y fueron tratados con *buffer* fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) (CINa 8,6 g, KH₂PO₄ 0,43 g, Na₂HPO₄ 1,18 g / litro de agua), vía i.p. La otra mitad fue inyectada con una dosis única de estreptozotocina (60 mg/kg) vía i.p. Luego de 10 días de la administración de estreptozotocina, se determinaron los niveles de glucemia, en muestras de sangre obtenidas por punción de la cola, con tiras reactivas Acucheck[®] y se determinó el contenido de proteínas en suero por el método de Lowry y col. (1951). Aquellos animales con niveles de glucemia superiores a 300 mg/dl conformaron el grupo de animales tratados. Todos los animales (control y tratados) fueron pesados y sometidos a eutanasia, y se les extirparon las glándulas submandibulares.

- Preparación y tratamiento de las glándulas submandibulares

Se procedió a la remoción del tejido graso, los ganglios linfáticos y el tejido conectivo con ayuda de una lupa. Las glándulas fueron pesadas e incubadas en *buffer* Krebs-Henseleit pH 7,4 a 37°C durante 10 minutos en presencia de 95 % O₂ y 5 % CO₂. Una vez alcanzadas las condiciones de equilibrio, las glándulas fueron incubadas durante 40 minutos con los extractos o bien con *buffer* Krebs-Henseleit (controles). Una glándula de cada animal fue tomada como control para obtener un valor basal y la otra fue incubada con los diferentes tratamientos. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se retiró el medio de incubación con una pipeta y las glándulas fueron homogeneizadas en *buffer* Krebs-Henseleit conteniendo fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF, por sus siglas en inglés) 10⁻⁴ M (inhibidor de proteasas) y EDTA 10⁻³ M para obtener el homogeneizado de las glándulas. Una vez sometidas al proceso de homogeneización, fueron centrifugadas a 1000 x g durante 15 minutos a 5 °C (Anesini y col., 2004).

En el sobrenadante correspondiente al homogeneizado se determinó el contenido de proteínas de cada glándula por el método de Lowry y col. (1951).

5.2.a. Efecto sobre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

- Anión superóxido

La determinación de anión superóxido se realizó de acuerdo con el método descrito por Schopf y col. (1984). Para ello, se incubaron 50 µl del homogeneizado de glándulas con 200 µl de azul de nitrotetrazolio (NBT) 0,1 % y 50 µl de PBS durante 30 minutos en tubos Eppendorf®. La reacción fue detenida con el agregado 500 µl de HCl 1N. Se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y los cristales de formazán se extrajeron con 300 µl de dioxano. Se tomaron 200 µl de la solución anterior y se colocaron en placas de ELISA. A continuación, se determinó la Absorbancia a 550 nm en espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en nmoles de NBT reducido / g glándula.

- Peróxido de hidrógeno

La determinación de peróxido de hidrógeno se realizó en el homogeneizado de las glándulas. Para ello, 50 μ l del homogeneizado fueron incubados con 100 μ l de una solución que contenía: 3-3'diaminobencidina (DAB) 0,56 mM, NaCl 140 mM, fosfato diácido de potasio 10 mM, dextrosa 5,5 mM, y peroxidasa de rábano tipo II, 0,01 mg/ml. Luego de 1 hora de incubación, la reacción fue interrumpida con el agregado de 10 μ l de una solución de NaOH 4 N. Se determinó la Absorbancia a 650 nm en un lector de placas de ELISA y los valores obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración de H₂O₂. Los resultados se expresaron en moles de H₂O₂ / g glándula.

- Óxido nítrico

La determinación de óxido nítrico se realizó a través de la valoración de los nitritos totales utilizando el reactivo de Griess (Becherel y col., 1997). Para ello, 50 μ l del homogeneizado de glándulas fueron incubados con 100 μ l del reactivo de Griess (2,5 ml de (α -naftil) etilendiamida 0,1 % + 5 ml ác. sulfanílico 2,4 % + 2,5 ml de una solución de ácido clorhídrico preparada de la siguiente forma: ácido clorhídrico fumante: agua destilada (1:30)) durante 15 minutos en oscuridad. A continuación se determinó la Absorbancia a 540 nm. Los nitritos totales fueron determinados por interpolación en una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas de nitritos ($7,7 \times 10^{-4}$ a 0,025 mM) preparadas a partir de nitrito de sodio y los resultados se expresaron como mmoles de NO / g de glándula.

5.2.b. Determinación de la actividad enzimática

- Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa fue determinada por el método de Herzog y Fahimi (1973), descripto anteriormente en el punto 5.1.d. La enzima secretada (S) fue

determinada en el medio de incubación de las glándulas. La enzima no secretada (NS) fue determinada en el homogeneizado de las glándulas. La actividad enzimática total (T) fue calculada con la siguiente ecuación: $T = NS + S$. En todos los casos la actividad fue expresada como U / ml / g glándula.

El porcentaje de enzima secretada se calculó como $S (\%) = (S / T) \times 100$.

- Actividad SOD

La actividad SOD se determinó en el medio de incubación por el método de Carillo y col. (1991) descrito anteriormente en el punto 5.1.d.

5.3. Efecto sobre el tránsito intestinal

Procedimiento: los frutos finamente molidos se suspendieron en una solución de carboximetilcelulosa al 1 %.

Los animales de experimentación consistieron en ratones de la cepa Swiss. Se trabajó con 3 grupos de 5 animales cada uno (control, control positivo tratado con atropina y tratados con frutos). Previamente a la realización del ensayo, los animales fueron sometidos a un ayuno de 24 horas con acceso *ad libitum* a agua. El grupo control recibió una dosis de carboximetilcelulosa al 1 % (0,1 ml/10 g) por vía oral, el grupo de animales tratados con atropina recibió una dosis de 0,1 mg/kg por vía intraperitoneal y el grupo tratado con los frutos recibió 500 mg/kg de frutos por vía oral suspendidos en una solución de carboximetilcelulosa al 1 % (volumen de administración: 0,1 ml/10 g). Luego de 30 minutos, se administró a cada grupo 0,3 ml de una suspensión de carbón al 10 % en carboximetilcelulosa al 1 % en agua, por vía oral. Luego de 30 minutos de administrada esta suspensión, los animales fueron sacrificados y se les extrajo el tracto gastrointestinal desde la unión gastroesofágica hasta la unión ileocecal. Se midió la distancia recorrida por el carbón desde el píloro, y se expresó esta medida como porcentaje de la longitud total del tracto intestinal (desde la unión gastropilórica hasta la unión ileocecal) (Uddin y col., 2005).

5.4. Ensayo de toxicidad aguda

La toxicidad aguda se determinó de la siguiente manera:

Animales de experimentación: se emplearon ratones pertenecientes a la cepa Swiss (5 hembras y 5 machos) del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, con un peso inicial de $18 \pm 0,6$ g (hembras) y $21 \pm 0,2$ g (machos).

Procedimiento: a los animales se les administró una dosis de 1000 mg/kg de una suspensión de frutos en carboximetilcelulosa al 1 % por vía oral, con un ayuno previo de 16 horas. Los animales fueron observados durante 15 días (Arango y col., 2005).

6. PARTE III: DESARROLLO TECNOLÓGICO DE UN PRODUCTO ALIMENTICIO

El desarrollo tecnológico fue realizado en el Instituto de Tecnología de los Alimentos perteneciente a la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral, bajo la dirección de la Dra. Silvina Drago.

El desarrollo tecnológico se realizó a fin de evaluar el valor potencial del material vegetal para su utilización en la industria alimentaria.

6.1. Procesamiento del material vegetal

3,000 kg de frutos fueron sometidos a un proceso de limpieza y clasificación en un equipo limpiador y clasificador Bravender[®], Labofix. Como resultado, se obtuvo una muestra de frutos separada de “palos” y “finos”. A continuación, se procedió a la molienda de los frutos en un molino a rolos estriados (**Figura 14**). La velocidad del cilindro de alimentación fue de 60 rpm y la velocidad de los rolos fue de 168 y 420 rpm (relación 2,5). Primeramente, los frutos fueron molidos con una separación entre cilindros de 1 mm. El producto así obtenido fue tamizado con una malla de 1190 μ y la fracción que quedó retenida fue sometida a un nuevo proceso de molienda. La segunda molienda fue realizada con una separación de cilindros de 0,5 mm, seguida de una separación de 0,25 mm. El producto obtenido fue tamizado con una malla de 1190 μ y la fracción retenida en el tamiz fue molida nuevamente con una separación de cilindros de 0 mm. El producto obtenido fue tamizado con una malla de 1190 μ y las partículas que esta vez quedaron retenidas, fueron tamizadas con una malla de 2000 μ . La fracción que no atravesó la malla fue descartada y las demás fracciones fueron reunidas para obtener una harina con tamaño de partícula comprendido entre 1190 y 2000 μ .



Figura 14: Proceso de molienda de los frutos en molino de rolos estriados.

El contenido de humedad de las harinas de frutos y de maíz se determinó por gravimetría. Para ello, se determinó el peso de latas vacías (P1) y se agregaron aproximadamente 2 g de muestra. Se realizó nuevamente la determinación del peso (P2). Las latas se colocaron en una estufa a 130 °C durante una hora y luego se retiraron y colocaron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se determinó el peso de las latas (P3) y el contenido de humedad, en porcentaje, fue calculado de acuerdo con el procedimiento de la AOAC (2000) según la siguiente ecuación:

$$\frac{(P3 - P1) \times 100}{(P2 - P1)}$$

La determinación de humedad de cada harina se realizó sobre dos experimentos realizados por duplicado.

6.2. Preparación de las mezclas para extrudir

El nivel de reemplazo y las condiciones de temperatura y humedad elegidas fueron seleccionados en base a estudios previos.

Se prepararon cuatro mezclas de 400 g cada una con un nivel de reemplazo de harina de maíz por harina de frutos del 15 %, calculado sobre base seca (SBS), dos de las cuales fueron preparadas con un contenido de humedad final (H) del 16 % (M1) y las otras dos, con un contenido de humedad del 18 % (M2). Las temperaturas seleccionadas para el proceso de extrusión fueron 160 °C y 190 °C.

La cantidad de cada harina y de agua a incorporar en la mezcla para lograr el nivel de reemplazo (SBS) y el nivel de humedad buscados, se determinó teniendo en cuenta el contenido de humedad de las harinas.

Las mezclas fueron preparadas una hora antes de cada proceso de extrusión, mezclando los distintos ingredientes en una mezcladora planetaria. Primeramente fueron incorporados los ingredientes secos (harinas de maíz y de frutos) y a continuación, fue incorporada el agua destilada, gota a gota, con una pipeta graduada, hasta lograr una mezcla homogénea. Las mezclas fueron mantenidas en bolsas plásticas cerradas, hasta el comienzo del proceso de extrusión.

6.3. Proceso de Extrusión

6.3.a. Condiciones

Se utilizó un extrusor monotornillo con una relación de compresión 4:1, y una boquilla de 3,5 mm de diámetro por 20 mm de longitud. La velocidad de rotación del tornillo fue: 150 rpm (**Figura 15**).

La alimentación del extrusor a través de la tolva, fue realizada de manera que asegurara el llenado completo de la zona de alimentación del tornillo.

Las muestras de producto extrudido se tomaron luego de alcanzar el estado estacionario, es decir, cuando el momento torsor, la temperatura y el caudal de salida

eran constantes. Una vez obtenidas, se dejaron secar al aire hasta el día siguiente y luego fueron guardadas en bolsas de plástico.

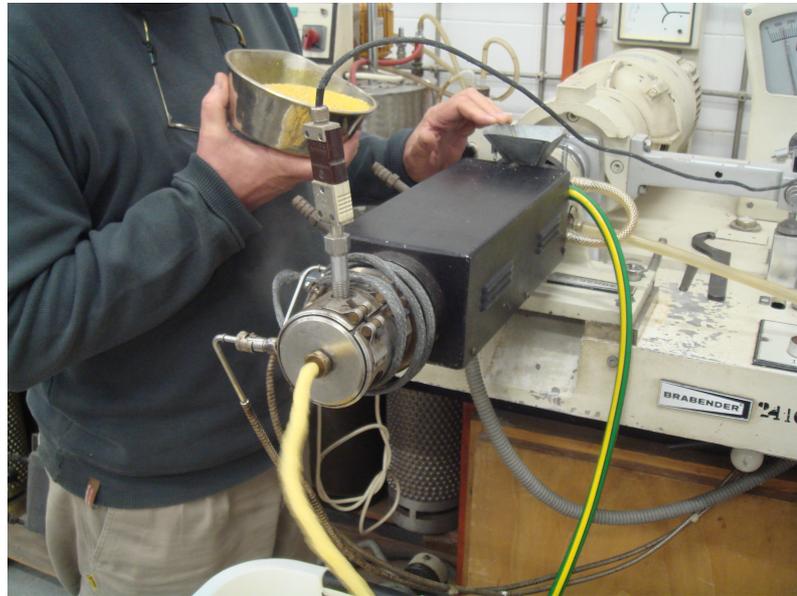


Figura 15: Proceso de extrusión de las mezclas de harina de maíz-harina de frutos.

6.3.b. Evaluación del proceso de extrusión

El proceso de extrusión fue evaluado a través del consumo específico de energía mecánica (CEEM). Durante este proceso, se registró el torque (o momento torsor) “T” indicado por el dinamómetro del equipo de extrusión en unidades Brabender. También se determinó el caudal másico “Q_{ss}” en g/min (SBS) para cada muestra una vez alcanzado el estado estacionario. Teniendo en cuenta estas variables, junto a la velocidad del tornillo “N” expresada en rpm, se realizó el cálculo del CEEM según la siguiente fórmula (González, Torres y De Greef, 2002):

$$\text{CEEM}(\text{Joule/g}) = (\text{K} \times \text{T} \times \text{N}) / \text{Q}_{\text{ss}}$$

Donde:

$$K = 61,3 \times 10^{-3}$$

T = momento torsor

N = velocidad de rotación del tornillo

Q_{ss} = caudal másico

6.4. Evaluación de las características fisicoquímicas de los productos obtenidos

La evaluación de las características fisicoquímicas de los productos obtenidos se realizó a través de la determinación de los siguientes parámetros:

- Humedad

El contenido de humedad del material extrudido se determinó por gravimetría al igual que en las harinas según se describe en el punto 6.1.

- Expansión radial

La expansión (E) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$E = \text{diámetro del producto} / \text{diámetro de la boquilla}$$

El diámetro de cada producto obtenido se determinó calculando el promedio de los diámetros determinados en 10 trozos de 6 cm de longitud cada uno, en 3 zonas diferentes, con un calibre Vernier (sensibilidad 0,02 mm).

- Volumen específico

El volumen específico (V_e) se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$V_e \text{ (cm}^3 \text{ / g)} = (\pi \times d^2 \times l) / (4 \times Ps)$$

Donde:

d = Diámetro, calculado según se describe en el punto 6.1.

l = Longitud promedio de 10 trozos de 6 cm de diámetro

Ps = Peso seco promedio de 10 trozos de 6 cm de diámetro

6.5. Análisis de las harinas obtenidas por molienda de los productos extrudidos

Una vez obtenidos los productos extrudidos, estos fueron molidos en un molino de martillos fijos con una malla de 1 mm. La harina obtenida se pasó por un tamiz de 420 μm y la fracción retenida fue sometida nuevamente al proceso de molienda. Para la segunda molienda se utilizó una malla de 0,25 mm. La harina así obtenida se pasó por un tamiz de 420 μm y la fracción retenida fue molida con un molino CYCLOTTEC®. Finalmente se reunieron todas las fracciones de harina y se determinó en las muestras el contenido de humedad, la solubilidad en agua, la absorción de agua y la actividad antioxidante.

- Determinación de humedad

La humedad se determinó según se describe en el punto 6.1.

- Solubilidad en agua

La solubilidad en agua fue determinada de la siguiente manera: se pesaron exactamente alrededor de 2,5 g de muestra la cual fue trasvasada cuantitativamente a un tubo de centrífuga. Se agregaron 25 gramos de agua destilada, y se agitó durante 30 minutos. A continuación se centrifugó a 2000 G durante 30 minutos. Los sólidos solubles fueron determinados en el sobrenadante obtenido tomando una alícuota del mismo y dejándola evaporar en estufa a 105° C durante 24 horas. Se determinó el peso

del residuo seco y se expresó la solubilidad en porcentaje respecto de la muestra seca (Anderson y col., 1969; González, Torres, y De Greef , 2002).

La determinación se realizó sobre dos experimentos independientes realizados por duplicado para cada producto.

- Absorción de agua

La absorción de agua se determinó mediante el empleo de un equipo de Baumann (**Figura 16**).

Una vez instalado el equipo, se llenó de agua evitando la incorporación de burbujas. Se colocó papel filtro dentro del embudo y se dejó que embebiera agua durante aproximadamente 5 minutos. A continuación, se eliminó el exceso de agua sobre el papel de filtro, absorbiéndolo con un papel absorbente, con el objetivo de enrasar en cero la columna de agua en la pipeta. Se verificó que la nivelación del equipo no variara durante un lapso de 10 minutos.

El análisis de las muestras se realizó pesando exactamente alrededor de 50 mg de cada una, los cuales fueron esparcidos rápidamente, por separado, sobre el papel de filtro húmedo formando una capa uniforme. Una vez colocada la muestra se midió el tiempo de retroceso de la columna de agua en la pipeta hasta que no se registró más variación. La absorción fue expresada como la cantidad de agua absorbida en el punto de equilibrio (25 minutos).

La determinación se realizó sobre dos experimentos realizados por duplicado para cada producto.

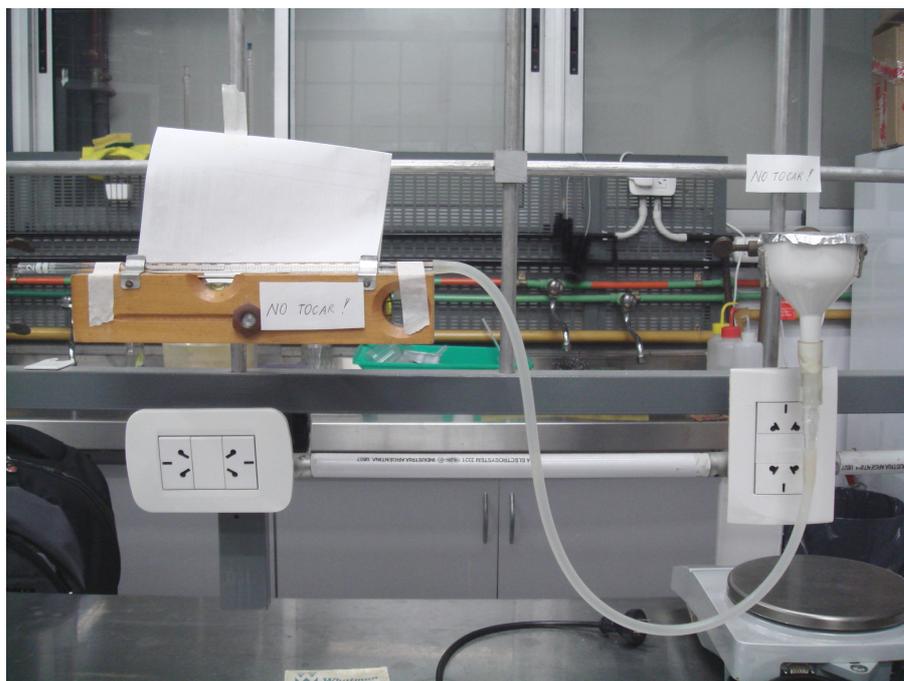


Figura 16: Equipo de Baumann utilizado para determinar la absorción de agua.

- Actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue determinada en las harinas de los productos extrudidos y en las mezclas de harinas preparadas para extrudir. Esta actividad fue evaluada mediante el análisis de la capacidad de eliminar el radical libre ABTS, utilizando Trolox[®] como antioxidante de referencia. Los resultados fueron expresados en μ moles equivalentes de Trolox[®] /g de muestra (Re y col., 1999).

Solución stock del radical libre ABTS: se pesaron exactamente alrededor de 0,050 g de ABTS, los cuales fueron trasvasados a un matraz aforado de 50,0 ml llevando a volumen con *buffer* fosfato salino (PBS). El *buffer* fue preparado a partir de una mezcla de 0,7098 g de fosfato de sodio dibásico, 0,1347 g fosfato de potasio monobásico, 4,0908 g de cloruro de sodio y 0,0749 g de cloruro de potasio, los cuales fueron llevados a un volumen de 500 ml con agua destilada, ajustando el pH a 7,4 con hidróxido de sodio 1M. Por otro lado, se colocaron 40 μ l de una solución 70 mM de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) en agua en un matraz de 10,0 ml y se llevó a volumen con la solución stock de ABTS. Se homogenizó por inversión y se dejó reposar a

temperatura ambiente y en la oscuridad durante 16 hs. En el momento de uso se diluyó la solución con PBS hasta alcanzar un valor de Absorbancia de $0,80 \pm 0,03$.

Soluciones Muestra: la preparación de las muestras se realizó pesando exactamente alrededor de 0,02 g de cada muestra, los cuales fueron trasvasados cuantitativamente, por separado, a tubos Eppendorf[®]. A continuación, se agregó 1,0 ml de PBS, se homogeneizó con ayuda de un agitador a vibración y se dejó reposar durante 15 minutos. Se volvió a homogeneizar, y las muestras fueron centrifugadas durante 3 minutos a 11000 rpm. El sobrenadante fue usado para la determinación.

Solución de referencia: se preparó una solución madre de Trolox[®] (SM) 4 mM. Luego se hicieron diluciones a partir de la misma, abarcando el rango de concentración comprendido entre 0,5 y 3,5 mM, utilizando PBS como solvente de dilución. Las diluciones fueron preparadas según el esquema indicado en la **Tabla 1**.

| Concentración de Trolox [®] (mM) | Volumen de SM (μ l) | Volumen de PBS (μ l) |
|--|-----------------------------|------------------------------|
| 3,5 | 175 | 25 |
| 2,5 | 125 | 75 |
| 1,5 | 75 | 125 |
| 1 | 50 | 150 |
| 0,5 | 25 | 175 |

Tabla 1: Concentraciones finales de Trolox[®] (columna izquierda). Volúmenes de SM 4 mM (columna central). Volumen de PBS utilizados (columna derecha). SM: Solución madre de Trolox[®]. PBS: *buffer* fosfato salino (pH: 7,4).

Las soluciones a ensayar fueron preparadas tomando 10 μ l de Muestra o solución de referencia, los cuales fueron colocados en una placa para lectura espectrofotométrica. Se adicionaron 190 μ l de ABTS y se determinó la Absorbancia a 734 nm, a los 3 minutos.

En todos los casos se realizaron tres experimentos independientes por triplicado y se determinó la media y el error estándar de la media (ESM).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7.1. Estudio de la composición química

7.1.a. Estudio fitoquímico:

En todos los casos se realizaron dos experimentos independientes por triplicado y se determinó la media y su desvío estándar (SD).

7.1.b. Estudio de las propiedades nutricionales:

En todos los casos se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. Se determinó la media y el error estándar de la media (ESM).

7.2. Estudios farmacológicos:

- Evaluación de la actividad antioxidante in vitro:

El estudio estadístico se realizó sobre tres experimentos independientes realizados por sextuplicado.

En todos los casos se determinó la media y el error estándar de la media (ESM).

Para analizar la significación entre las medias se aplicó la prueba t de Student para muestras no apareadas.

En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas cuando P resultó menor o igual a 0,05.

- Evaluación de la actividad antioxidante en un modelo biológico:

El análisis estadístico se realizó sobre cuatro experimentos independientes realizados por duplicado.

En todos los casos se determinó la media y su error estándar (ESM).

La significación entre las medias fue analizada a través de la aplicación del *test* de ANOVA para comparación de diferentes grupos de tratamientos, y luego el *test* de Dunnett para comparación de datos.

La comparación de dos medias se realizó mediante la prueba t de Student para muestras no apareadas.

En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas cuando p resultó menor o igual a 0,05.

- Análisis del efecto sobre el tránsito intestinal:

En todos los casos se determinó la media y el desvío estándar (SD).

La significación entre las medias fue analizada a través de la aplicación del *test* de ANOVA para comparación de diferentes grupos de tratamientos, y luego el *test* de Dunnett para comparación de datos.

7.3. Desarrollo tecnológico de un producto alimenticio:

7.3.a. Determinación de humedad de las harinas para extrudir:

La determinación se realizó sobre dos experimentos realizados por duplicado.

Se determinó la media y el desvío estándar (SD).

7.3.b. Evaluación de las características fisicoquímicas de los productos extrudidos:

- Humedad

La determinación se realizó sobre dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Se determinó la media y el desvío estándar (SD).

- Expansión radial y volumen específico

La determinación se realizó sobre diez experimentos realizados por triplicado.

7.3.c. Análisis de las harinas obtenidas por molienda de los productos extrudidos:

- Humedad, solubilidad en agua y absorción de agua:

El análisis se realizó sobre dos experimentos realizados por duplicado

- Capacidad eliminadora del radical ABTS:

La capacidad eliminadora del radical ABTS se determinó sobre tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Se determinó la media y su error estándar (ESM).

La significación entre las medias fue analizada según el *test* de ANOVA y luego el *test* de Dunnett.

RESULTADOS

1. PARTE I: ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

1. 1. Estudio fitoquímico

1.1.a. Extractos acetónicos

Los extractos acetónicos fueron procesados y analizados según se indica en **Materiales y Métodos (4.1.a.)**.

1.1.a.1. Análisis de triterpenos

El rendimiento del extracto acetónico obtenido para el análisis de triterpenos fue: **6,6 ± 0,2 %** con respecto al fruto.

- Análisis cualitativo por TLC

En el perfil cromatográfico de la muestra se observó una única banda coincidente en R_f y color con el testigo de ácido ursólico (R_f ≅ 0,5) (**Figura 17**).

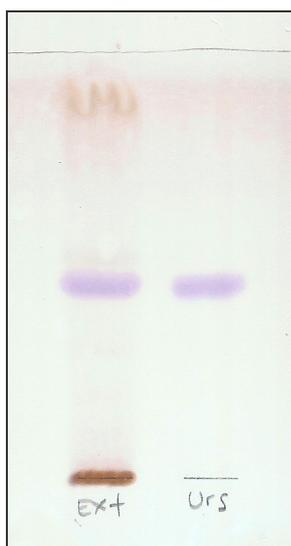


Figura 17: Perfil cromatográfico del extracto acetónico y del testigo de ácido ursólico. Fotografía tomada a la luz visible luego del revelado

- Análisis cuali cuantitativo por HPLC

En el perfil cromatográfico de la muestra se observó la presencia de dos picos coincidentes en tiempo de retención (t_r) y espectro UV con los correspondientes estándares de referencia: ácido ursólico y ácido oleanólico.

Los cromatogramas y los espectros UV se muestran en las **Figuras 18** y **19**, y los espectros UV en la **Figura 20**.

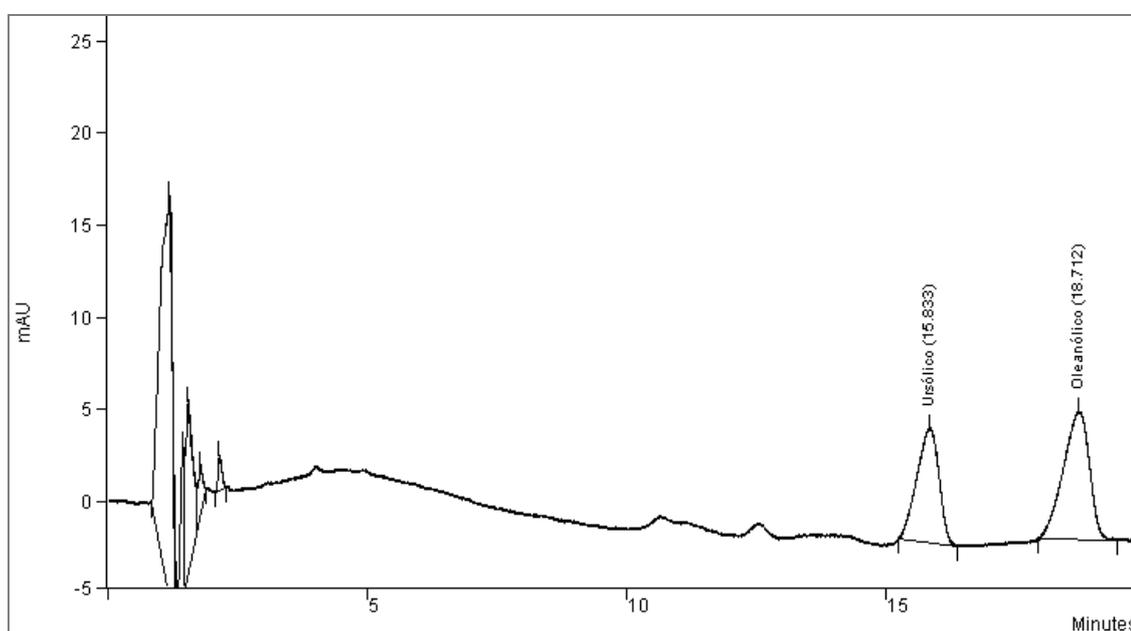


Figura 18: Cromatograma obtenido por HPLC correspondiente a los estándares de referencia (ácido ursólico y ácido oleanólico) (λ de detección: 203 nm)

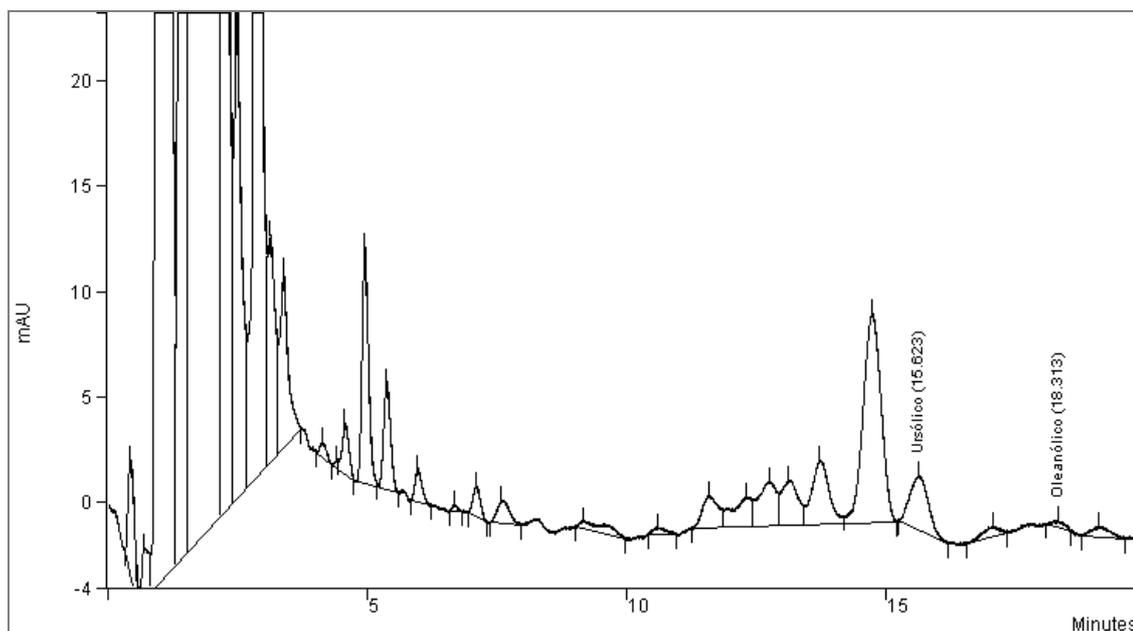


Figura 19: Perfil cromatográfico por HPLC del extracto acetónico (λ de detección: 203 nm)

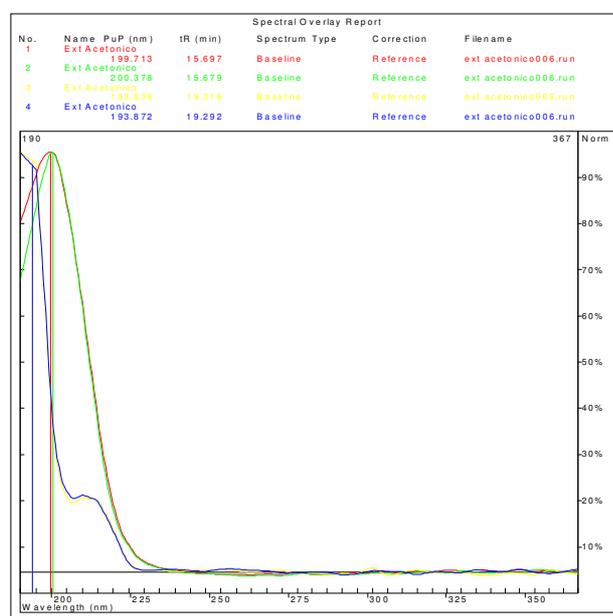


Figura 20: Superposición de los espectros de absorción UV correspondientes al ácido ursólico estándar (rojo), ácido oleanólico estándar (amarillo) y los compuestos identificados en el extracto acetónico (verde y azul)

El rendimiento obtenido para estos compuestos se muestra en la **Tabla 2**.

| <i>Compuesto</i> | <i>% ($\bar{X} \pm SD$)</i> |
|------------------|--|
| Ác. ursólico | 0,042 ± 0,009 |
| Ác. oleanólico | Trazas |

Tabla 2: Rendimientos en ácido ursólico y ácido oleanólico obtenidos por HPLC. Los valores están expresados en % con respecto al fruto seco. Los resultados representan la media \pm SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado. Límite de detección: 0,2 ppm. Límite de cuantificación: 1 ppm. Trazas: <1 ppm

1.1.a.2. Análisis de antocianinas

- Caracterización

El extracto acetónico obtenido a partir de los frutos frescos (Lote 2) en medio ácido (pH 1), presentó una coloración rojiza y a pH 4, ausencia de color. Esta reacción es característica de las antocianinas en sus formas manométricas (Wagner, 1983). La reacción de caracterización de antocianinas en frutos procesados (Lote 1) dio resultado negativo.

- Análisis cuali cuantitativo por espectrofotometría UV - Visible

Los extractos acetónicos fueron procesados según se indica en **Materiales y Métodos (4.1.a.2.)**. El contenido de antocianinas hallado fue **170 ppm**, valor referido con respecto al fruto seco. Los espectros de absorción obtenidos se muestran a continuación en las **Figuras 21 y 22**.

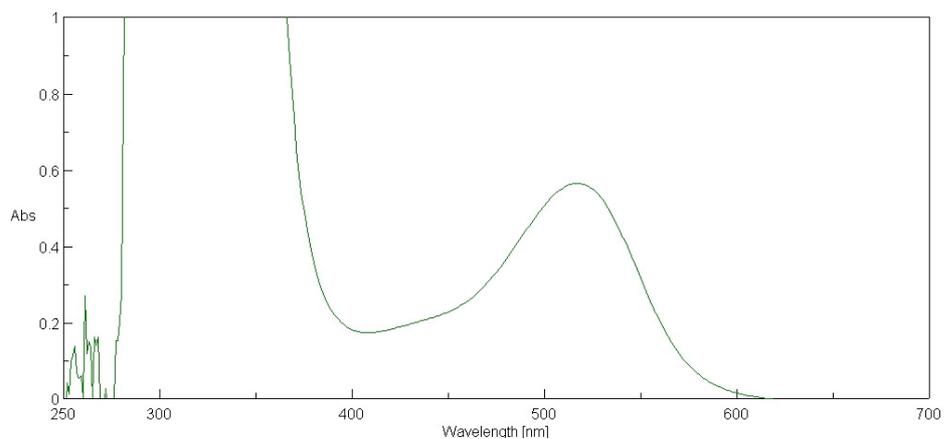


Figura 21: Espectro de absorción (250 – 700 nm) del extracto acetónico a pH 1

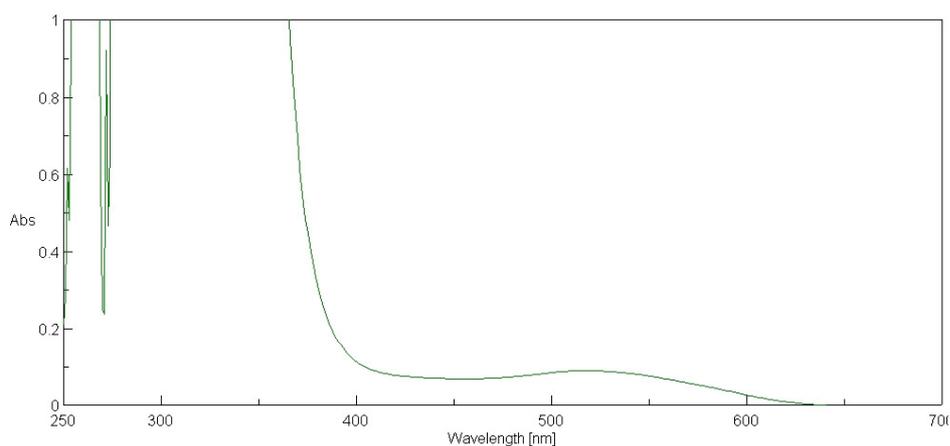


Figura 22: Espectro de absorción (250 – 700 nm) del extracto acetónico a pH 4,5

- Análisis por HPLC: identificación de cianidina 3-glucósido

En el perfil cromatográfico de la muestra se observó la presencia de 3 picos, uno de ellos mayoritario, coincidente en t_r y espectro de absorción en el rango UV – Visible con el estándar de cianidina 3-glucósido (**Figuras 23, 24 y 25**).

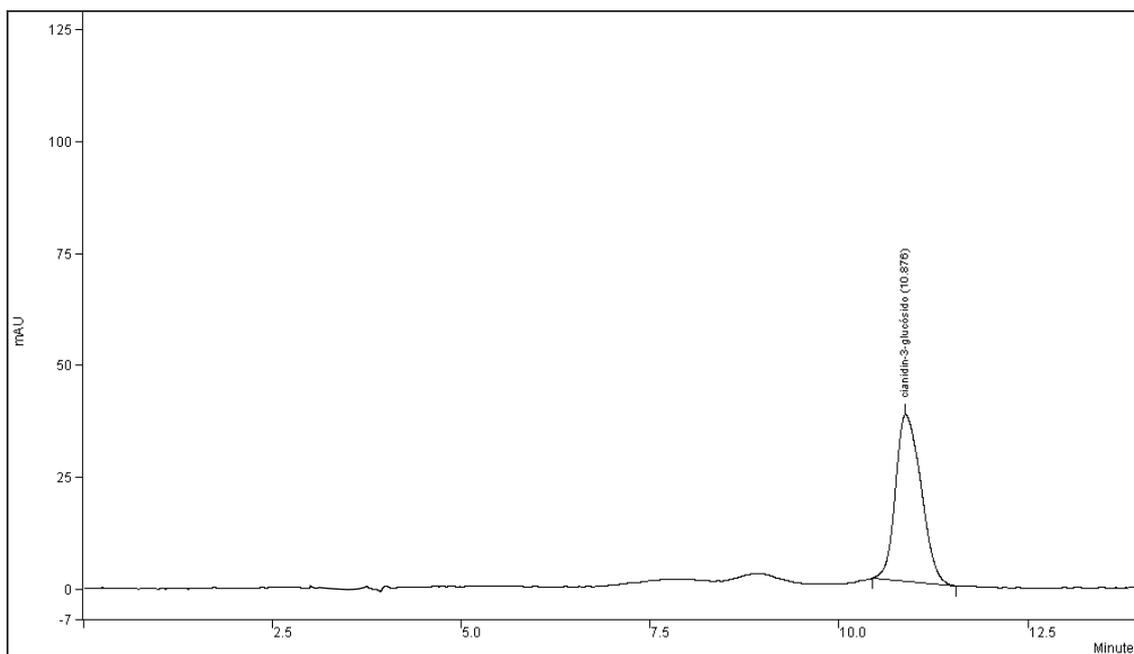


Figura 23: Cromatograma obtenido por HPLC del estándar de cianidina 3-glucósido (λ de detección: 518 nm)

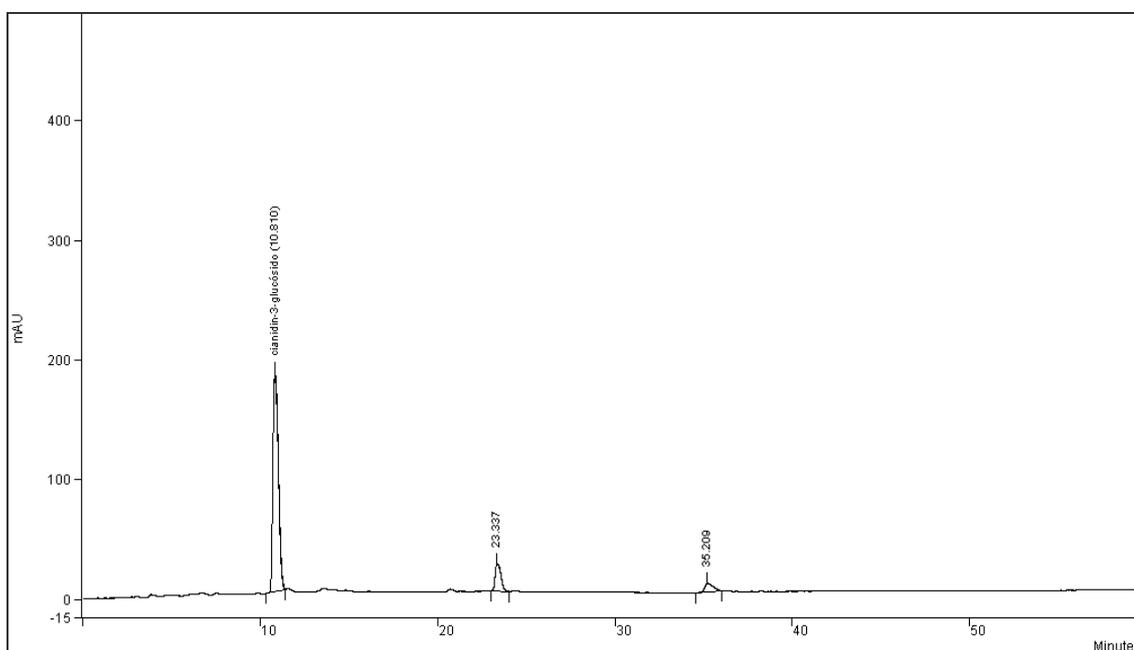


Figura 24: Perfil cromatográfico obtenido por HPLC del extracto acetónico (λ de detección: 518 nm)

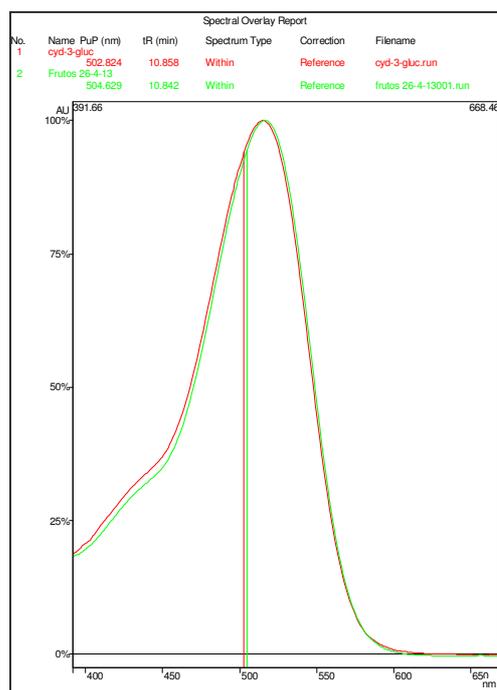


Figura 25: Superposición de los espectros de absorción en la región Visible de la cianidina 3-glucósido estándar (rojo) y del compuesto identificado en el extracto acetónico (verde)

1.1.b. Extractos metanólicos

Los extractos metanólicos fueron obtenidos y procesados según se indica en **Materiales y Métodos (4.1.b.)**. El rendimiento de la fracción metanólica con respecto al fruto fue: $36 \pm 2 \%$.

1.1.b.1. Análisis de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) por HPLC

En el perfil cromatográfico de la muestra, se observó la presencia de numerosos picos, sólo dos de ellos coincidentes en tr y espectro UV con estándares de referencia: cafeína y teobromina. Los cromatogramas obtenidos y los espectros UV se muestran en las **Figuras 26, 27, 28 y 29**.

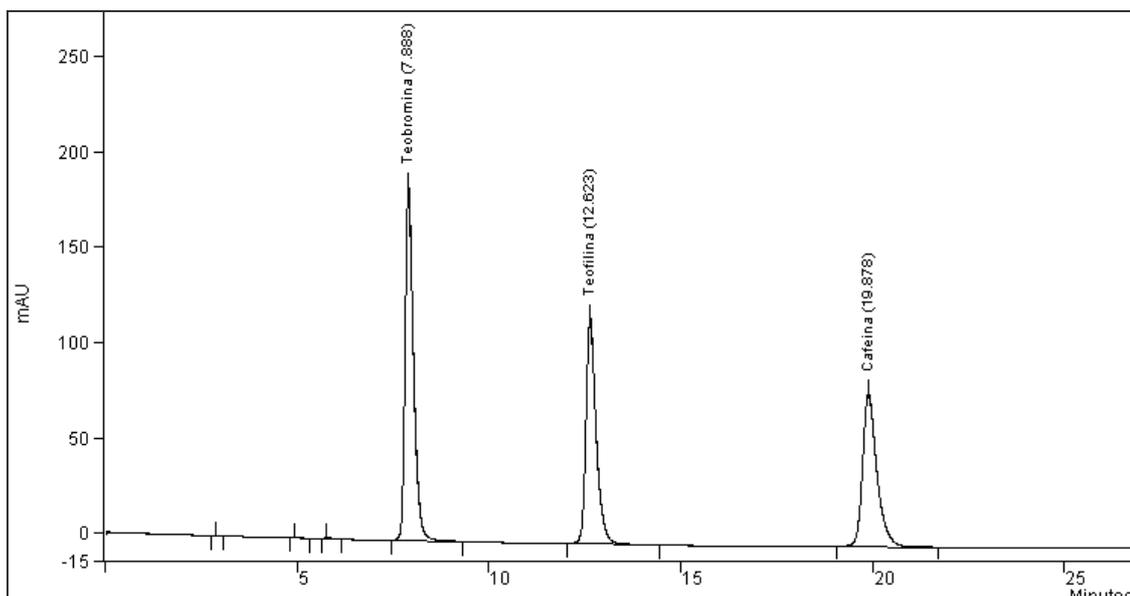


Figura 26: Cromatograma obtenido por HPLC de los estándares de referencia: cafeína, teobromina y teofilina (λ de detección: 273 nm)

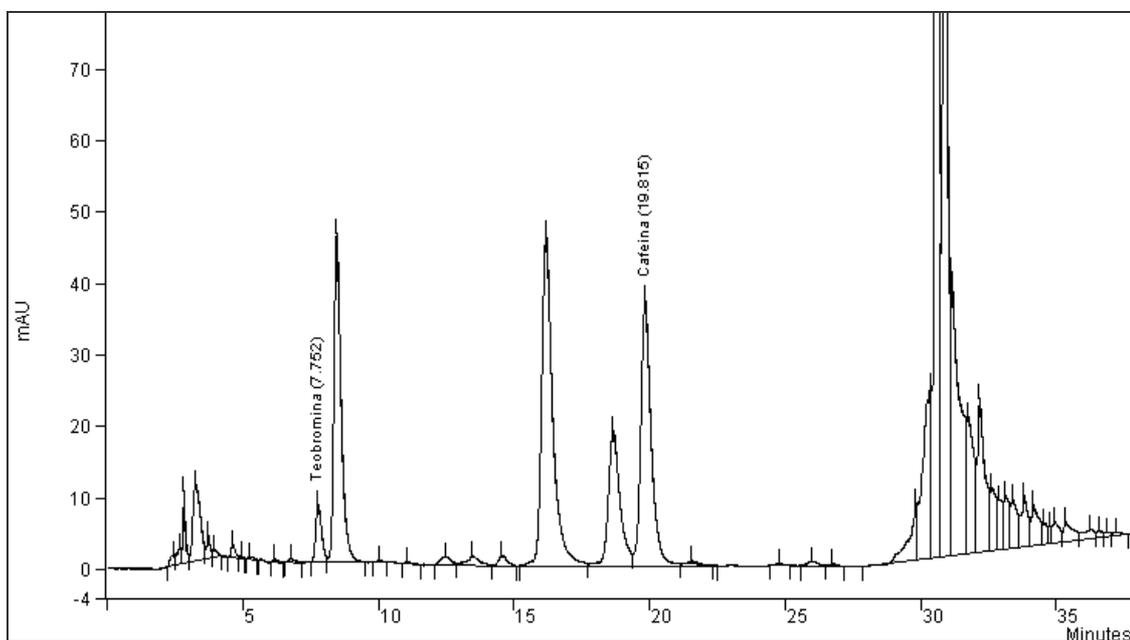


Figura 27: Perfil cromatográfico obtenido por HPLC del extracto metanólico (λ de detección: 273 nm)

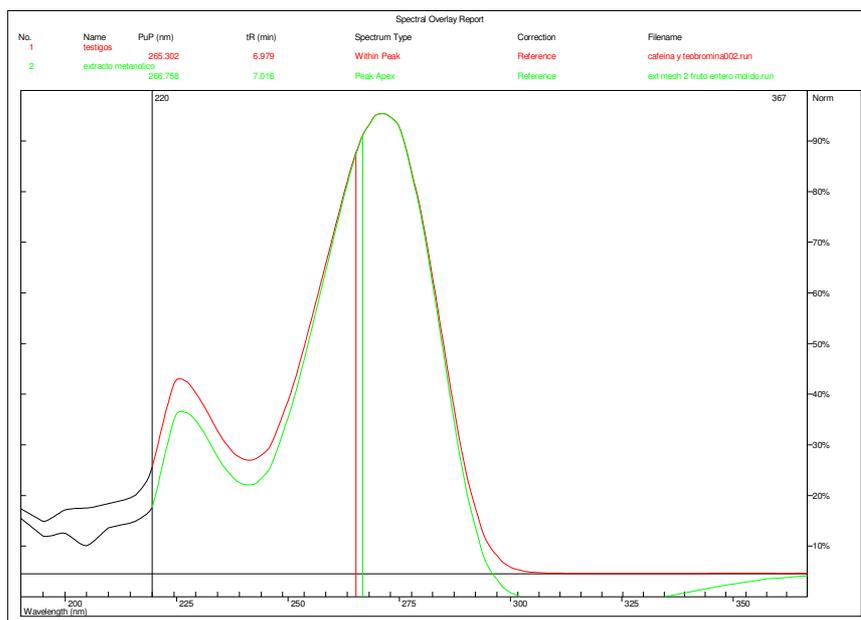


Figura 28: Superposición de los espectros UV de la teobromina estándar (rojo) y de la teobromina identificada en el extracto metanólico (verde)

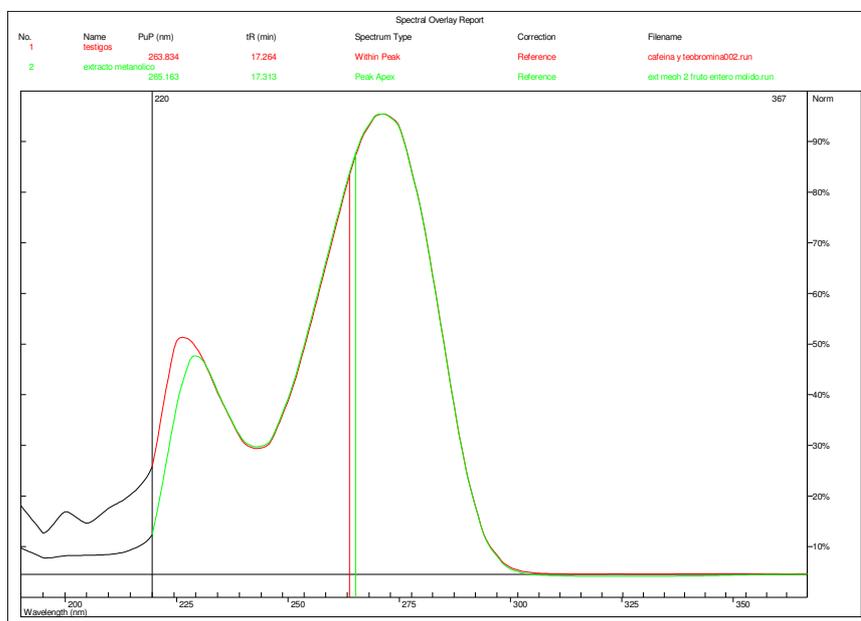


Figura 29: Superposición de los espectros UV de cafeína estándar (rojo) y de la cafeína identificada en el extracto metanólico (verde)

El contenido de cafeína y teobromina se muestra en la **Tabla 3**.

| <i>Compuesto</i> | <i>% ($\bar{X} \pm SD$)</i> |
|------------------|--|
| Cafeína | 0,118 ± 0,001 |
| Teobromina | 0,0125 ± 0,0002 |

Tabla 3: Rendimientos en cafeína y teobromina obtenidos por HPLC en el extracto metanólico. Los valores están expresados en % respecto de los frutos secos. Los resultados representan la media ± SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado. No se detectó teofilina. Límite de detección: 0,2 ppm. Límite de cuantificación: 1 ppm

1.1.b.2. Determinación de polifenoles por HPLC

- Determinación de ácidos cafeilquínicos por HPLC

En el perfil cromatográfico de la muestra se observó la presencia de picos coincidentes en tr y espectro UV con los estándares de referencia de ácido clorogénico, ácido cafeico y rutina. La cinarina fue utilizada como estándar externo a fin de valorar el ácido isoclorogénico (3,4-DCQ; 3,5-DCQ y 4,5-DCQ) presente en la muestra, cuyo orden de elución en este sistema cromatográfico fue determinado previamente por Filip y col. (2001).

Los cromatogramas y espectros UV obtenidos se muestran en las **Figuras 30, 31, 32, 33 y 34**. Los rendimientos obtenidos se muestran en la **Tabla 4**.

- Determinación de flavonoides por HPLC

En el perfil cromatográfico de la muestra se observó la presencia un pico coincidente en tr y espectro UV con el estándar de referencia de rutina. El orden de elución en este sistema cromatográfico fue determinado previamente por Filip y col. (2001).

Los cromatogramas y espectros UV obtenidos se muestran en las **Figuras 35, 36, 37, 38 y 39**. Los rendimientos obtenidos se muestran en la **Tabla 4**.

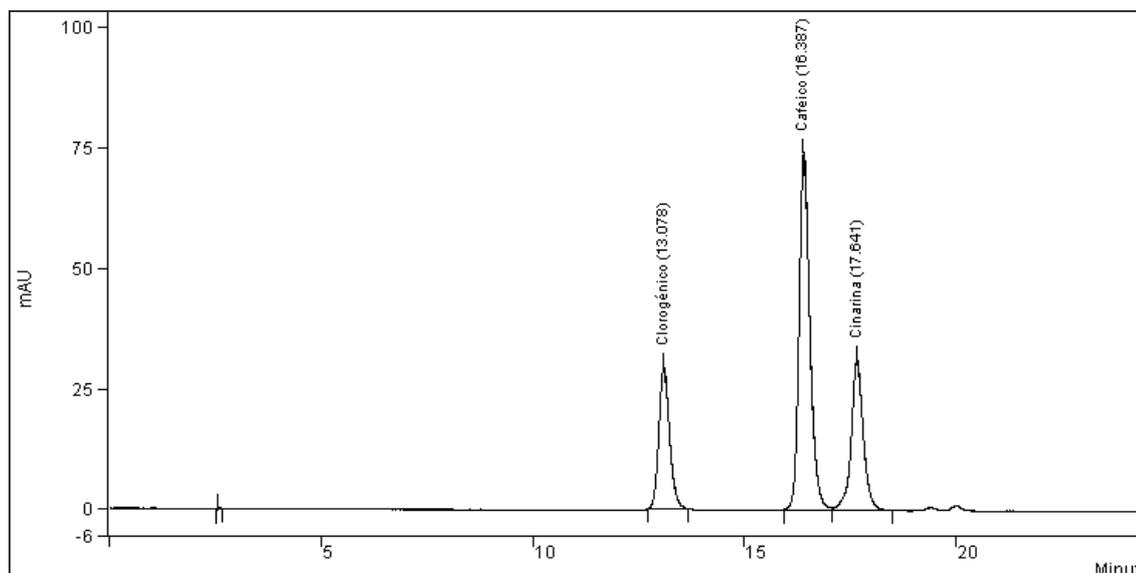


Figura 30: Cromatograma obtenido por HPLC de los estándares: ácido clorogénico, ácido cafeico y cinarina (λ de detección: 325 nm)

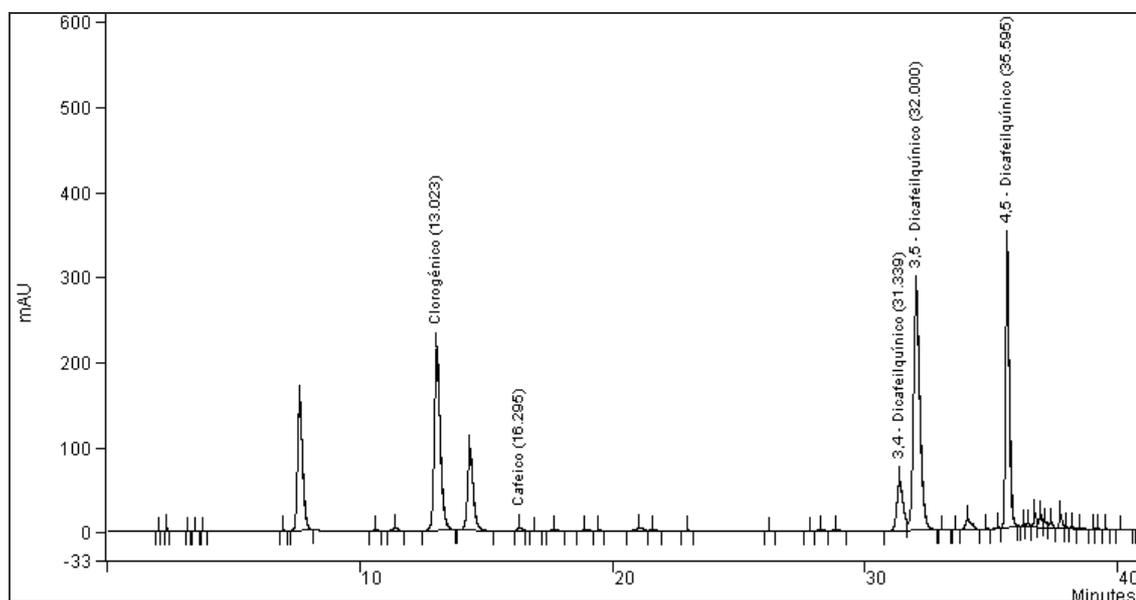


Figura 31: Perfil cromatográfico obtenido por HPLC del extracto metanólico para la determinación de ácidos cafeilquínicos (λ de detección: 325 nm)

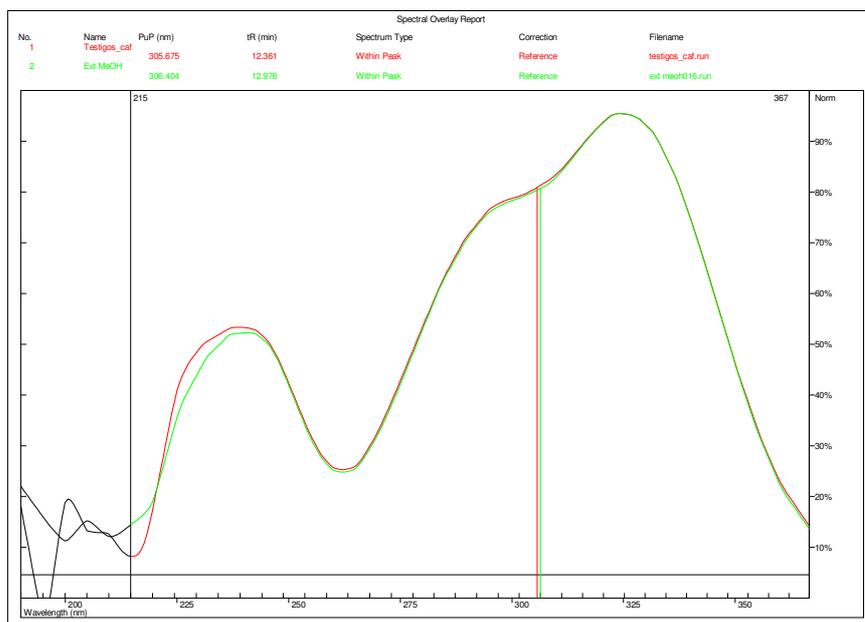


Figura 32: Superposición de los espectros UV del ácido clorogénico estándar (rojo) y del compuesto identificado en el extracto metanólico (verde)

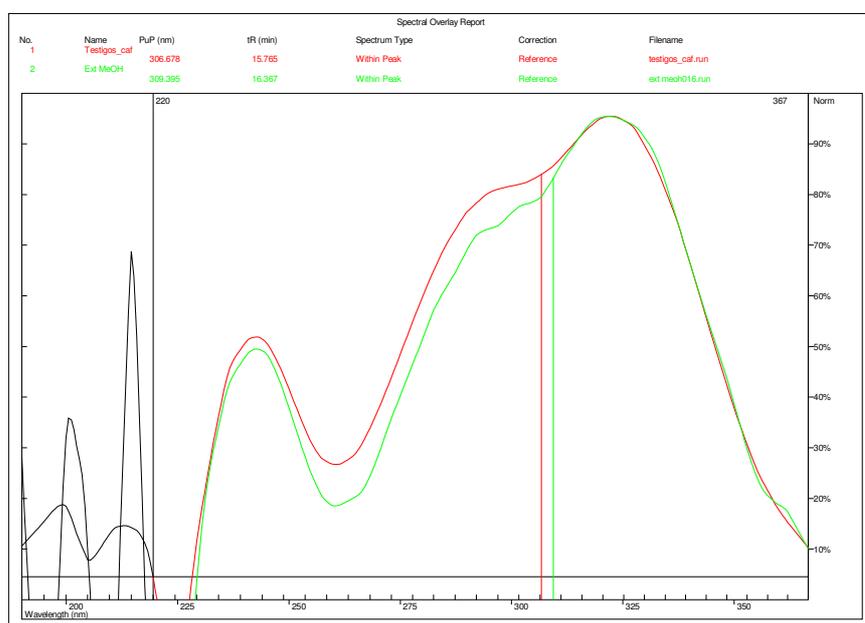


Figura 33: Superposición de los espectros UV del ácido cafeico estándar (rojo) y del compuesto identificado en el extracto metanólico (verde)

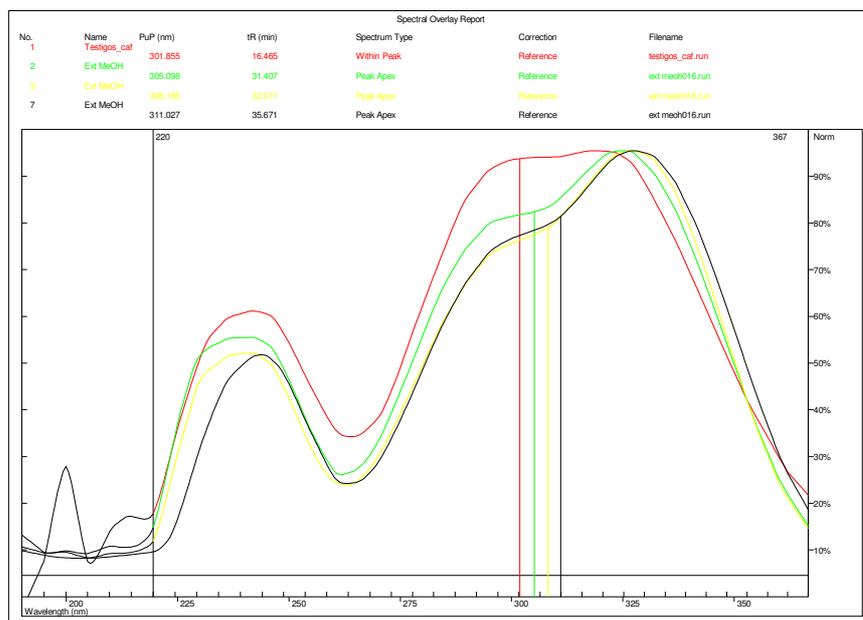


Figura 34: Espectros UV de la cinarina estándar (rojo) y de los ácidos 3,4-DCQ (verde), 3,5-DCQ (amarillo) y 4,5-DCQ (negro) identificados en el extracto metanólico

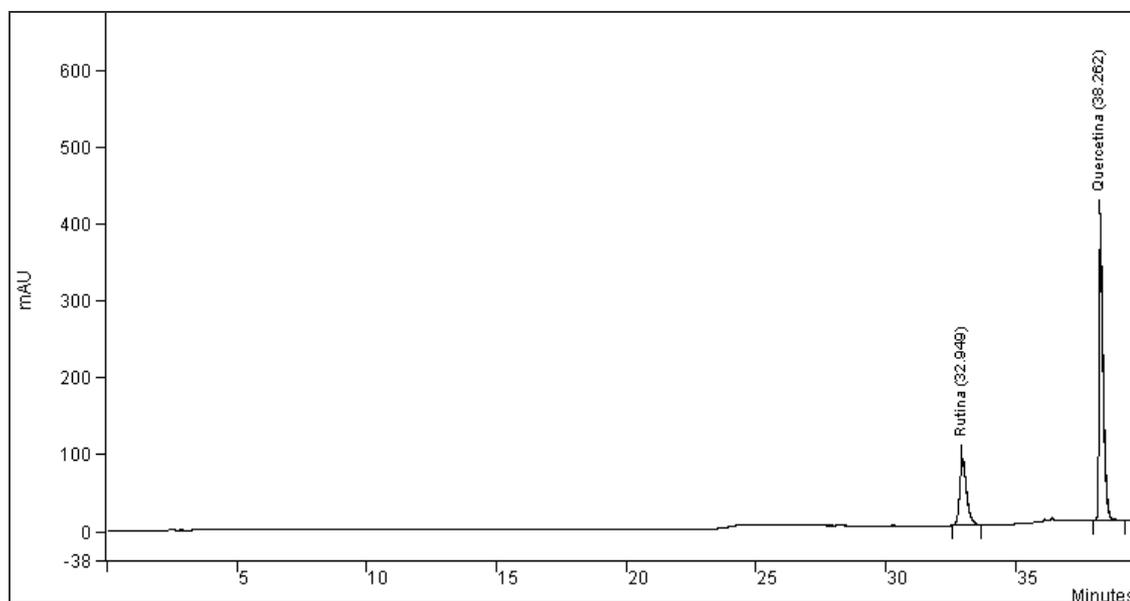


Figura 35: Cromatograma obtenido por HPLC de los estándares: rutina y quercetina (λ de detección: 255 nm)

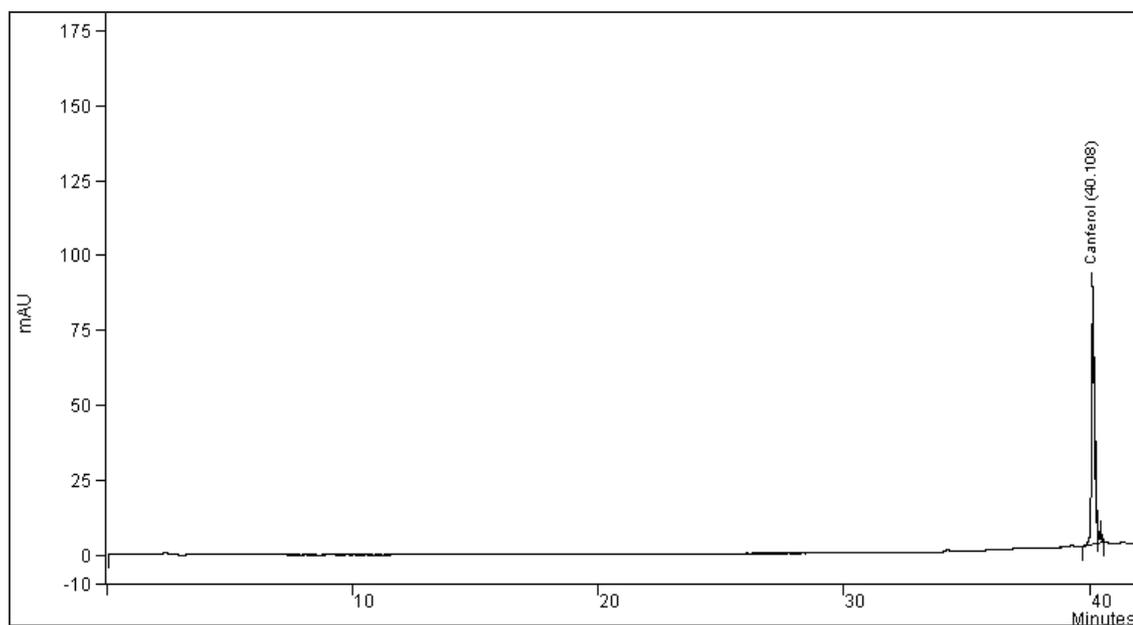


Figura 36: Cromatograma obtenido por HPLC del estándar: canferol (λ de detección: 263 nm)

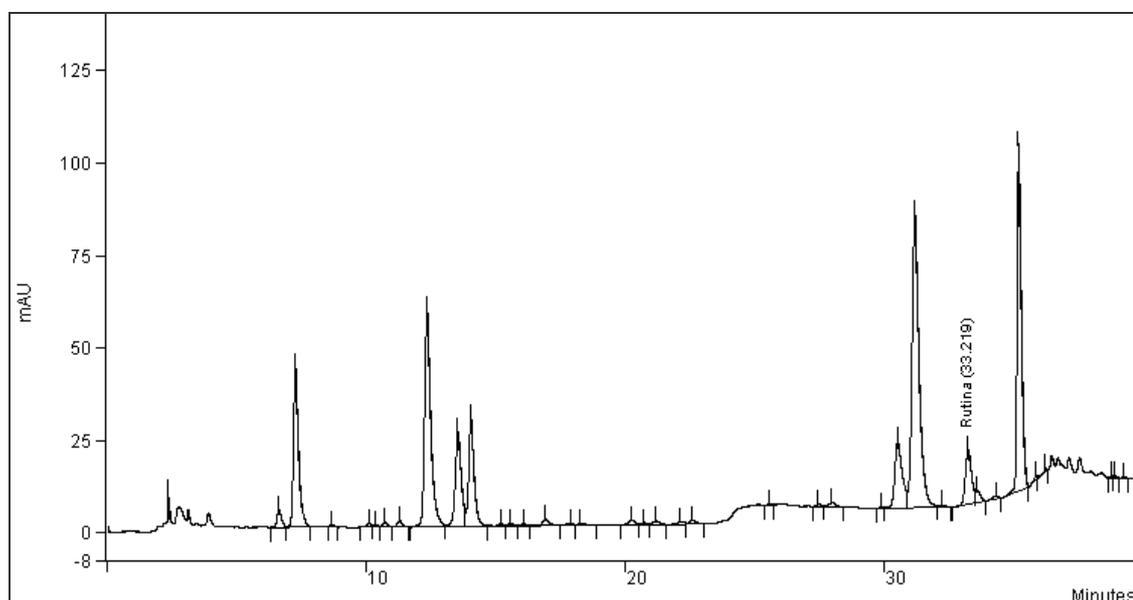


Figura 37: Perfil cromatográfico obtenido por HPLC del extracto metanólico para la determinación de rutina y quercetina (λ de detección: 255 nm)

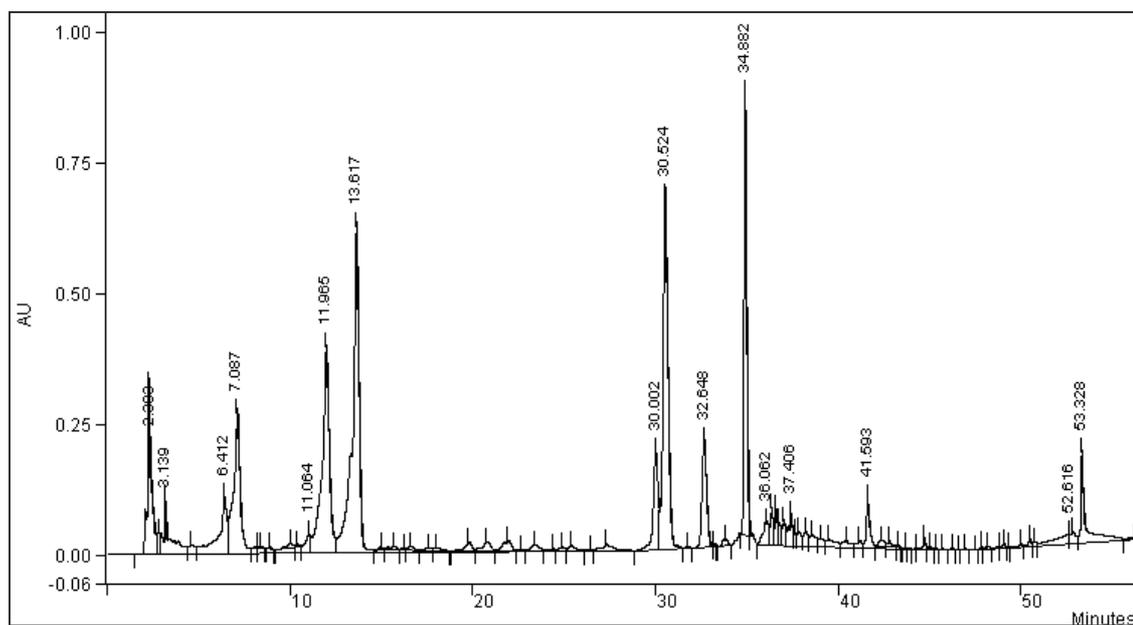


Figura 38: Perfil cromatográfico obtenido por HPLC del extracto metanólico para la determinación de canferol (λ de detección: 263 nm)

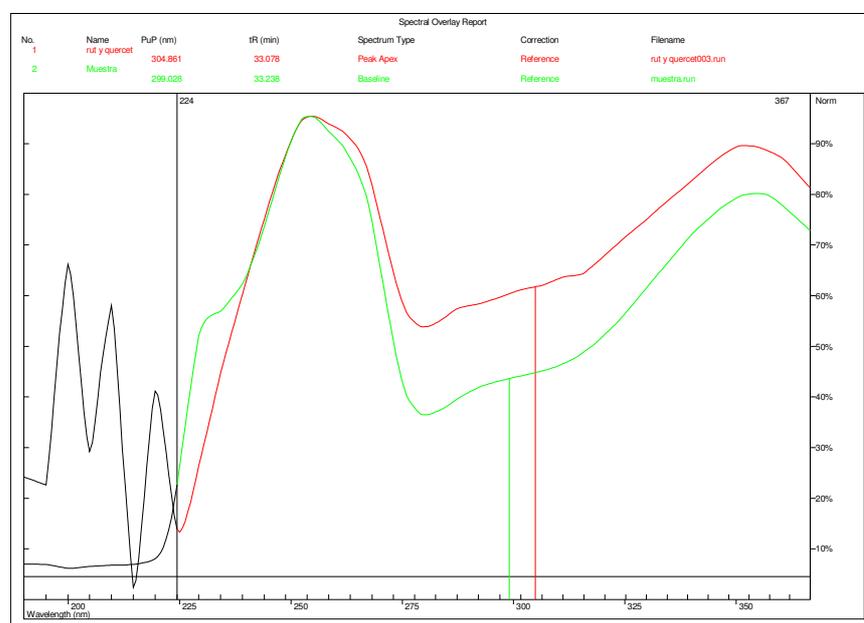


Figura 39: Espectros UV de la rutina estándar (rojo) y de la rutina identificada en el extracto metanólico (verde)

El contenido de ácidos cafeilquínicos y flavonoides se muestra en la **Tabla 4**. Los ácidos 3,4-DCQ, 3,5-DCQ y 4,5-DCQ se expresaron como cinarina (ácido 1,3-dicafeilquínico), único estándar disponible comercialmente.

| <i>Compuesto</i> | <i>% ($\bar{X} \pm SD$)</i> |
|-------------------|--|
| Ácido clorogénico | 0,535 ± 0,006 |
| Ácido cafeico | < 0,005 |
| Cinarina | ND |
| Ác. 3,4-DCQ | 0,124 ± 0,001 |
| Ác. 3,5- DCQ | 0,607 ± 0,004 |
| Ác. 4,5- DCQ | 0,399 ± 0,003 |
| Rutina | 0,037 ± 0,004 |
| Quercetina | ND |
| Canferol | ND |

Tabla 4: Rendimientos en ácidos cafeilquínicos y flavonoides obtenidos por HPLC en el extracto metanólico. Los resultados representan la media ± SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado y están referidos a los frutos. Los ácidos 3,4-DCQ; 3,5-DCQ y 4,5-DCQ se expresaron como cinarina. Límite de detección: 0,2 ppm. Límite de cuantificación: 1 ppm. ND: no detectado

1.1.b.3. Determinación de polifenoles totales por espectrofotometría UV - Visible

La curva de calibración obtenida con el estándar de ácido gálico, mostró una respuesta lineal en el rango de concentraciones ensayado (10 – 50 µg/ml). La ecuación de la recta fue: $y = 0,0117 x - 0,0258$.

Donde:

y = Absorbancia y x = Concentración expresada en µg/ml.

Coefficiente de correlación lineal (R^2): 0,9988.

El contenido de polifenoles totales fue: **4,0 ± 0,1 %** (equivalentes de ácido gálico) con respecto al extracto.

1.1.c. Extractos acuosos

Los extractos acuosos fueron procesados y analizados según se indica en **Materiales y Métodos (4.1.c.)**. El rendimiento de la fracción obtenida fue: 21 ± 4 % (valor referido al fruto seco).

1.1.c.1. Determinación de saponinas totales por HPLC

La identificación y cuantificación de los compuestos en el extracto se realizó por comparación de los tiempos de retención y de los espectros UV obtenidos con el estándar de referencia: ácido ursólico.

En el perfil cromatográfico de la muestra se observaron 4 picos, uno de los cuales (pico 4) fue coincidente en tiempo de retención y espectro UV con el estándar de ácido ursólico. Los espectros UV de los picos 1 y 3 coincidieron también con el espectro UV del estándar (**Figuras 40, 41 y 42**).

Tal como puede observarse en la **Figura 43**, el espectro UV del pico 2 presentó un máximo de absorción a 225 nm.

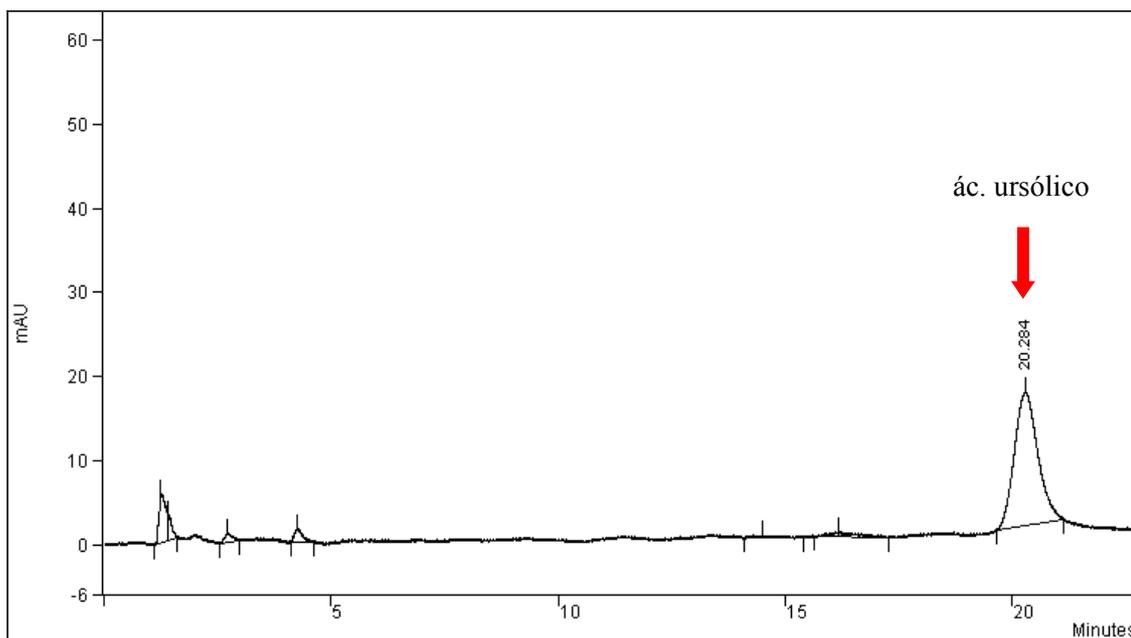


Figura 40: Cromatograma obtenido por HPLC del estándar de referencia: ácido ursólico (λ de detección: 203 nm)

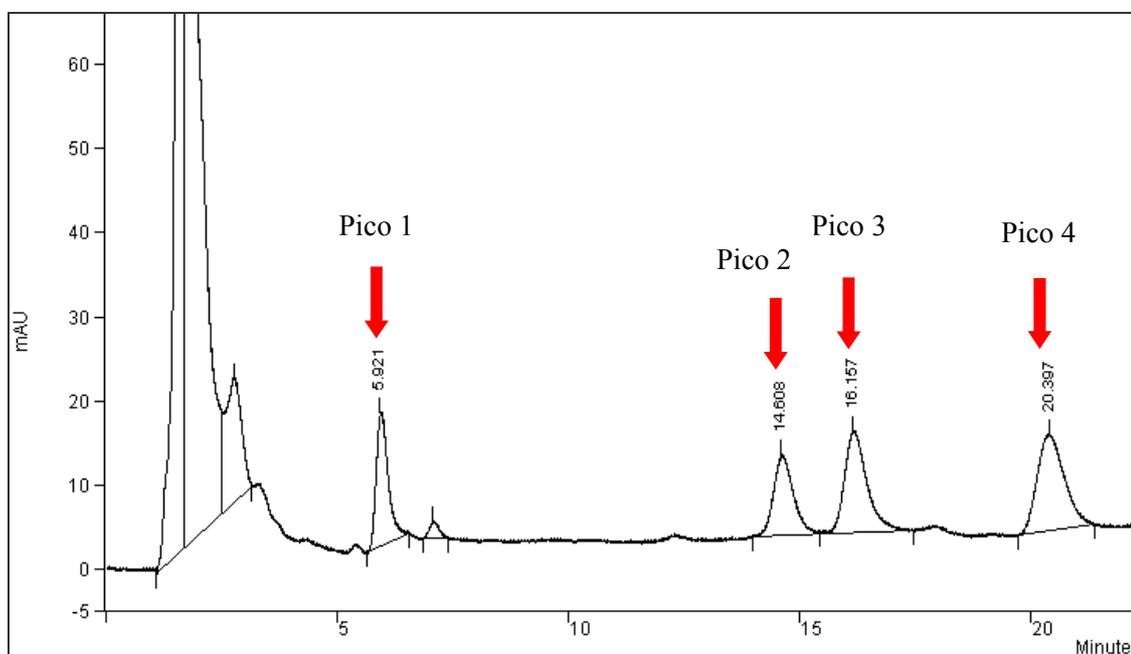


Figura 41: Perfil cromatográfico obtenido por HPLC del extracto acuoso (λ de detección: 203 nm)

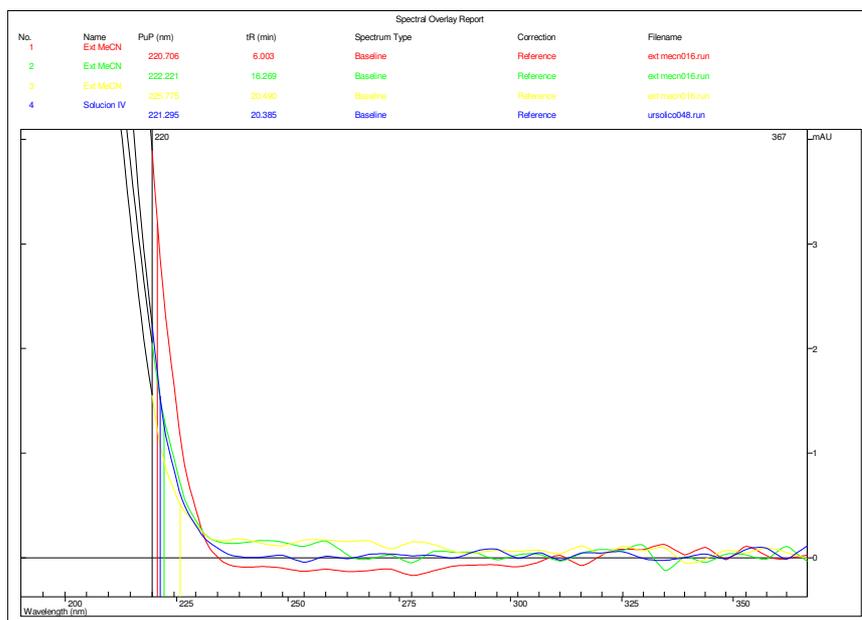


Figura 42: Superposición de los espectros UV del ácido ursólico estándar (azul) y de los picos 1 (rojo), 3 (verde) y 4 (amarillo) presentes en el extracto acuoso (λ max < 203 nm)

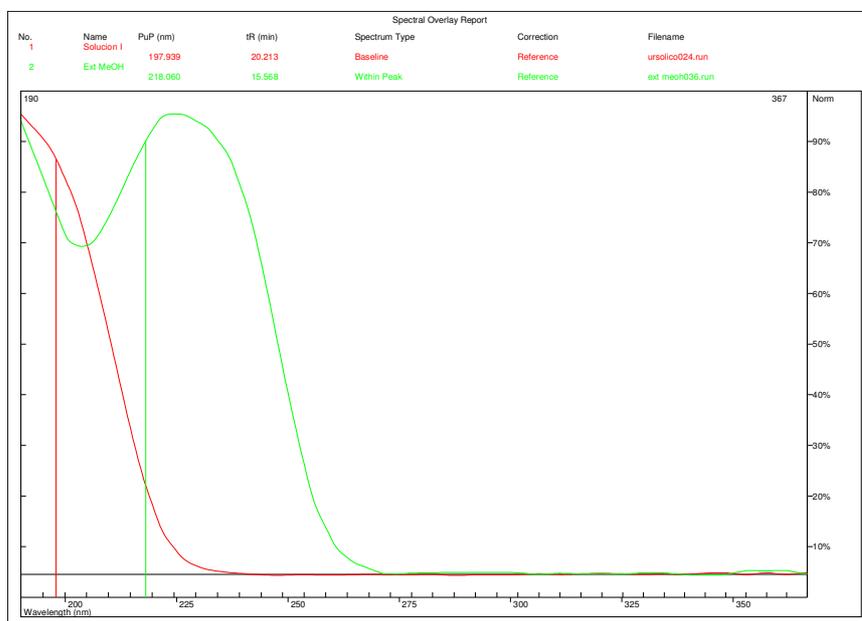


Figura 43: Superposición de los espectros UV del ácido ursólico estándar (rojo) y del pico 2 presente en el extracto acuoso (verde)

El contenido de sapogeninas expresadas como ácido ursólico se muestra en la **Tabla 5**.

| <i>Sapogenina</i> | % ($\bar{X} \pm SD$) |
|-------------------|------------------------|
| Pico 1 | 0,179 \pm 0,001 |
| Pico 2 | 0,180 \pm 0,001 |
| Pico 3 | 0,265 \pm 0,003 |
| Pico 4 | 0,297 \pm 0,001 |

Tabla 5: Rendimiento en sapogeninas obtenido por HPLC. Los resultados representan la media \pm SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado y están referidos a los frutos secos. Límite de detección: 0,2 ppm. Límite de cuantificación: 1 ppm. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido ursólico

1.1.c.2. Determinación de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) por HPLC

La identificación y cuantificación de los compuestos en los extractos analizados se realizó por comparación de los tiempos de retención y de los espectros UV obtenidos con los estándares de referencia: teobromina, teofilina y cafeína. Los cromatogramas y los espectros de absorción obtenidos son semejantes a los obtenidos en el extracto metanólico (**1.2.a.**).

Los rendimientos de los distintos compuestos se muestran en la **Tabla 6**.

| Compuesto | % ($\bar{X} \pm SD$) |
|------------|------------------------|
| Cafeína | 0,106 \pm 0,002 |
| Teobromina | 0,0108 \pm 0,0003 |

Tabla 6: Rendimientos en cafeína y teobromina obtenidos por HPLC en el extracto acuoso. Los valores están expresados en %. Los resultados representan la media \pm SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado y están referidos a los frutos secos. No se detectó teofilina. Límite de detección: 0,2 ppm. Límite de cuantificación: 1 ppm

1.1.c.3. Determinación de polifenoles por HPLC

La identificación y cuantificación de los compuestos en los extractos analizados se realizó por comparación de los tiempos de retención y de los espectros UV obtenidos con los estándares de referencia: ácido clorogénico, ácido cafeico y cinarina. Los cromatogramas y espectros de absorción obtenidos son semejantes a los obtenidos con el extracto metanólico (1.2.b.).

- Determinación de ácidos cafeilquínicos y flavonoides

Los rendimientos de los distintos compuestos se muestran en la **Tabla 7**.

| Compuesto | % ($\bar{X} \pm SD$) |
|---------------------------|------------------------|
| Ácido clorogénico | 0,440 \pm 0,006 |
| Ácido cafeico | < 0,005 |
| Cinarina | ND |
| Ácido 3,4-dicafeilquínico | 0,200 \pm 0,005 |
| Ácido 3,5-dicafeilquínico | 0,300 \pm 0,001 |
| Ácido 4,5-dicafeilquínico | 0,430 \pm 0,002 |
| Rutina | 0,037 \pm 0,004 |
| Quercetina | ND |
| Canferol | ND |

Tabla 7: Rendimientos en polifenoles obtenidos por HPLC en el extracto acuoso. Los valores están expresados en % respecto de los frutos. Los resultados representan la media \pm SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado. Límite de detección: 0,2 ppm. Límite de cuantificación: 1 ppm. ND: no detectado

11.c.4. Determinación de polifenoles totales por espectrofotometría UV - Visible

La curva de calibración obtenida con el ácido gálico estándar mostró una respuesta lineal en el rango de concentraciones ensayado (10 – 50 µg/ml). La ecuación de la recta fue: $y = 0,0134 x - 0,0625$.

Donde:

y = Absorbancia, x = Concentración en µg/ml.

Coefficiente de correlación lineal (R^2): 0,9912.

El contenido de polifenoles totales fue: **8,3 ± 0,4 %** (equivalentes de ácido gálico) con respecto al extracto.

1.2. Estudio de las propiedades nutricionales

1.2.a. Determinación de ácidos grasos

La determinación de ácidos grasos se realizó a partir de los extractos hexánicos obtenidos según se indica en **Materiales y Métodos (4.2.a.)**. El rendimiento de la fracción obtenida fue: **2,7 %** referido a los frutos secos.

La composición cuali-cuantitativa (porcentual relativo) de ácidos grasos se muestra en la **Tabla 8 y Figura 44**.

| <i>Ácido</i> | <i>Tiempo de retención (minutos)</i> | <i>Composición relativa porcentual</i> |
|---|--|--|
| Caproico (C 6:0) | 9,296 | 2,12 ± 0,16 |
| Caprílico (C 8:0) | 9,798 | 0,68 ± 0,07 |
| Mirístico (C 14:0) | 13,525 | 0,14 ± 0,01 |
| Palmítico (C 16:0) | 15,659 | 30,57 ± 0,79 |
| Palmitoleico (C 16:1) | 16,592 | 0,38 ± 0,01 |
| Margárico (C 17:0) | 16,847 | 0,99 ± 0,15 |
| Estearico (C 18:0) | 18,256 | 12,28 ± 0,19 |
| Trans – elaidico (C 18:1) | 18,964 | 0,73 ± 0,23 |
| Oleico (C 18:1) | 19,328 | 38,74 ± 0,75 |
| Cis – octadecanoico (C 18:1) | 19,439 | 0,65 ± 0,03 |
| Trans – linoleico (C 18:2) | 20,147 | 2,21 ± 0,11 |
| Linoleico (C 18:2) | 20,974 | 1,83 ± 0,01 |
| Araquídico (C 20:0) | 21,508 | 0,76 ± 0,01 |
| Gadoleico (C 20:1) | 22,833 | 0,24 ± 0,01 |
| Behénico (C 22:0) | 25,872 | 0,17 ± 0,01 |
| Lignocérico (C 24:0) | 32,108 | 0,15 ± 0,03 |
| Total saturados | | 47,86 |
| Total monoinsaturados | | 40,01 |
| Total poliinsaturados | | 1,83 |
| Ácidos grasos trans | | 2,94 |
| Compuestos minoritarios no identificados | | 7,36 |

Tabla 8: Composición relativa porcentual de los metil ésteres de ácidos grasos (FAME). Los resultados fueron obtenidos por GC y representan la media ± ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

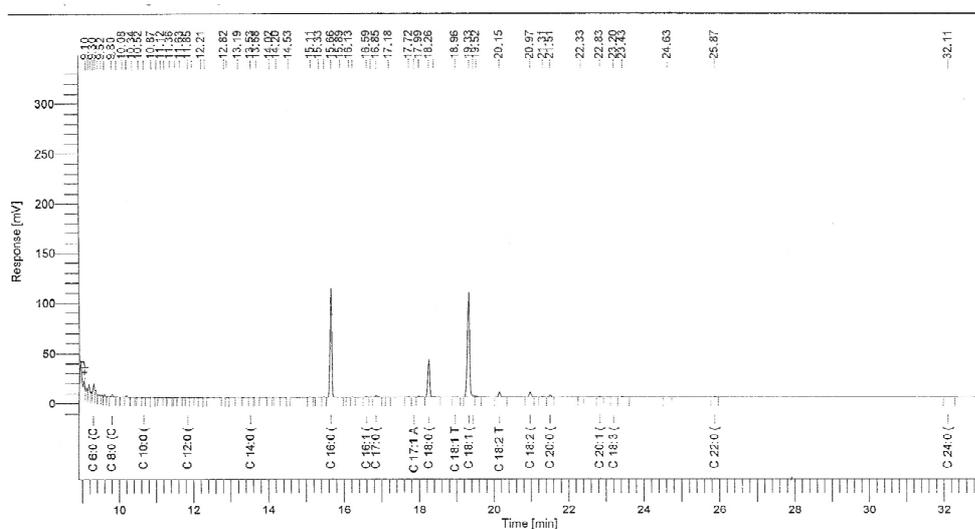


Figura 44: Cromatograma obtenido por GC del extracto hexánico para la determinación de ácidos grasos.

1.2.b. Determinación de minerales

La muestra fue procesada tal como se indica en **Materiales y Métodos (4.2.b.)**. Los resultados obtenidos se indican en la **Tabla 9**.

| <i>Elemento</i> | <i>mg/100g de materia seca</i> |
|-----------------|--------------------------------|
| Sodio | 1,3 ± 0,1 |
| Potasio | 1324 ± 15 |
| Hierro | 6,4 ± 0,5 |
| Cobre | 1,1 ± 0,1 |
| Zinc | 2,3 ± 0,3 |
| Calcio | 150 ± 12 |
| Magnesio | 168 ± 15 |

Tabla 9: Contenido de minerales. Los resultados representan la media ± ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado

1.2.c. Composición centesimal

La composición centesimal se determinó según se indica en **Materiales y Métodos (4.2.c.)**. Los resultados se muestran en la **Tabla 10**.

| <i>Componente</i> | <i>% ($\bar{X} \pm ESM$)</i> |
|----------------------|---|
| Humedad | 5,9 ± 0,1 |
| Cenizas | 3,8 ± 0,2 |
| Lípidos | 4,5 ± 0,3 |
| Proteínas (Nx6,25) | 5,5 ± 0,1 |
| Hidratos de Carbono | 38,3 ± 1,2 |
| Fibra dietaria total | 42,0 ± 1,6 |
| Fibra insoluble | 37,6 ± 1,3 |
| Fibra soluble | 4,4 ± 0,3 |

Tabla 10: Composición centesimal. Los resultados representan la media ± ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado y están referidos a los frutos secos. El contenido de fibra fue corregido por proteínas y cenizas. Los carbohidratos se determinaron según la siguiente fórmula: 100 – (% humedad + % cenizas + % lípidos + % proteínas + % fibra dietaria total).

2. PARTE II: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS

Los estudios farmacológicos fueron realizados con los extractos metanólicos y acuosos procesados según se indica en **Materiales y Métodos (4.1.b y 4.1.c)**. La actividad de los extractos fue comparada frente al ácido clorogénico, uno de los principios activos mayoritarios presentes. El rango de concentración del ácido clorogénico ensayado, fue determinado a partir del rango de concentraciones de este compuesto en los extractos.

2.1. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

2.1.a. Actividad frente al radical libre ABTS

La capacidad eliminadora del radical libre ABTS, en función de la concentración, de los extractos acuosos y metanólicos y del ácido clorogénico, se muestra en la **Figura 45**.

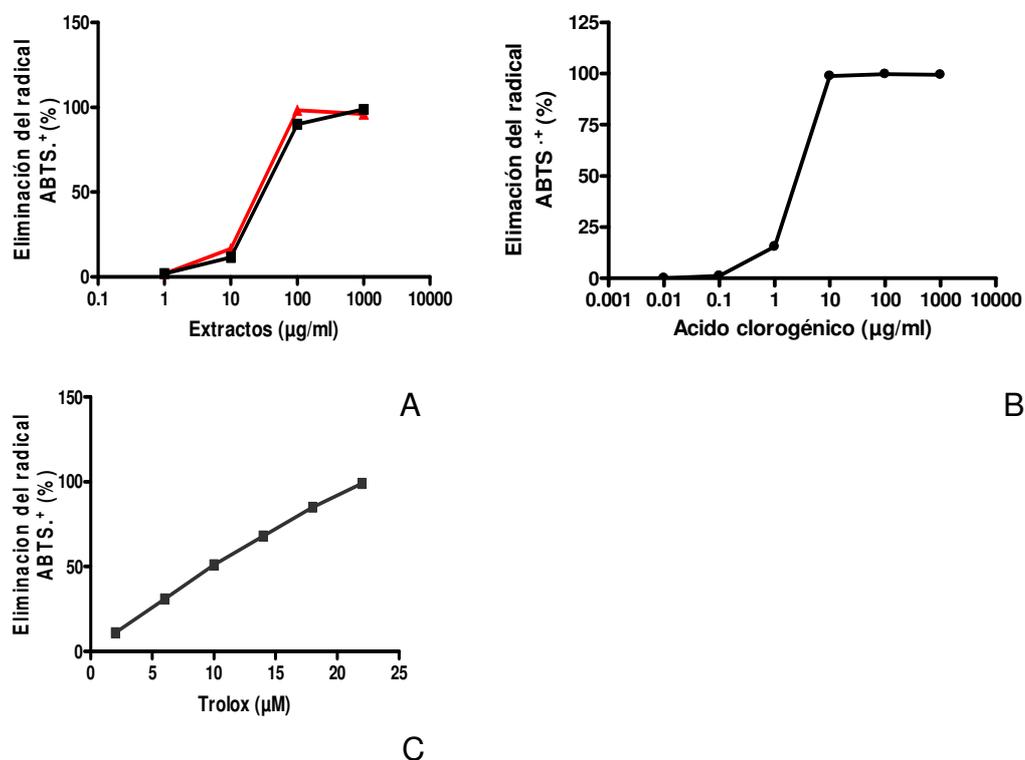


Figura 45: Actividad eliminadora del radical libre ABTS de los extractos acuosos y metanólicos (A) (rojo: extractos acuosos, negro: extractos metanólicos) y del ácido clorogénico (B). Curva dosis respuesta de Trolox[®], antioxidante de referencia (C). Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado.

Los valores de CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) obtenidos para los extractos fueron los siguientes:

Extracto acuoso: $25,7 \pm 2$

Extracto metanólico: $30,9 \pm 3$

2.1.b. Actividad frente al radical libre DPPH

La capacidad eliminadora del radical libre DPPH, en función de la concentración de los extractos acuosos y metanólicos, y del ácido clorogénico se muestra en la **Figura 46**.

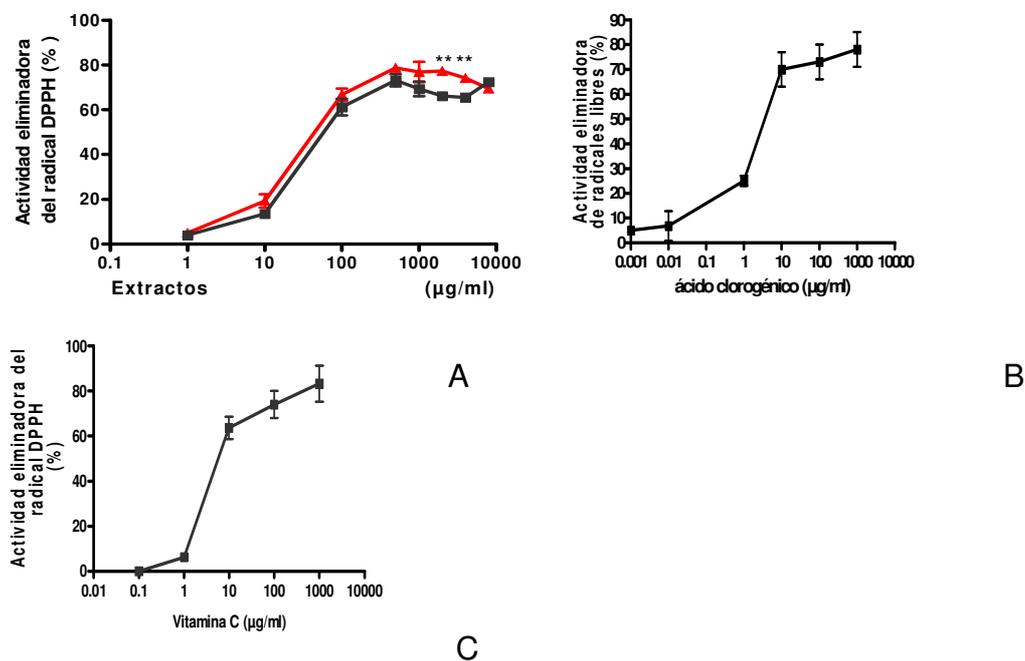


Figura 46: Actividad eliminadora del radical libre DPPH de los extractos acuosos y metanólicos (A) (rojo: extractos acuosos, negro: extractos metanólicos) y del ácido clorogénico (B). Curva dosis respuesta de la vitamina C, antioxidante de referencia (C). Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado. $**p < 0,01$, diferencias significativas entre los extractos de acuerdo con prueba T de Student.

Los valores de CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) obtenidos para los extractos fueron los siguientes:

Extracto acuoso: $30,0 \pm 3$

Extracto metanólico: $39,0 \pm 3$

2.1.c. Actividad inhibidora de la peroxidación lipídica. Ensayo del FTC

La actividad inhibidora de la peroxidación lipídica, en función de la concentración de los extractos acuosos y metanólicos y del ácido clorogénico, se muestra en la **Figura 47**.

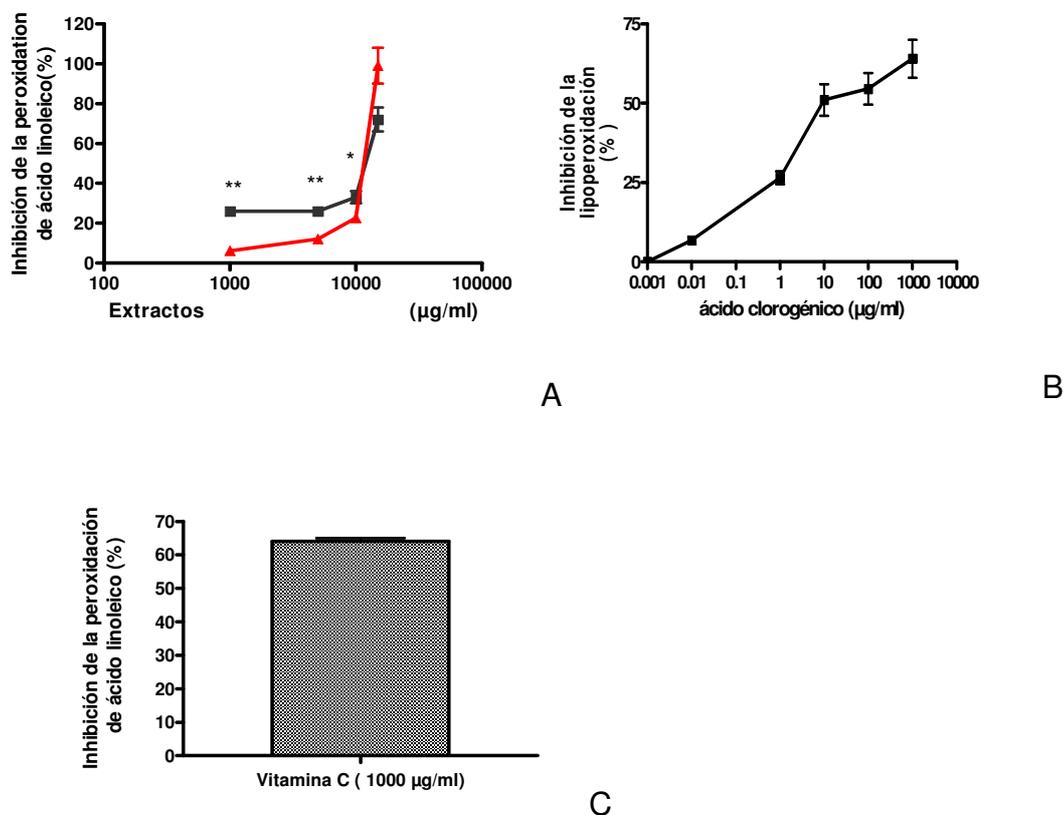


Figura 47: Actividad inhibidora de la peroxidación lipídica de los extractos acuosos y metanólicos (A) (rojo: extractos acuosos, negro: extractos metanólicos), del ácido clorogénico (B) y de la vitamina C (C). Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, diferencias significativas entre los extractos de acuerdo con prueba T de Student.

Los valores de CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) obtenidos para los extractos fueron los siguientes:

Extracto acuoso: **7900 ± 500**

Extracto metanólico: **10327 ± 1000**

2.1.d. Actividad simil enzimática

- Actividad catalasa

La actividad de tipo catalasa de los extractos acuosos y metanólicos y del ácido clorogénico en función de la concentración, se muestra en la **Figura 48**.

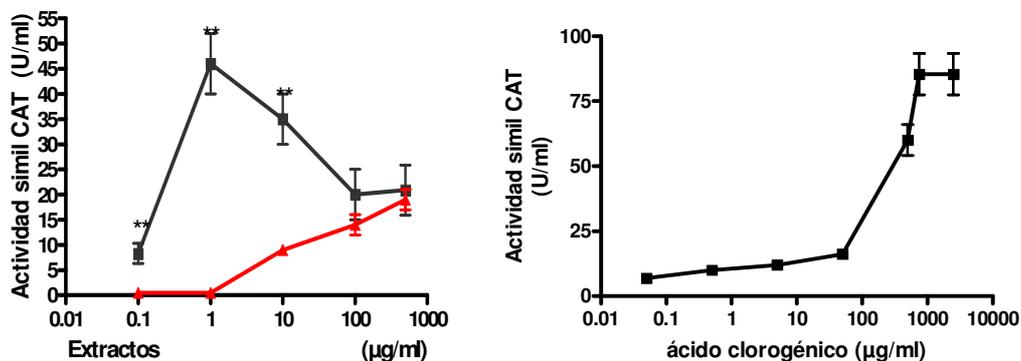


Figura 48: Actividad catalasa de los extractos acuosos y metanólicos (rojo: extractos acuosos, negro: extractos metanólicos) y del ácido clorogénico. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado. $**p < 0,01$, diferencias significativas entre los extractos de acuerdo con prueba T de Student.

- Actividad peroxidasa

La actividad de tipo peroxidasa de los extractos acuosos y metanólicos y del ácido clorogénico en función de la concentración, se muestra en la **Figura 49**.

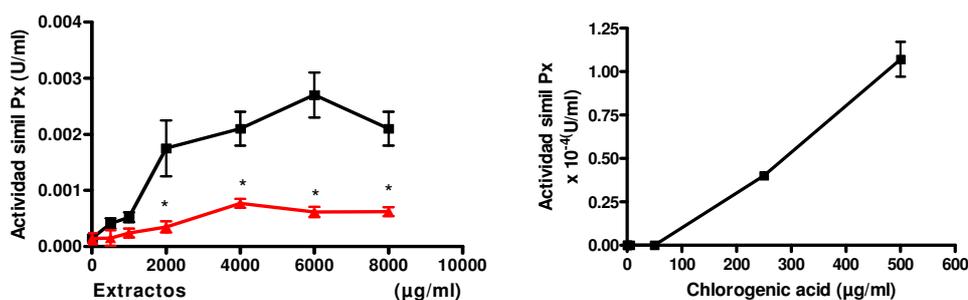


Figura 49: Actividad peroxidasa de los extractos acuosos y metanólicos (rojo: extractos acuosos, negro: extractos metanólicos), y del ácido clorogénico. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado. $*p < 0,05$, diferencias significativas entre los extractos de acuerdo con prueba T de Student.

- Actividad superóxido dismutasa

La actividad de tipo superóxido dismutasa de los extractos acuosos y metanólicos en función de la concentración, se muestra en la **Figura 50**.

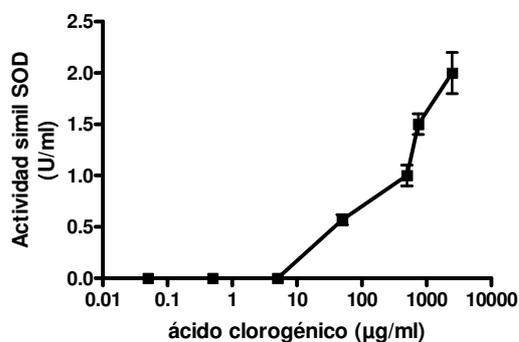
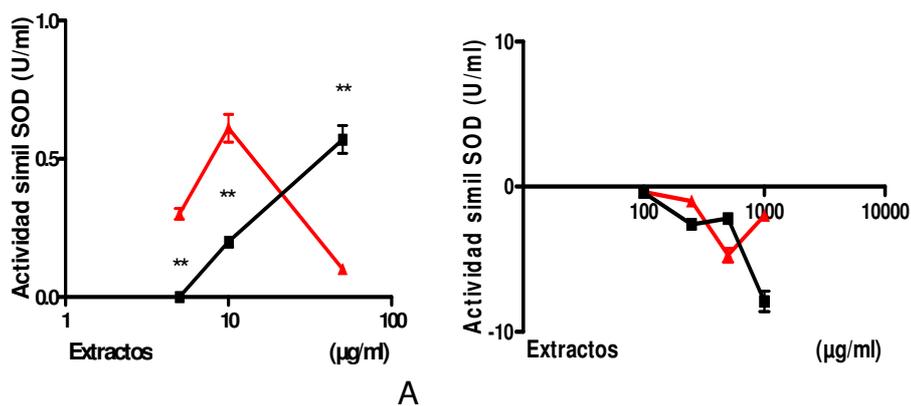


Figura 50: Actividad superóxido dismutasa de los extractos metanólicos y acuosos a bajas (A) y altas (B) concentraciones (rojo: extractos acuosos, negro: extractos metanólicos), y del ácido clorogénico. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado. $**p < 0,01$, diferencias significativas entre los extractos de acuerdo con prueba T de Student.

2.2. Evaluación de la actividad antioxidante en glándulas submandibulares

2.2.a. Análisis de las glándulas submandibulares provenientes de animales control y de animales tratados con estreptozotocina

Se realizó la evaluación de parámetros generales y de estrés oxidativo previo a los distintos tratamientos, en las glándulas control y en las tratadas con estreptozotocina. Los valores de peso, proteínas y lipoperoxidación se muestran en la **Figura 51**.

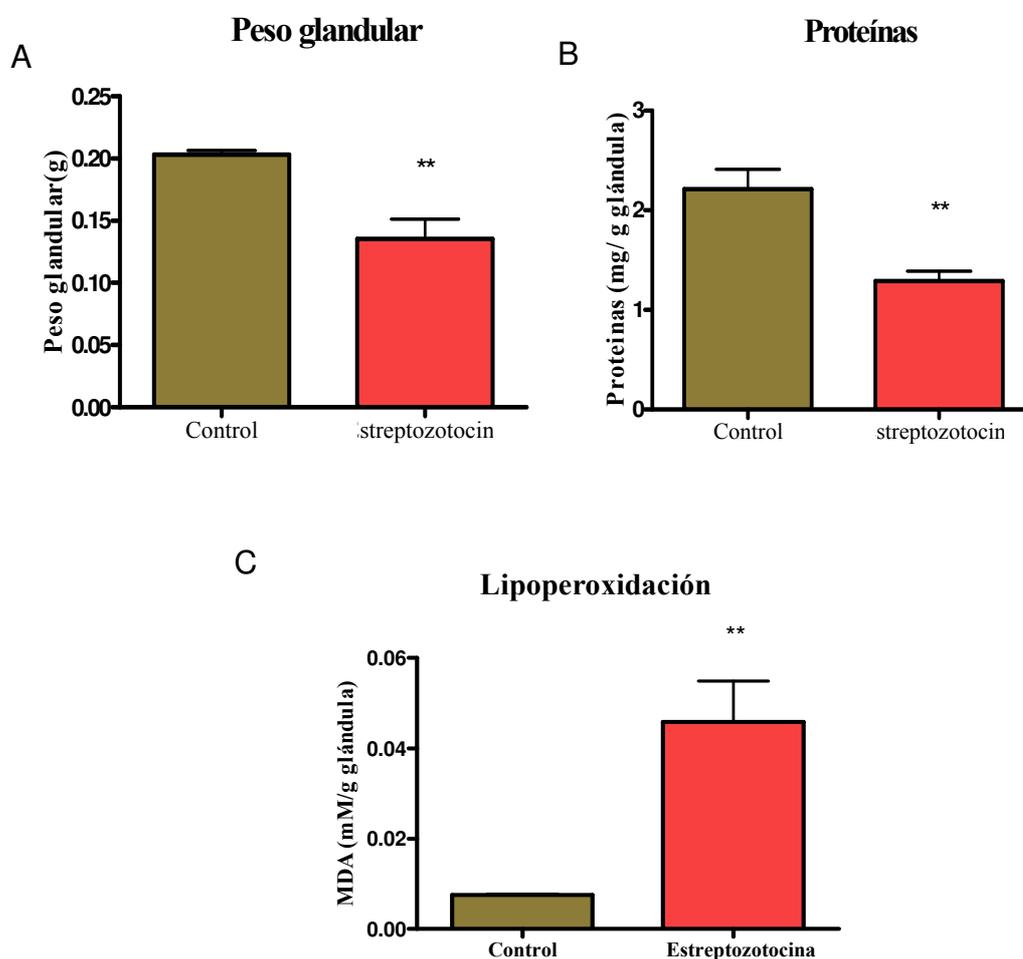


Figura 51: Parámetros generales y de estrés oxidativo en glándulas submandibulares. Los resultados representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, diferencias significativas respecto al control según prueba estadística de t de Student.

2.2.b. Efecto de los extractos sobre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

El efecto de los extractos acuosos y metanólicos sobre las especies reactivas del oxígeno (anión superóxido y peróxido de hidrógeno) y nitrógeno (óxido nítrico) se muestra en las Figuras 52, 53 y 54.

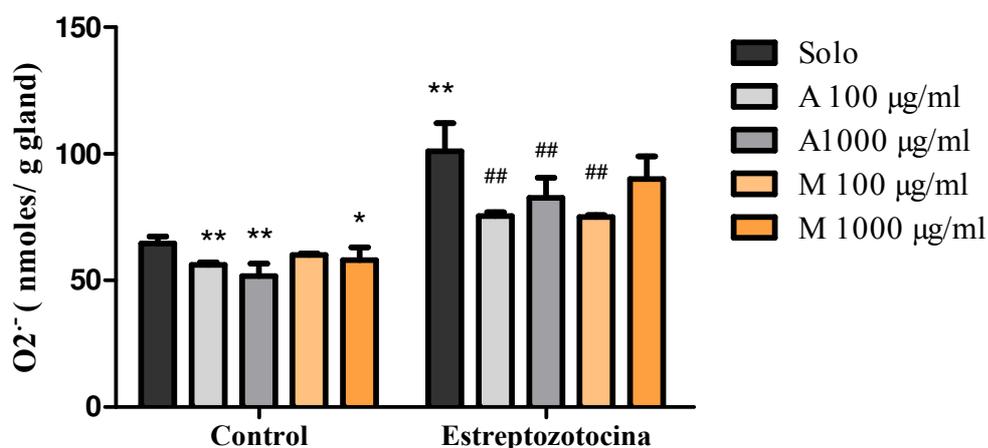


Figura 52: Determinación de anión superóxido en glándulas submandibulares de ratas control y ratas tratadas con estreptozotocina. Efecto de los distintos tratamientos: extractos acuosos (A) y metanólicos (M), sin tratamiento (negro). Los resultados representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, diferencias significativas respecto al control; ## $p < 0,01$ diferencias significativas respecto al control con estreptozotocina según ANOVA + prueba de Dunnett.

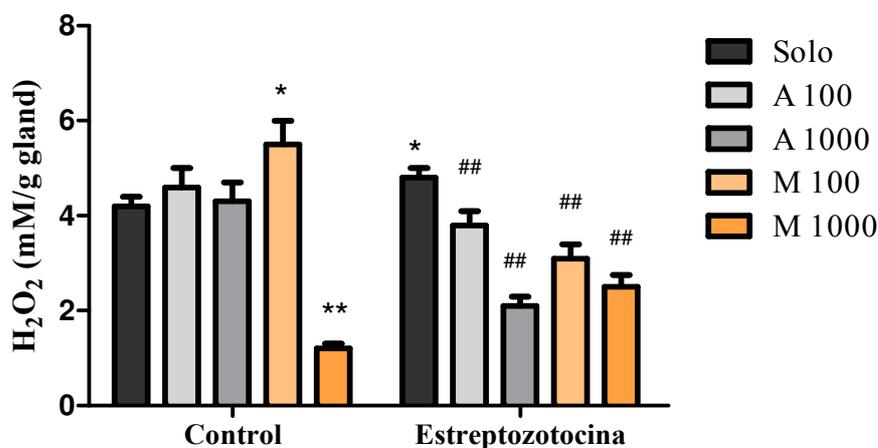


Figura 53: Determinación de H₂O₂ en glándulas submandibulares de ratas control y ratas tratadas con estreptozotocina. Efecto de los distintos tratamientos: extractos acuosos (A) y metanólicos (M), sin tratamiento (negro). Los resultados representan la media ± el error estándar de la media (ESM) de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. * p < 0,05; ** p < 0,01 diferencias significativas respecto al control; ##p < 0,01 diferencias significativas respecto al control con estreptozotocina según ANOVA + prueba de Dunnett.

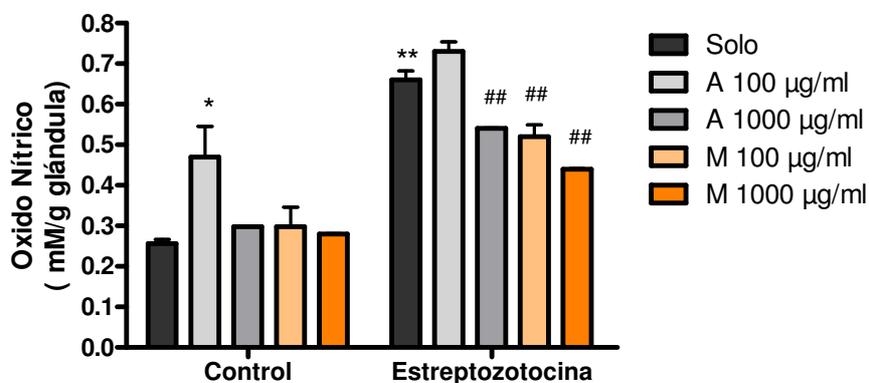


Figura 54: Determinación de óxido nítrico en glándulas submandibulares de ratas control y ratas tratadas con estreptozotocina. Efecto de los distintos tratamientos: extractos acuosos (A) y metanólicos (M), sin tratamiento (negro). Los resultados representan la media ± ESM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. * p < 0,05; ** p < 0,01, diferencias significativas respecto al control; ##p < 0,01 diferencias significativas respecto al control con estreptozotocina según ANOVA + prueba de Dunnett.

2.2.c. Efecto de los extractos sobre las enzimas antioxidantes

La actividad de los extractos sobre las enzimas antioxidantes Px y SOD se muestra en las Figuras 55 y 56.

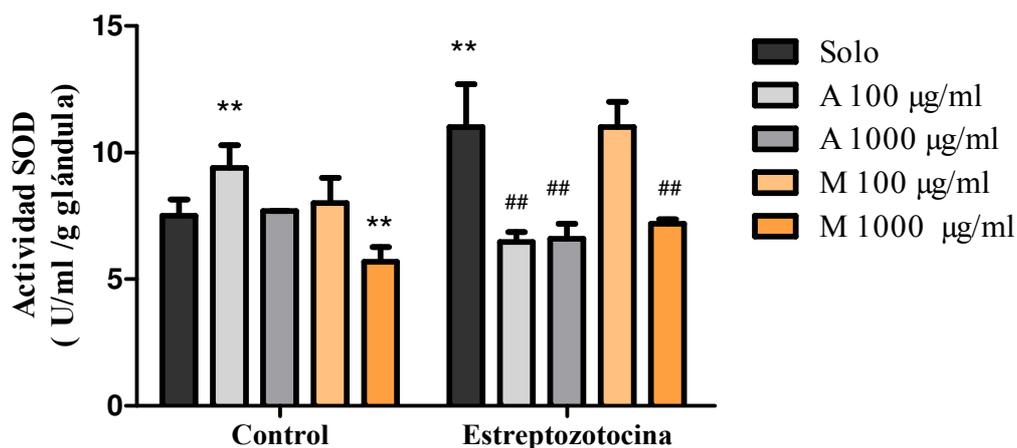


Figura 55: Actividad SOD en glándulas submandibulares de ratas control y ratas tratadas con estreptozotocina. Efecto de los extractos acuosos (A) y metanólicos (M); sin tratamiento (negro). Los resultados representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. ** $p < 0,01$, diferencias significativas respecto al control; ## $p < 0,01$ diferencias significativas respecto al control con estreptozotocina según ANOVA + prueba de Dunnett.

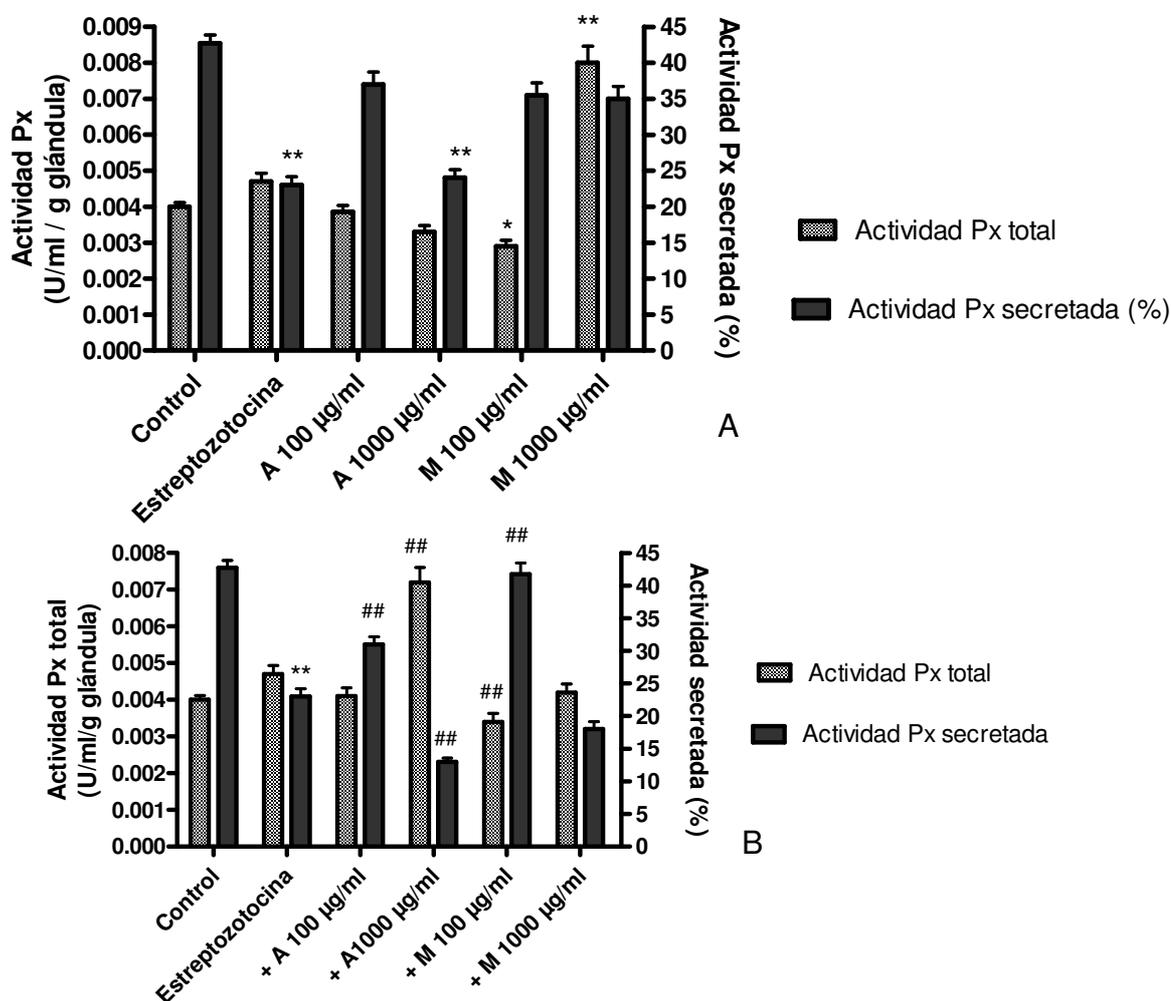


Figura 56: Actividad Px en glándulas submandibulares de ratas control (A) y ratas tratadas con estreptozotocina (B). Efecto de los extractos acuosos (A) y metanólicos (M). Los resultados representan la media ± ESM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. *p < 0,05; ** p < 0,01, diferencias significativas respecto al control; ##p < 0,01 diferencias significativas respecto al control con estreptozotocina según ANOVA + prueba de Dunnett.

2.3. Efecto sobre el tránsito intestinal

Los animales fueron tratados tal como se indica en **Materiales y Métodos (5.3)**. La propulsión intestinal se determinó a través de la medida de la distancia recorrida por el carbón desde el píloro, expresada como porcentaje de la longitud total del tracto intestinal (desde la unión gastropilórica hasta la unión ileocecal). Los resultados se muestran en la **Figura 57**.

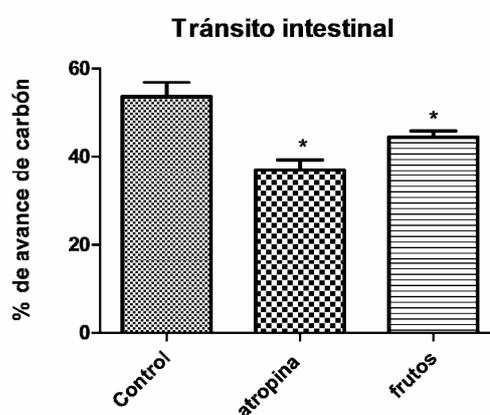


Figura 57: Efecto sobre el tránsito intestinal del grupo control, el grupo tratado con atropina y el grupo tratado con los frutos. * $p < 0,01$ diferencias significativas respecto del grupo control según ANOVA + prueba de Dunnett.

2.4. Ensayo de toxicidad aguda

Los ensayos de toxicidad aguda fueron determinados tal como se indica en **Materiales y Métodos (5.4)**. No se observaron muertes ni signos de toxicidad durante el período de observación. Al día 15, no se observaron anomalías en el corazón, hígado, riñones y estómago de los animales.

3. PARTE III: DESARROLLO TECNOLÓGICO DE UN PRODUCTO ALIMENTICIO

3.1. Características de las harinas obtenidas

A partir de 3,0000 kg de frutos sometidos a los procesos de limpieza y clasificación en los equipos correspondientes, se obtuvieron: **2539,30** g de frutos y **423,20** g de “palos” y “finos”.

El peso de la harina de frutos, obtenido luego de los procesos de molienda y tamizado fue: **2362,94** g, con un tamaño de partícula comprendido entre 1190 y 2000 μ .

El contenido de humedad de las harinas de frutos y de las harinas de maíz fue: **7,43 \pm 0,014 %** y **13,81 \pm 0,119 %**, respectivamente.

3.2. Evaluación del proceso de extrusión a 160°C

Los valores de torque (T) o momento torsor, el caudal másico de sólido seco (Q_{ss}) y el consumo específico de energía mecánica (CEEM) (con una velocidad de rotación del tornillo de 150 rpm) para las muestras con diferente nivel de humedad, M1 (16 %) y M2 (18%) se muestran en la **Tabla 11**.

| <i>Muestra</i> | <i>T (U.B.)</i> | <i>Q_{ss} (g/min) (SBS)</i> | <i>CEEM (J/g)</i> |
|----------------|-----------------|-------------------------------------|-------------------|
| M1 | 5000 | 75,18 | 611,51 |
| M2 | 4000 | 63,26 | 581,41 |

Tabla 11: Parámetros determinados en el proceso de extrusión de las muestras con diferentes niveles de humedad: M1 (16%) y M2 (18%). U.B.: unidades Bravender. El CEEM para una velocidad de rotación del tornillo (N) de 150 rpm fue calculado según González, Torres y De Greef, (2002).

El proceso de extrusión a 190 °C no pudo realizarse ya que el funcionamiento del equipo no fue satisfactorio.

3.3. Evaluación de las características fisicoquímicas de los productos obtenidos

El aspecto de los productos obtenidos se puede observar en la **Figura 58**.



Figura 58: Productos obtenidos por extrusión. Hilera superior: fragmentos correspondientes al nivel de humedad inicial de M2 (18 %). Hilera inferior: fragmentos correspondientes al nivel de humedad inicial de M1 (16 %).

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos de los productos finales, procesados tal como se indica en **Materiales y Métodos (6.4.)** fueron los siguientes:

- Humedad: $7,85 \pm 0,04$ % y $8,676 \pm 0,006$ % para M1 y M2, respectivamente.
- Expansión radial (E): $2,7 \pm 0,1$ y $2,18 \pm 0,09$ para M1 y M2, respectivamente.
- Volumen específico (Ve): $9,0 \pm 0,4$ g/cm³ y $6,6 \pm 0,4$ g/cm³ para M1 y M2, respectivamente.

3.4. Evaluación de las características fisicoquímicas de las harinas obtenidas a partir de los productos extrudidos

Resultados de los parámetros fisicoquímicos de las harinas obtenidas a partir de los productos finales, tratados como se indica en **Materiales y Métodos (6.5.)**:

- Humedad: $8,167 \pm 0,003$ % y $9,25 \pm 0,07$ % para M1 y M2, respectivamente.
- Solubilidad en agua: 37 ± 3 % y $37,0 \pm 0,4$ % (SBS) para M1 y M2, respectivamente.
- Absorción de agua: $5,2 \pm 0,4$ ml/g y $6,3 \pm 0,8$ ml/g para M1 y M2, respectivamente.
- Actividad antioxidante:

La curva de calibración obtenida con el estándar de Trolox[®] mostró una respuesta lineal en el rango de concentraciones ensayado (0,5 – 3,5 mM).

La ecuación de la recta obtenida fue: $y = 21,315 x + 2,1844$

Donde:

y = Porcentaje de inhibición del radical libre ABTS

x = Concentración mM de Trolox[®]

El coeficiente de correlación lineal (R^2) obtenido fue: 0,9967

Los resultados se muestran en la **Tabla 12**:

| <i>Muestra</i> | <i>μmoles equivalentes de Trolox[®]/g muestra</i> |
|---------------------------------------|---|
| Humedad inicial 16 % previa extrusión | 126 \pm 8 |
| Humedad inicial 18 % previa extrusión | 91 \pm 2 |
| Humedad inicial 16 % post extrusión | 138 \pm 8 |
| Humedad inicial 18 % post extrusión | 133 \pm 12* |

Tabla 12: Capacidad eliminadora del radical ABTS de las harinas de los productos extrudidos. Los resultados representan la media \pm el error estándar de la media (ESM) de tres experimentos independientes realizados por triplicado.*p < 0,05, diferencias significativas según ANOVA + prueba de Dunnett.

DISCUSIÓN

1. PARTE I: ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

1.1. Estudio fitoquímico

1.1.a. Extractos acetónicos

1.1.a.1. Compuestos triterpénicos

La presencia de compuestos de naturaleza triterpénica en el extracto acetónico fue determinada a través del análisis por TLC. El sistema cromatográfico utilizado puso en evidencia una única banda color rosa, típica de los triterpenos pentacíclicos. La coincidencia en R_f y color con el testigo de ácido ursólico, permitió sospechar la presencia de este compuesto en el extracto pero no determinarla (**Resultados, Figura 17**).

El análisis por HPLC y la comparación de los tr y de los espectros UV con las sustancias patrones, posibilitó confirmar la presencia de ácido ursólico, valorar su contenido, e identificar a su isómero, el ácido oleanólico, presente en mezcla con el anterior.

El contenido de ácido ursólico obtenido fue: $0,042 \pm 0,009$ %. El ácido oleanólico se encontró en concentraciones muy bajas (trazas) (**Resultados, Figura 19 y Tabla 2**).

La presencia de ácido ursólico en yerba mate y en *Ilex* spp. utilizados como sustitutos o adulterantes de la misma, ha sido reportada previamente (Filip, 2011). El ácido ursólico aislado de *I. paraguariensis* mostró una acción inhibitoria de la aromatasas dependiente de la concentración y una IC_{50} : $32 \mu\text{M}$, lo que indica una actividad muy buena en relación al standard 4-hydroxyandrostenediona (IC_{50} : $0,8 \mu\text{M}$) (Gnoatto y col., 2008).

El ácido ursólico y el ácido oleanólico han despertado un gran interés científico en la última década, debido a las actividades farmacológicas demostradas en experiencias tanto *in vitro* como *in vivo*, en animales de experimentación. Dentro de las

actividades reportadas se describe la capacidad de reducir la atrofia muscular y estimular el desarrollo muscular en ratones. El mecanismo involucrado en este proceso estaría relacionado con la activación de la vía de señalización ligada a insulina IGF-I e inhibición de la atrofia asociada a la expresión de mRNA, en el músculo esquelético. Por otro lado, se observó que la suplementación con 0,14 % de ácido ursólico a una dieta alta en grasas en ratones sometidos a estas condiciones durante 6 semanas, produjo la disminución de los parámetros metabólicos tales como adiposidad, glucemia en ayunas, colesterol y triglicéridos plasmáticos (Kunkel y col., 2011). También se ha reportado actividad antiinflamatoria, hepatoprotectora, antimicrobiana y antiprotozoaria (Xu, Su y Zang, 2012). El ácido ursólico también demostró tener actividad inhibitoria de la proliferación celular en diferentes líneas tumorales y capacidad inhibitoria de las metaloproteinasas de la matriz celular, asociadas con la invasión tumoral y metástasis en células tumorales prostáticas (Kondo y col., 2011). Por otra parte, este compuesto demostró tener actividad inhibitoria sobre el factor de transcripción 3 (STAT 3) relacionado con la proliferación de distintos cánceres (Pathak y col., 2007).

Entre otras actividades particulares se ha postulado el uso del ácido ursólico como anticonceptivo tópico vaginal debido a la capacidad de inhibir la motilidad de los espermatozoides (Chattopadhyay y col., 2005).

Este es el primer reporte de ácido ursólico y oleanólico en los frutos maduros de *I. paraguariensis*.

1.1.a.2. Antocianinas

El extracto acetónico, a pH 1 obtenido a partir de los frutos frescos, presentó una coloración roja y a pH 4,5 ausencia de color, lo que permitió caracterizar a las antocianinas en dicho extracto. Por otro lado, el espectro UV-Visible del extracto a pH 1 mostró dos bandas de absorción características de las antocianinas monoméricas, una en la región UV (260-280 nm) y otra en la región visible (450-580 nm) tal como se muestra en **Resultados (Figura 21)**.

El método de pH diferencial es útil para los fines cuali-cuantitativos. La banda de absorción en la región del espectro cercana a 500 nm, permite obtener información cualitativa, es decir, sobre la estructura de la antocianina. En este caso, el máximo de absorción a 520 nm, indicó la presencia de cianidina 3–glucósido (Ortega, G. M. y Guerra, M., 2006). Por otro lado, el método del pH diferencial, permitió valorar el contenido de antocianinas totales por espectroscopía UV-Visible (Lee, Durst y Wrolstad, 2005). El rendimiento obtenido expresado como cianidina 3–glucósido y referido al fruto fresco fue: 170 ppm.

Uno de los métodos más utilizados para la separación de antocianinas, es HPLC en fase reversa, con detector UV con arreglo de fotodiodos. Este método permite la separación, identificación y cuantificación sin necesidad de una purificación excesiva, evitando la degradación de estos pigmentos antocianos (Ella, Guyot y Renard, 2003; Mikanagi y col, 2000).

En este trabajo, el análisis por HPLC permitió confirmar la identidad de la antocianina mayoritaria, la cianidina 3–glucósido. En el cromatograma de la muestra se observaron también dos picos correspondientes a compuestos de la misma naturaleza química, los que se hallaron presentes en menores concentraciones (**Resultados, Figura 24**).

Las antocianinas son compuestos de especial interés en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética, debido a sus cualidades como colorantes y por sus propiedades antioxidantes. Las restricciones al uso de colorantes sintéticos ha marcado un gran interés por los colorantes naturales considerados más seguros (Pazmino-Duran, 2001). Las antocianinas también son útiles para estabilizar alimentos prolongando el período de vida útil y también como marcadores químicos en el control de calidad de los mismos (Lee, Durst y Wrolstad, 2005; Longo y Vasapollo, 2005; Bridle y Timberlake, 1997).

Diversos estudios presentan evidencia científica sobre el impacto positivo en la salud de los extractos ricos en antocianinas. Entre las actividades reportadas se destaca la actividad antiinflamatoria y anticancerígena. También se cita su acción preventiva en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas (obesidad, diabetes,

hiperlipidemia) posiblemente relacionadas con la actividad antioxidante (He y Giusti, 2010; Shipp y Abdel-Aal, 2010). Se ha reportado que las antocianinas ejercen un efecto protector en el desarrollo de la aterosclerosis evitando el reclutamiento de macrófagos a sitios de inflamación, mediante la disminución de la secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MPC-1) inducida por TNF- α , en células endoteliales humanas. Específicamente, la cianidina y la delfinidina, mostraron un efecto inhibitorio de la angiogénesis y aterogénesis, a través de la disminución de la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular en las células del músculo liso vascular. Por otro lado, extractos enriquecidos en antocianinas, mostraron una actividad de relajación dependiente del endotelio en arterias coronarias porcinas (de Pascual-Teresa, Moreno y García-Viguera, 2010). Los granos de maíz pigmentado, especialmente el morado, son considerados una de las fuentes más importantes de antocianinas, debido al alto contenido presente (1277 $\mu\text{g/g}$) (Abdel-Aal, Young y Rabalski, 2006). Los extractos de antocianinas de esta variedad de maíz han sido incorporados en suplementos dietéticos antioxidantes, con recomendaciones para promover la salud (Shipp y Abdel-Aal, 2010). Las antocianinas también forman parte de un suplemento llamado “Medox”, el cual incorpora una cantidad concentrada de cianidina-3-glucósido y delfinidina-3-glucósido, extraídas de bayas noruegas (*Vaccinium myrtillus*) y grosellas negras (*Ribes nigrum*) (Aguilera Ortiz, M. y col., 2011).

La estabilidad de las antocianinas depende principalmente de la presencia de luz, oxígeno, pH, iones metálicos (Ca^{2+}) y de la temperatura (Bordignon-Luiz y col., 2007). Durante el proceso de industrialización de la yerba mate, las elevadas condiciones de temperatura a la que es sometida la materia prima produce la degradación de estos compuestos. Ello explica la presencia de antocianinas en los frutos maduros cosechados de la planta viva y preservados de factores degradativos. La ausencia en el material industrializado se debe a los factores degradativos antes mencionados.

Este es el primer reporte de antocianinas en *I. paraguariensis*.

El contenido de antocianinas presente en los frutos maduros de *I. paraguariensis* (170 $\mu\text{g/g}$) puede considerarse muy bueno, tomando como referencia los valores antes mencionados.

Las propiedades funcionales de las antocianinas y el contenido de estos compuestos hallado en los frutos maduros de *I. paraguariensis*, abren una nueva perspectiva para el uso de esta materia prima.

Sería importante desarrollar métodos que permitan extraer a escala industrial las antocianinas presentes en los frutos maduros con la finalidad de aprovechar este residuo como una fuente de compuestos con potencial benéfico para la salud humana.

1.1.b. Extractos metanólicos

1.1.b.1. Determinación de cafeína y teobromina por HPLC

El contenido de cafeína y teobromina en yerba mate, varía según el órgano de la planta, época del año, procedencia y grado de elaboración. El mayor contenido se encuentra en las hojas, donde el tenor de cafeína puede variar entre 0,5 - 2 % mientras que el valor máximo de teobromina no supera el 0,5 % (Filip y col., 1998).

En este trabajo se identificaron y cuantificaron cafeína y teobromina en los frutos maduros de *I. paraguariensis*. Los valores obtenidos para el extracto metanólico se muestran en **Resultados (Tabla 3)**.

Se ha reportado metilxantinas ($1,16 \pm 0,06$ mg/g) (Shubert y col., 2007) y cafeína (0,04g/100g) en los frutos inmaduros (Borré y col., 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo empleando frutos maduros son ampliamente superiores a los mencionados previamente. Las discrepancias podrían deberse al diferente estadio madurativo del material vegetal en estudio, empleado en ambos casos. Durante el proceso de maduración se producen cambios bioquímicos y fisiológicos que se traducen en variaciones cuali-cuantitativas de los metabolitos secundarios. Bajo estas hipótesis, los frutos maduros serían la fuente de elección para la extracción de metilxantinas, especialmente cafeína.

Las bases xánticas presentan numerosas actividades farmacológicas: estimulantes del SNC, antidepresiva, diurética (efecto debido a un aumento de la filtración glomerular y a una disminución de la reabsorción tubular), digestiva

(aumentan las secreciones gastrointestinales y además ejercen una acción procinética gastrointestinal en humanos), estimulante cardíaca (poseen efecto cronotrópico e inotrópico positivos), vasoconstrictora (a nivel del lecho vascular cerebral), broncodilatadora (especialmente la teofilina por relajación del músculo liso bronquial) y lipolítica (activación de la lipólisis y movilización de las grasas). También se han descrito otras propiedades como actividad vasodilatadora periférica, efecto antiagregante plaquetario y efecto antioxidante (Tránsito López Luengo, 2003).

Los datos extraoficiales de generación de residuos y los resultados aquí obtenidos sugieren que anualmente se descartaría una cantidad de frutos maduros que podrían contener alrededor de 100 kg de metilxantinas.

11.b.2. Determinación de compuestos polifenólicos (ácidos cafeilquínicos y flavonoides) por HPLC

El análisis por HPLC del extracto metanólico de los frutos maduros mostró una composición cualitativa de polifenoles similar a la reportada para las hojas, pero el contenido de polifenoles aquí obtenido resultó 6 o 7 veces menor (Filip y col., 2001).

Entre los ácidos monocafeilquínicos, el ácido clorogénico resultó ser el mayoritario ($0,535 \pm 0,006$ %). Entre los ácidos dicafeilquínicos, el 3,5 DCQ fue el más abundante ($0,607 \pm 0,004$ %) seguido por el 4,5 DCQ ($0,399 \pm 0,003$ %) y el 3,4 DCQ ($0,124 \pm 0,001$ %).

Los compuestos polifenólicos presentes en los vegetales han despertado un gran interés científico en los últimos tiempos, debido a sus propiedades antioxidantes. El estrés oxidativo está asociado al desarrollo de ciertas enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) que actualmente afectan a la población mundial. Entre ellas, se destacan las patologías tumorales, neurodegenerativas tales como Alzheimer y Parkinson (Ames, Shigenanaga y Hagen, 1993), cardiovasculares y metabólicas como el síndrome metabólico y la diabetes (Liu, Wang y Cai, 2014).

Existe una extensa literatura científica publicada sobre la actividad antioxidante de los ácidos cafeilquínicos (Amakura y col., 2013; Costa y col., 2013; Peres y col.,

2013; Taira y col., 2013). *I. paraguariensis* y la yerba mate, han sido muy estudiadas desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico, en la Cátedra de Farmacognosia, lugar donde se desarrolló esta Tesis Doctoral. Se demostró la actividad antioxidante de *I. paraguariensis* en diferentes modelos experimentales observándose una estrecha correlación con el contenido de polifenoles (Filip y col., 2000; Turner y col., 2011). Las investigaciones demostraron que los polifenoles de la yerba mate participan en la actividad colerética (Gorzalczany y col., 2001), actividad tipo peroxidasa (Anesini, Ferraro y Filip, 2006), secreción de peroxidasa en glándulas submandibulares de ratas (Filip y col., 2007), prevención de la hiperglucemia y síndrome metabólico en ratones hembra (Gorzalczany y col., 2009), actividad antifúngica contra *Malassezia furfur* (Filip, R., Davicino, R. y Anesini, C., 2010) y en la prevención de la hemólisis de glóbulos rojos sometidos estrés oxidativo (Peralta y col., 2013).

El ácido 4,5-dicafeilquínico demostró tener un potente efecto inhibitorio de la agregación del péptido 42-mer β amiloide (A β 42), característico de la enfermedad de Alzheimer, el cual causa citotoxicidad en las células neuronales. Esta inhibición podría utilizarse como estrategia para el tratamiento de esta enfermedad (Miyamae y col., 2012). Por otro lado, el ácido 3,5-dicafeilquínico mostró acción beneficiosa sobre las capacidades cognitivas en ratones propensos a senescencia acelerada, al disminuir la perturbación en el aprendizaje espacial y en la memoria (Masuda y col., 2009).

Los ácidos 3,4 y 3,5-dicafeilquínicos demostraron poseer actividad antihiperlipidémica, disminuyendo los depósitos de grasa, colesterol total y triglicéridos, en células HEP G2 (Zhang y col., 2013). En otros estudios, estos compuestos fueron capaces de inhibir la acción de las enzimas digestivas maltasa y α -glucosidasa (Xiao y col., 2013). La enzima α -glucosidasa interviene en la digestión de carbohidratos regulando la absorción de la glucosa, por lo que los ácidos 3,4 y 3,5-dicafeilquínicos resultan ser agentes prometedores para el tratamiento de la diabetes y la obesidad (Azuma y col., 2011). Cabe destacar que los inhibidores de la α -glucosidasa demostraron mejorar la hiperglicemia postprandial en la década del 70 y fueron aprobados como agentes terapéuticos en la década de los 90 (Hakamata y col., 2009).

Por otro lado, los ácidos 3,5 y 4,5 dicafeilquínicos aislados de *Lonicera japonica* mostraron una importante actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Xiong y col., 2013).

El ácido clorogénico aislado de *Artemisia princeps* mostró actividad inhibitoria de la melanogénesis en células de melanoma B 16 y ausencia de toxicidad celular (Akihisa y col., 2013).

La rutina posee probada acción antioxidante resultando un compuesto de interés en el área farmacéutica y alimentaria. Ha demostrado poseer actividad antimicrobiana y antifúngica. Trabajos recientes estudiaron la potencial utilización de este compuesto para el tratamiento de enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes, hipertensión, e hipercolesterolemia (Sharma y col., 2013).

Esta es la primera investigación de polifenoles en los frutos maduros. Borré y col. (2010) reportaron 0,03 % de ácido clorogénico en los frutos inmaduros, valor muy alejado al obtenido en este trabajo ($0,535 \pm 0,006$ en el extracto metanólico (EM) – $0,440 \pm 0,006$ en el extracto acuoso (EA)).

La presencia y los rendimientos obtenidos en: ácido clorogénico, ácido 3,5-dicafeilquínico, ácido 4,5-dicafeilquínico y rutina, señalan el potencial valor farmacológico de los frutos maduros para el tratamiento de ECNT y otras patologías asociadas al estrés oxidativo.

1.1.b.3. Valoración de polifenoles totales por espectrofotometría UV-Vis

Se utilizó el método descrito en las Normas ISO 14502-1 (2005), para la determinación del contenido de polifenoles totales en té verde y té negro. Este método utiliza un ensayo colorimétrico con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los polifenoles presentes en el té (catequinas), poseen estructuras diferentes a los polifenoles de *Ilex* spp. (mayoritariamente cafeilderivados). El método de referencia no está normalizado para yerba mate, sin embargo, se encuentra muy bien sustentado tanto en la teoría como en la práctica y es ampliamente reportado en la literatura científica para la medición de

polifenoles en yerba mate (Hartwig y col., 2012) y en otras especies vegetales (Agbor, Vinson, y Donnelly, 2014).

El análisis por HPLC permitió separar, identificar y cuantificar los polifenoles en forma individual. El método por espectrofotometría UV permitió determinar el contenido total que resultó ser $4,0 \pm 0,1$ % equivalentes de ácido gálico. Otros autores reportaron para extractos de yerba mate preparados con agua caliente valores comprendidos entre $4,98 \pm 0,06$ % - $7,60 \pm 0,09$ % y con agua fría $1,95 \pm 0,03$ % - $3,00 \pm 0,01$ % empleando el mismo método de valoración (Hartwig y col., 2012).

Los valores obtenidos en este trabajo señalan a los frutos como una fuente importante de polifenoles.

1.1.c. Extractos acuosos

Se prepararon extractos acuosos con el fin de estudiar los compuestos hidrosolubles presentes en las preparaciones de yerba mate de uso popular: las saponinas, las metilxantinas y los polifenoles (ácidos cafeilquínicos y flavonoides presentes). Estos compuestos están involucrados en los mecanismos de acción hipocolesterolemiantes, hipolipidemiantes, lipolíticos y antioxidantes, por lo que se usan en tratamientos contra la obesidad y el sobrepeso (Heck y de Mejía, 2007).

1.1.c.1. Determinación de saponinas por HPLC

Las saponinas aisladas de diversas fuentes vegetales han despertado interés científico debido a un gran número de actividades farmacológicas demostradas tales como la acción hipocolesterolemiantes (Lee y col., 2005b), anticancerígena (Ellington, Berhow y Singletary, 2006; Rowlands, Berhow y Badger, 2002) inductora de la apoptosis (Yanamandra y col., 2003), anti-mutagénica (Berhow y col., 2002), antiinflamatoria (Wang y col., 2008; Augustin y col., 2011), citotóxica (Pérez y col., 2015), antiproliferativa (Zong y col., 2015), antidiabética (Elekofehinti, 2015), fungicida (Rubio-Moraga y col., 2013) y antitripanocida (Ibrahim y col., 2013).

Además, resultan de interés en la industria alimentaria y cosmética debido a sus propiedades como formadoras de espuma en soluciones acuosas (Augustin y col., 2011), estabilizadoras de emulsiones (Zhang, Bing & Reineccius, 2016) y prebióticas (Chen, Tai & Hsiao, 2015).

Las saponinas presentes en la yerba mate (Matesaponinas) en su mayoría, derivan del ácido ursólico y otras minoritarias, derivan del ácido oleanólico. Poseen una elevada solubilidad en agua y se les atribuye actividad antiinflamatoria e hipocolesterolemia (Gnoatto y col., 2005). Por otro lado, la yerba mate forma parte de formulaciones utilizadas para la pérdida de peso corporal. Esta propiedad estaría relacionada no sólo con la acción lipolítica y termogénica de la cafeína, sino también con la acción de las saponinas, las cuales interfieren en el metabolismo del colesterol y retrasan la absorción intestinal de grasas (Dickel y col., 2007).

Se han reportado saponinas en los frutos verdes de *I. paraguariensis* las cuales derivan del ácido ursólico, oleanólico y pomólico siendo el Ilexósido II (**Figura 59**) una de las principales (Gnoatto y col., 2005; Peixoto y col., 2012; Taketa, Breitmaier y Schenkel, 2004).

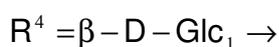
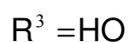
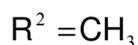
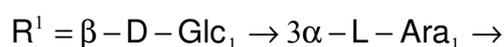
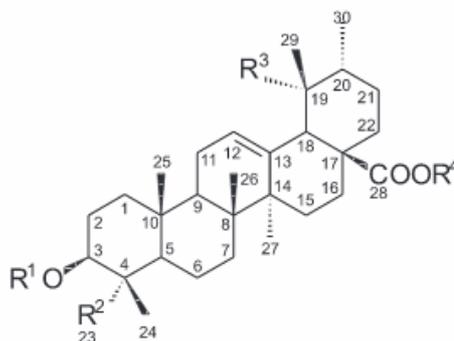


Figura 59: Estructura química del Ilexósido II

No hay reportes previos de saponinas en los frutos maduros. En este trabajo las saponinas fueron extraídas con agua caliente, por la elevada solubilidad de estos compuestos en este medio. El análisis cuali-cuantitativo se realizó por HPLC previa hidrólisis en medio ácido y posterior extracción de las sapogeninas con cloroformo (Gnoatto, Schenkel y Bassani, 2005). En el perfil cromatográfico del extracto clorofórmico obtenido por HPLC se observó la presencia de cuatro picos, uno de ellos (pico 4) coincidente en tr y espectro UV con el estándar de ácido ursólico (λ max < 203 nm). Los picos 1 y 3 también presentaron un máximo de absorción al UV < 203 nm lo que permitió inferir la presencia de un solo doble enlace en las estructuras pentacíclicas de estos compuestos. El pico 2 presentó un comportamiento cromatográfico similar, pero un espectro UV diferente, con un máximo de absorción a 225 nm, indicando un cromóforo de distinta estructura (**Resultados, Figuras 40, 41, 42 y 43**). Este compuesto, actualmente en estudio, no fue reportado previamente en los frutos como así tampoco en las hojas de *I. paraguariensis*.

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que las saponinas derivadas del ácido ursólico fueron las mayoritarias ($0,741 \pm 0,002$ %) valor que representa el 80,4 % de las saponinas totales (**Resultados, Tabla 5**).

1.1.c.2. Determinación de cafeína y teobromina por HPLC

El contenido de cafeína y teobromina presente en los extractos acuosos fue similar a l obtenido en el extracto metanólico, indicando la selectividad de ambos solventes para las metilxantinas (**Resultados, Tablas 3 y 6**).

1.1.c.3. Determinación de compuestos polifenólicos (ácidos cafeilquínicos y flavonoides) por HPLC

La composición cualitativa de polifenoles en los frutos fue similar a la reportada para las hojas utilizando el mismo solvente pero con un contenido 6 o 7 veces menor. Entre los ácidos monocafeilquínicos, el ácido clorogénico resultó ser el mayoritario

(0,440 ± 0,006 %). Entre los ácidos dicafeilquínicos, el 4,5 DCQ fue el más abundante (0,430 ± 0,02 %) seguido por el 3,5 DCQ (0,300 ± 0,01 %) y el 3,4 DCQ (0,200 ± 0,005 %). El metanol resultó un solvente con mayor selectividad para la extracción de ácido clorogénico y ácido 3,5-DCQ, mientras que el agua resultó más selectiva para los otros dos isómeros del ácido isoclorogénico (3,4-DCQ y 4,5-DCQ).

Con respecto a los flavonoides, ambos extractos fueron similares en su composición y contenido (**Resultados, Tablas 4 y 7**).

Las actividades reportadas para este tipo de compuestos ya han sido previamente discutidas en el punto **1.2.b**.

1.1.c.4. Determinación de polifenoles totales por espectrofotometría UV-Vis

El contenido de polifenoles totales en el extracto acuoso (8,3 ± 0,4 % equivalentes de ácido gálico) fue el doble del valor obtenido en el extracto metanólico y similar al reportado para la yerba mate (7,60 ± 0,09 %) (Hartwig y col., 2012).

Los resultados obtenidos corroboran el valor potencial de los frutos como fuente de polifenoles.

1.2. Estudio de las propiedades nutricionales

1.2.a. Determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa

El rendimiento del extracto hexánico obtenido fue: 2,7 % (valor referido al fruto seco). El análisis de ácidos grasos mostró una predominancia de ácidos grasos saturados (47,86 %), destacándose entre ellos el ácido palmítico (30,57 %) y el ácido esteárico (12,28 %). Es de destacar la proporción de ácidos grasos monoinsaturados (40,01 %) de los cuales el 38,74 % correspondió al ácido oleico.

El ácido linoleico (1,83 ± 0,01 %) se destacó dentro de los poliinsaturados (**Resultados, Tabla 8**).

La importancia biológica de los ácidos grasos insaturados está dada por su capacidad de reducir el colesterol LDL (entre un 20 – 40 %) y por lo tanto, el riesgo de enfermedad coronaria asociada (López-Huertas, 2010). El ácido linoleico, a su vez, forma parte de los componentes estructurales de la membrana plasmática (Omode, Fatoki y Olaogun, 1995).

La tecnología en alimentos ha permitido en los últimos años sustituir ácidos grasos saturados por insaturados y también incorporar estos últimos en diferentes alimentos como las bebidas (López-Huertas, 2010).

La presencia de ácido oleico y linoleico en el material estudiado le confiere propiedades nutricionales de interés para su potencial utilización en productos alimenticios.

Este es el primer estudio que reporta la composición cuali-cuantitativa de ácidos grasos en los frutos maduros.

1.2.b. Determinación de minerales

Los minerales esenciales tales como potasio, hierro y magnesio se encontraron presentes en cantidades significativas. 100 g de frutos contienen un 66 % de potasio, 64 % de hierro y 48 % del magnesio de la ingesta diaria recomendada (RDA) para un adulto de 25-50 años por el *National Research Council* de USA (NRC).

El contenido de minerales en los frutos y el porcentaje de la RDA que aportarían 100 g de frutos secos, se muestran en la **Tabla 13**.

| <i>Elemento</i> | <i>mg/100g de materia seca</i> | <i>% RDA</i> |
|-----------------|--------------------------------|--------------|
| Sodio | 1,3 ± 0,1 | 0 |
| Potasio | 1324 ± 15 | 66 |
| Hierro | 6,4 ± 0,5 | 64 |
| Cobre | 1,1 ± 0,1 | 122 |
| Zinc | 2,3 ± 0,3 | 14 |
| Calcio | 150 ± 12 | 19 |
| Magnesio | 168 ± 15 | 48 |

Tabla 13: Contenido de minerales en los frutos secos y porcentaje de la ingesta diaria recomendada (RDA) por el *National Research Council* de USA (NRC) que aportarían 100 g de frutos secos. Los resultados se expresan como la media ± ESM de tres experimentos realizados por triplicado.

Las propiedades nutricionales de la yerba mate son valoradas por el aporte de vitaminas y minerales. Ello ha motivado su inclusión en los principales códigos de alimentos. Cabe destacar que el contenido de potasio y cobre presente en los frutos es similar al reportado para la yerba mate (Markowicz Bastos y col., 2007) (**Tabla 14**).

| <i>Elemento</i> | <i>mg/100g MCYM</i> | <i>mg/100g de frutos</i> |
|-----------------|---------------------|--------------------------|
| Na | 3,9 | 1,3 ± 0,1 |
| K | 1300 | 1324 ± 15 |
| Fe | 18,5 | 6,4 ± 0,5 |
| Cu | 0,89 | 1,1 ± 0,1 |
| Zn | 4 | 2,3 ± 0,3 |
| Ca | 630 | 150 ± 12 |
| Mg | 490 | 168 ± 15 |

Tabla 14: Comparación del contenido de minerales de muestras comerciales de yerba mate (MCYM) (Markowicz Bastos y col., 2007) con los valores determinados en este trabajo en los frutos de yerba mate.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten considerar a los frutos como una excelente fuente de minerales. Sería interesante estudiar su biodisponibilidad a fin de establecer las formas más adecuadas para una potencial utilización en alimentos.

Este es el primer reporte de minerales en frutos de *I. paraguariensis*.

1.2.c. Determinación de la composición centesimal

Los resultados obtenidos destacan el alto contenido de fibra dietaria total (FDT) ($42,0 \pm 1,6$ %), mayoritariamente FDI ($37,6 \pm 1,3$) y de carbohidratos ($38,3 \pm 1,2$ %) **(Resultados, Tabla 10)**.

Desde mediados de la década del 70, el papel de la fibra dietaria en la nutrición ha recibido considerable atención debido al impacto positivo observado en la salud humana, a través del consumo continuado de la misma (Abdul-Hamid y Luan, 2000). Se ha comprobado que la ingesta de fibra disminuye la constipación (Castillejo y col., 2006) y el síndrome de colon irritable (Malhotra y col., 2004). Por otro lado ayuda a disminuir los niveles de colesterol en sangre y la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Romero y col., 2002; Van Rosendaal y col., 2004), prevenir la obesidad (Murakami y col., 2007). También se comprobó un efecto positivo sobre la diabetes (Hannan y col., 2007), y otros autores la han asociado al incremento de la supervivencia de pacientes con cáncer de mama (McEligot y col., 2006). Wakai y col. (2007) señalan que la fibra dietaria es importante para prevenir el cáncer de colon; por esta razón, los productos ricos en fibra han ganado popularidad como ingredientes de alimentos y han alentado a los sectores industriales y comerciales en la búsqueda de nuevas fuentes que permitan el desarrollo de productos con un alto contenido en fibra dietaria (Schaafsma, 2004).

Existen varios alimentos que generan subproductos ricos en fibra. La pulpa de manzanas, frutas cítricas y orujos, por ejemplo, poseen un contenido de FDT que puede oscilar entre 10,2 % y 87,9 % (Grigelmo-Miguel y Martín-Belloso, 1998; Laufenberg, Kunz y Nystroem, 2003). El 77,3 % de la FDT presente en la pulpa de manzana

corresponde a FDI, mientras que en la pulpa de pera, la FDS alcanza el 82,7 % de la FDT (Laufenberg, Kunz y Nystroem, 2003).

El contenido de proteínas ($5,5 \pm 0,1$ %), determinado por un método de valoración indirecto, donde el N de las metilxantinas podrían estar contribuyendo al resultado, debería ser evaluado desde el punto de vista nutricional. Por otro lado, el contenido de lípidos ($4,5 \pm 0,3$ %) es similar al reportado para las partes aéreas de legumbres, que oscila entre 4 y 5% (Ajayi y col., 2006).

Este es el primer estudio sobre la composición centesimal de los frutos de *I. paraguariensis*.

2. PARTE II: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS

Los estudios farmacológicos fueron realizados utilizando los extractos metanólicos y acuosos procesados según se indica en **Materiales y Métodos (4.1.b.1 y 4.1.c.2)**. La actividad de los extractos fue comparada frente al ácido clorogénico, uno de los principios activos mayoritarios presentes. El rango de concentración del ácido clorogénico ensayado fue determinado a partir del rango de concentraciones de este compuesto presente en los extractos.

2.1. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

Se decidió analizar la actividad antioxidante de los extractos acuosos y metanólicos, ya que los mismos estuvieron dirigidos a la extracción de polifenoles, compuestos con demostrada actividad antioxidante (Anesini y col., 2012; Deng y col., 2015; Garaguso & Nardini, 2015). A su vez, el extracto acuoso utilizado se preparó de acuerdo con la forma de consumo popular.

Se realizó la evaluación de la actividad antioxidante general a través de métodos directos e indirectos. La evaluación de la actividad antioxidante específica, símil enzimática, fue realizada sobre especies reactivas presentes normalmente en el organismo. Los métodos directos evalúan la actividad antioxidante protectora (Antolovich, 2002) y los métodos indirectos identifican la presencia de grupos dadores de hidrógeno, capaces de neutralizar las especies reactivas producto de la oxidación celular. En este trabajo se realizó la evaluación de la actividad antioxidante protectora a través del análisis de la capacidad inhibidora de la peroxidación lipídica (método directo). La capacidad de neutralizar especies reactivas fue realizada a través del análisis de la actividad eliminadora de los radicales libres ABTS y DPPH (métodos indirectos).

Con respecto a la actividad antioxidante específica, se realizó la evaluación de la actividad símil enzimática que presentaron los extractos. Se evaluó la actividad símil

SOD, Px y CAT sobre especies reactivas presentes en el organismo, como son el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno.

Con respecto a la actividad eliminadora del radical libre ABTS (**Figura 45, Resultados**), se observó que tanto el extracto acuoso como el metanólico presentaron una actividad directamente proporcional a las concentraciones ensayadas sin diferencias significativas entre las CE₅₀ (µg/ml). Solamente en las concentraciones más altas ensayadas, el extracto acuoso mostró una actividad significativamente mayor que el extracto metanólico (**Resultados, Figura 46**). El ácido clorogénico, por su parte, estaría contribuyendo sólo en parte a esta actividad, ya que las concentraciones en la que se encuentra presente en las CE₅₀ de los extractos acuosos y metanólicos, 0,54 y 0,45 µg/ml, respectivamente, presentaron una actividad eliminadora de 8,17 y 6,74 %.

En cuanto a la actividad eliminadora del radical libre DPPH, también se observó que tanto el extracto acuoso como el metanólico presentaron una actividad directamente proporcional a las concentraciones ensayadas y que no hubo diferencias significativas entre las CE₅₀ (µg/ml). Solamente en las concentraciones más altas ensayadas, el extracto acuoso mostró una actividad significativamente mayor que el extracto metanólico. El ácido clorogénico también estaría contribuyendo en parte a esta actividad ya que las concentraciones en la que se encuentra presente en las CE₅₀ de los extractos acuosos y metanólicos, 0,63 y 0,57 µg/ml, respectivamente, presentaron una actividad eliminadora del radical libre ABTS de 18,2 y 17,1 %. También se observó una muy buena correlación entre esta actividad y la presencia de ácido clorogénico (R^2 extracto acuoso: 0,9933 y R^2 extracto metanólico: 0,9975), sin embargo otros compuestos presentes lograrían un sinergismo de acción ya que la actividad ejercida por los extractos fue mayor.

La evaluación de la actividad antioxidante protectora, mediante el análisis de la actividad inhibidora de la peroxidación lipídica (Test del FTC) (**Resultados, Figura 47**), mostró que tanto el extracto acuoso como el metanólico presentaron actividad dependiente de la concentración. Hay que destacar que se necesitaron concentraciones mucho mayores para que los extractos pudieran ejercer una actividad protectora inhibiendo la peroxidación lipídica que la que se necesitó para la eliminación de

radicales libres. Por lo tanto, se podría decir que los extractos produjeron la eliminación de los radicales libres ABTS y DPPH en concentraciones en las cuales no lograron evitar la peroxidación lipídica. Es un hecho conocido que, para que una sustancia capaz de eliminar radicales libres presente actividad protectora de la lipoperoxidación, necesita neutralizar casi el 100 % de los radicales. Es así que los extractos no presentaron actividad protectora a bajas concentraciones sino a altas, coincidentes con las que produjeron la máxima respuesta de eliminación de los radicales, como se observó en este estudio. El hecho de que se ejerciera protección contra la lipoperoxidación, tiene gran importancia biológica, ya que los métodos directos están basados en el estudio del efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema, de los cuales los más usados han sido: proteínas, ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, grasas, lipoproteínas, membranas biológicas y ácidos grasos (como el ácido linoleico). Evaluar el efecto sobre la oxidación de los lípidos es de gran importancia debido a que su oxidación interviene en el desarrollo de enfermedades, así como en el deterioro de la calidad de los alimentos (Cadenas, 1997).

Los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico debido a su estructura química (enlaces dobles *cis* separados por un metileno alílico), son blancos sensibles de los radicales libres, los cuales extraen fácilmente átomos de hidrogeno de los metilenos alílicos; de hecho, la oxidabilidad de los ácidos grasos insaturados, depende linealmente del número de metilenos bis alílicos que estos contengan.

Con respecto al ácido clorogénico, teniendo en cuenta la concentración en la que este se encuentra presente en las CE_{50} de los extractos acuosos y metanólicos, 165,5 y 153,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, y la actividad inhibidora que presentaron: 55,0 y 54,97 %, la actividad inhibidora de la peroxidación lipídica se debería casi totalmente a la presencia de este compuesto. Cabe señalar que la correlación entre la inhibición de la peroxidación del ácido linoleico y la presencia de clorogénico fue mayor en el extracto metanólico que en el extracto acuoso (R^2 extracto metanólico: 0,8509; R^2 extracto acuoso: 0,7957).

Del análisis de los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la actividad antioxidante general, se puede concluir que los extractos ejercieron principalmente una actividad eliminadora de radicales libres.

En el análisis de la actividad antioxidante específica, símil enzimática de los extractos, se observó que ambos extractos presentaron este tipo de actividad.

Con respecto a la actividad de tipo catalasa, se observó que el extracto acuoso presentó una actividad dependiente de la concentración en el rango de concentración ensayado, y el extracto metanólico mostró una actividad dependiente de la concentración a bajas concentraciones y una actividad inversamente proporcional a la concentración en las mayores concentraciones ensayadas. También presentó una mayor actividad catalasa máxima a menor concentración que el extracto acuoso. El ácido clorogénico, por su parte, estaría involucrado en la actividad CAT de ambos extractos, pero con diferente participación. En el caso del extracto acuoso, la actividad símil enzimática ejercida por este, se debería principalmente a la presencia de este compuesto, ya que la concentración en la que se encuentra presente (10,47 $\mu\text{g/ml}$) en la dilución de extracto que produjo la respuesta máxima (19 U/ml) produjo una respuesta de 14,2 U/ml. Con respecto al extracto metanólico, el ácido clorogénico sólo estaría involucrado en parte en esta actividad, ya que la concentración en la que se encuentra presente (0,015 $\mu\text{g/ml}$) en la dilución del extracto que produjo la máxima respuesta (20 U/ml), produjo una actividad menor a 6 U/ml) (**Resultados, Figura 48**).

Con respecto a la actividad de tipo peroxidasa, se observó que ambos extractos presentaron actividad peroxidasa en forma dependiente de la concentración, aunque a concentraciones mucho mayores que aquellas en las que presentaron actividad catalasa. El extracto metanólico presentó una actividad significativamente mayor que el extracto acuoso en las concentraciones ensayadas. El ácido clorogénico presentó muy baja actividad, por lo que no estaría involucrado en la actividad demostrada por los extractos (**Resultados, Figura 49**).

En cuanto a la actividad de tipo superóxido dismutasa, se observó que el extracto acuoso presentó una actividad dependiente de la concentración en las menores concentraciones ensayadas, y una actividad máxima de 0,61 U/ml a una concentración

de 10 µg/ml. El extracto metanólico presentó una actividad máxima de 0,57 U/ml a una concentración de 50 µg/ml (la máxima concentración ensayada). A concentraciones más altas, ambos extractos presentaron un efecto pro-oxidante. El ácido clorogénico presentó actividad antioxidante tanto a concentraciones bajas de los extractos, como a altas concentraciones de los mismos (efecto prooxidante de los extractos).

La actividad antioxidante demostrada por los extractos indica su potencial uso como coadyuvantes en el tratamiento o prevención de patologías que cursen con estrés oxidativo.

2.2. Evaluación de la actividad antioxidante en glándulas submandibulares

En función de la actividad antioxidante *in vitro* demostrada por los extractos, se decidió analizar la actividad antioxidante en glándulas submandibulares provenientes de ratas con diabetes inducida por la administración de estreptozotocina.

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia, la cual produce un aumento en las especies reactivas del oxígeno que con el tiempo puede dañar gravemente muchos órganos y sistemas.

Las glándulas salivales parótidas y submandibulares son las responsables de la producción de aproximadamente el 90 % de la saliva. Las glándulas submandibulares junto con las sublinguales secretan el 60 % de la peroxidasa presente en la saliva. Esta enzima es una de las principales defensas frente al estrés oxidativo y, a menudo, es utilizada como marcador de la función glandular submandibular (Ferreira Leite y col., 2010). La disminución en la secreción salival y el desbalance oxidativo característicos de la diabetes, favorecen la aparición de la enfermedad periodontal, una de las manifestaciones típicas de esta patología (sobre todo cuando no existe una adecuada higiene bucal). La enfermedad periodontal puede progresar desde la gingivitis (inflamación de las encías) hacia la periodontitis y periodontitis avanzada en la que puede haber aflojamiento de las piezas dentarias e incluso pérdida de las mismas

(National Institute of Dental and Craniofacial Research, 2013). El daño en los tejidos, ligamentos y huesos de los dientes, es producto del estrés oxidativo, es decir, del desbalance entre las ERO producidas por el organismo (que se encuentran aumentadas en la diabetes) y los antioxidantes presentes en la saliva (superóxido dismutasas, catalasas, peroxidasas, ácido ascórbico, albúmina, glutatión, lactoferrinas, vitaminas y ác. úrico (Knaś y col., 2013).

Los ensayos realizados comprendieron el análisis del efecto de los extractos sobre la concentración de ERO (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico) y el efecto sobre la actividad de las enzimas antioxidantes peroxidasa y superóxido dismutasa. Se observó que el tratamiento con los extractos acuosos y metanólicos, en general, revirtió los efectos causados por la estreptozotocina, provocando una disminución del estrés oxidativo.

Al analizar comparativamente las glándulas provenientes de animales control y de animales tratados con estreptozotocina, se observó en estas últimas una disminución significativa del peso y del contenido de proteínas, parámetros relacionados con el catabolismo proteico que ocurre en la diabetes. También se observó un aumento de la peroxidación lipídica que se correspondería con la presencia de estrés oxidativo.

El tratamiento con estreptozotocina provocó en las glándulas una disminución en la secreción de la enzima peroxidasa y un aumento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa, lo cual estaría relacionado con el aumento en los niveles de H_2O_2 que presentaron. Los niveles de anión superóxido y de óxido nítrico también se vieron aumentados en las glándulas tratadas con estreptozotocina. La permanencia en el tiempo del aumento en los niveles de H_2O_2 , anión superóxido y óxido nítrico llevaría al desarrollo de la enfermedad periodontal, tal como se explicó anteriormente.

Con respecto al anión superóxido, los extractos acuosos en las dos concentraciones ensayadas (100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$) y el metanólico en la mayor concentración ensayada (1000 $\mu\text{g/ml}$) provocaron una disminución en los niveles de este radical en las glándulas control provenientes de animales sanos. Por otro lado los extractos acuosos y el extracto metanólico en la menor concentración ensayada (100 $\mu\text{g/ml}$) provocaron una disminución en los niveles de anión superóxido que se

encontraban aumentados en las glándulas provenientes de los animales tratados con estreptozotocina (**Resultados, Figura 52**).

La disminución en los niveles de anión superóxido no puede explicarse a través de la acción de la enzima SOD, ya que esta se vio disminuida por el tratamiento con los extractos, por lo tanto podría deberse a la inhibición de la NADPH oxidasa y xantino oxidasa, enzimas responsables de su síntesis.

Con respecto al peróxido de hidrógeno, solamente el extracto metanólico, en la mayor concentración ensayada, provocó una disminución en los niveles del mismo en las glándulas control provenientes de animales sanos. Esto se explicaría por el aumento en la actividad peroxidasa total provocada por el extracto en las glándulas control (**Resultados, Figura 53**). Por otro lado, se observó que todos los extractos fueron capaces disminuir los niveles de H_2O_2 que se encontraban aumentados por el tratamiento con estreptozotocina. En el caso del extracto acuoso en la mayor concentración ensayada y del extracto metanólico en la menor concentración ensayada, este efecto podría estar relacionado con el aumento en la actividad peroxidasa total y secretada que provocaron, respectivamente.

En cuanto al óxido nítrico, se observó que el extracto acuoso en la menor concentración ensayada, provocó un aumento significativo en los niveles del mismo en las glándulas control provenientes de animales sanos. Este comportamiento podría justificar la capacidad del extracto para revertir el aumento en los niveles de NO provocado por la estreptozotocina, mientras que el extracto acuoso en la mayor concentración y ambos extractos metanólicos, si mostraron capacidad de revertir el aumento en los niveles de NO.

Con respecto a la actividad SOD, se observó que sólo el extracto acuoso en la menor concentración ensayada, y el extracto metanólico en la mayor concentración ensayada provocaron modificaciones en la actividad SOD en las glándulas control, un aumento y una disminución, respectivamente. También se observó que los extractos acuosos en las dos concentraciones ensayadas y el extracto metanólico en la mayor concentración ensayada provocaron una disminución en la actividad SOD que se encontraba aumentada por el tratamiento con estreptozotocina. Esto podría deberse a la

disminución en los niveles de anión superóxido provocado por los extractos, lo que provocaría una disminución en la actividad de la enzima SOD. El extracto metanólico en la menor concentración ensayada no produjo cambios significativos.

Para evaluar el efecto de los extractos sobre la actividad de la enzima peroxidasa se analizaron los niveles de enzima secretada por las glándulas y el nivel de peroxidasa total presente en las mismas. La enzima peroxidasa es una de las principales responsables de la actividad antioxidante en la cavidad bucal (junto con las enzimas catalasa y superóxido dismutasa). Interviene en la descomposición del H₂O₂ y también es responsable de la transformación del tiocianato presente en la cavidad bucal a ácido hipotiocianoso e hipotiocianito, dos compuestos con actividad antimicrobiana (Courtois, 1996). Para analizar los niveles de enzima secretada, luego de la incubación con buffer Krebs-Henseleit (grupo control) o con los extractos, se realizó la determinación de la concentración de enzima en el sobrenadante obtenido (sobrenadante 1). Para determinar el nivel de enzima total en las glándulas, se determinó la concentración de las mismas en el sobrenadante obtenido luego de la homogeneización (sobrenadante 2) y se sumó al resultado obtenido en el sobrenadante 1.

El cálculo del porcentaje de enzima secretada con respecto al nivel de enzima total se realizó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Enzima sec retada} = \frac{\text{Enzima sec retada (sobrenadante 1)} \times 100}{\text{Enzima sec retada (sobrenadante 1)} + \text{Enzima retenida (sobrenadante 2)}}$$

Se observó que solamente el extracto metanólico en la mayor concentración ensayada fue capaz de aumentar la actividad Peroxidasa total en las glándulas control, y que los extractos acuosos y metanólicos en la menor concentración ensayada fueron capaces de aumentar los niveles de actividad Peroxidasa total que se encontraban disminuídos por el tratamiento con estreptozotocina. Por su parte, el extracto acuoso en la mayor concentración ensayada provocó un aumento en la actividad Peroxidasa secretada en las glándulas provenientes de animales tratados con estreptozotocina.

La disminución en la secreción de esta enzima en las glándulas provenientes de animales tratados con estreptozotocina, sería responsable del aumento en los niveles de H₂O₂ observado.

De los resultados obtenidos se desprende que los extractos demostraron tener un efecto protector en las glándulas evidenciado por la disminución de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, y el aumento en la actividad de la enzima peroxidasa. Por lo tanto, podrían llegar a ser de utilidad como coadyuvantes en el tratamiento de la enfermedad periodontal, y podrían eventualmente utilizarse en la elaboración de medicamentos herbarios destinados a la prevención y/o tratamiento de esta patología.

2.3. Análisis del efecto sobre el tránsito intestinal

Las fibras son utilizadas por sus efectos beneficiosos para la salud, entre ellos, prevenir enfermedades cardiovasculares, diabetes, entre otras, tal como fue discutido anteriormente. También son utilizadas por su acción en el en el tránsito intestinal en pacientes con síndrome del intestino irritable, aunque el tipo de fibra a utilizar en este tipo de problemas, debe ser muy bien estudiado.

En cuanto a la acción sobre el tránsito intestinal, la FDI retiene el agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad; esto produce un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal. Por otro lado, la fibra de tipo soluble (FDS) retrasa el tiempo de tránsito gastrointestinal, reduce las velocidades de absorción de algunos nutrientes, disminuyendo las concentraciones plasmáticas de glucosa y de colesterol. Es rápidamente fermentada por las bacterias del colon y retardan el tránsito intestinal (Kin, 2000).

El enlentecimiento del tránsito intestinal obtenido en este trabajo, no pudo ser explicado en función del contenido de fibra presente ya que la mayor parte correspondió a la FDI (89,5 % de la FDT). Por lo tanto, nos preguntamos qué otros factores podrían contribuir al resultado obtenido.

La revisión bibliográfica indicó que muchas drogas vegetales que contienen los mismos grupos fitoquímicos a los hallados en este trabajo, enlentecen el tránsito

intestinal. Por ejemplo, extractos acuosos de *Psidium guajava* (Myrtaceae) contienen compuestos polifenólicos, triterpenos pentacíclicos, quercetina y taninos. Estos extractos fueron capaces de contrarrestar el cuadro de diarrea inducido por la administración de aceite de ricino a ratas. Estos extractos disminuyeron los movimientos de segmentación rítmica y pendulares en duodeno aislado de conejo (Ojewole, Awe y Chiwororo, 2008). Lo mismo ocurrió con los extractos de *Calotropis gigantean* (Asclepiadaceae) que contienen glicósidos flavonoides, derivados de triterpenos pentacíclicos y otras drogas con saponinas (Kumar y col., 2010). Experiencias *in vitro* señalan a las saponinas como inhibidores de la liberación de histamina, que actúa como mediador inflamatorio aumentando la secreción y propulsión intestinal.

Estos antecedentes podrían justificar nuestros resultados y señalan el potencial uso de los frutos como agente antidiarreico.

2.4. Ensayo de toxicidad aguda

No se observaron signos de toxicidad provocados por los frutos de *I. paraguariensis* en los ensayos realizados en este trabajo. Por otro lado, este material siempre ha estado presente en la yerba mate comercial, como resultado del procesamiento industrial. No se han reportado casos de toxicidad a través del prolongado tiempo de uso, lo cual indicaría la seguridad en su empleo.

3. PARTE III: DESARROLLO TECNOLÓGICO DE UN PRODUCTO ALIMENTICIO

El desarrollo tecnológico de un producto alimenticio se realizó con el fin de evaluar la utilización de los frutos por la industria alimenticia. Se eligió el desarrollo de un producto tipo *snack* debido a la capacidad de producir e incorporar harina de frutos a la harina de maíz tradicionalmente empleada para la elaboración de este tipo de productos. Para ello, se elaboraron los productos mediante un proceso de extrusión, y se analizaron las características fisicoquímicas de los productos obtenidos para evaluar su posible aceptación por parte de los consumidores.

La extrusión puede definirse como un proceso que involucra el transporte de un material, bajo ciertas condiciones controladas, forzándolo a pasar por una boquilla de una dada geometría y con un caudal másico pre-establecido.

Históricamente, se registran los primeros extrusores para alimentos alrededor del año 1870, como el extrusor a pistón para salchichas y carnes procesadas. Luego, entre los años 1935 y 1940, aparecieron los extrusores formadores a tornillo utilizados para elaborar fideos y dar forma a las masas de cereales precocidas. Finalmente, entre los años 1940 y 1950, aparecen los extrusores cocedores para elaborar *snacks* y harinas precocidas (González, Torres y De Greef 2002). Hoy en día, la cocción por extrusión de alimentos que contienen almidón se ha vuelto una técnica muy utilizada para la obtención de un amplio rango de productos tipo *snack*, cereales para el desayuno y golosinas (Bouzaza, Arhaliass y Bouvier, 1996; Pansawat y col., 2008).

Un esquema de un extrusor similar al utilizado en este trabajo se puede observar en la **Figura 60**. La sucesión de fenómenos básicos que ocurren durante el proceso de extrusión-cocción se muestra en la **Figura 61**. Este proceso es considerado eficiente, no sólo desde el punto de vista de la versatilidad, ya que puede realizar simultáneamente operaciones de mezclado, cocción, texturización y secado parcial, sino también desde el punto de vista del ahorro de energía, mano de obra, y espacio requerido para la instalación (González, Torres y De Greef 2002).

Las ventajas de este proceso de cocción se basan principalmente en que, por ser un proceso de “alta temperatura y corto tiempo” (HTST por sus siglas en inglés), minimiza la degradación térmica de los nutrientes presentes en los alimentos y simultáneamente mejora la digestibilidad provocando la gelatinización del almidón, la desnaturalización de las proteínas y la desactivación de algunos compuestos indeseables como enzimas y antinutrientes (Alonso, Aguirre y Marzo, 2000).

El maíz es uno de los ingredientes principales que se utilizan para obtener productos expandidos y resulta interesante la adición de otros ingredientes, tanto para mejorar el valor nutricional como para aportar sabor y novedad a los productos comerciales.

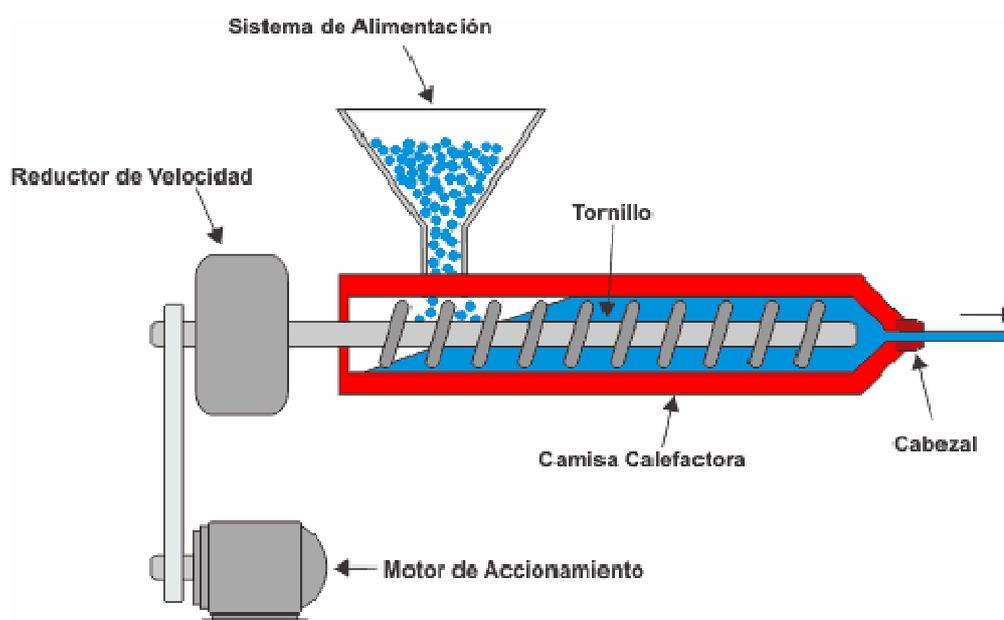


Figura 60: Esquema de un extrusor monotornillo

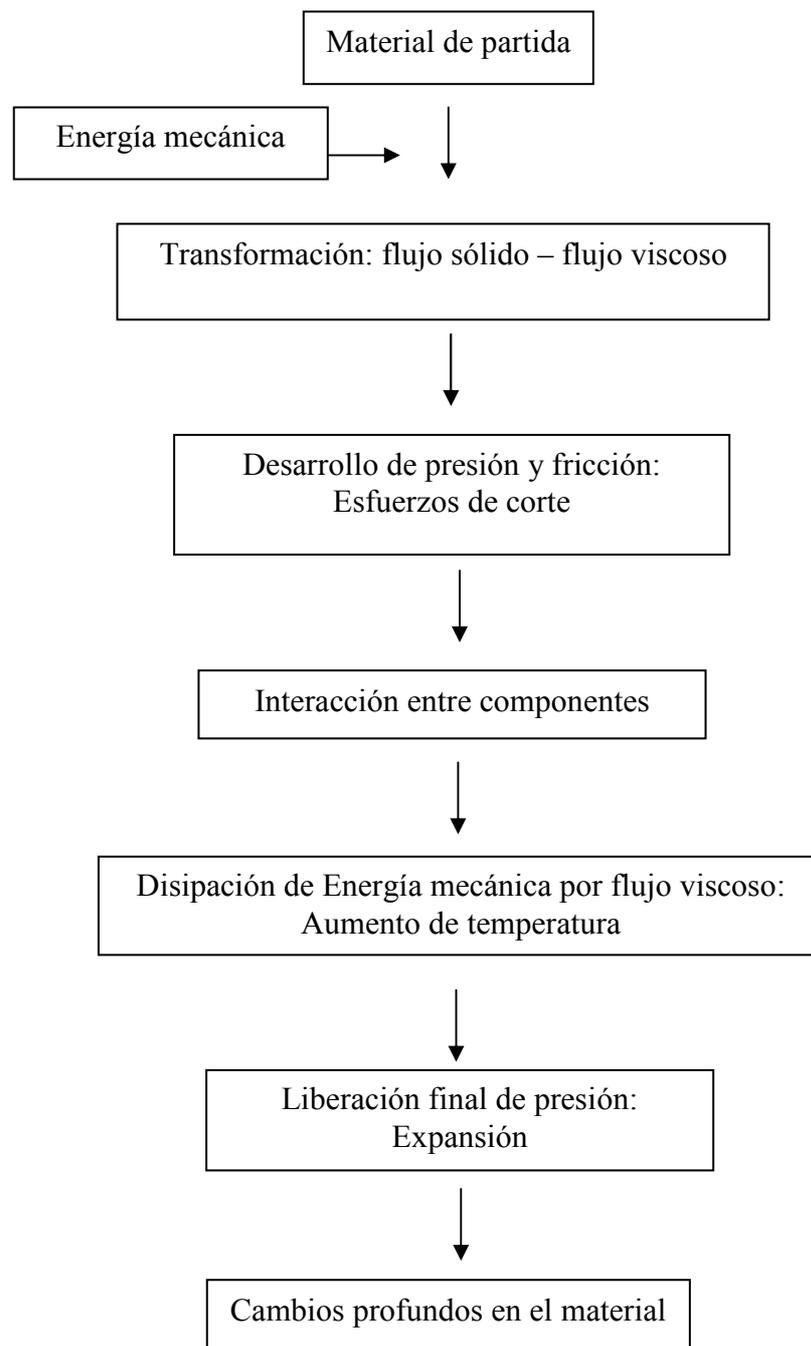


Figura 61: Descripción del proceso de extrusión. Tomado y adaptado de González, Torres, & De Greef (2002).

Los cambios producidos en los materiales amiláceos durante la extrusión han sido extensamente estudiados, y la complejidad de las transformaciones producidas ha sido analizada por diferentes métodos.

En este trabajo se eligieron cuatro condiciones de extrusión en función de estudios anteriores pero solamente se pudieron llevar a cabo dos de ellas: humedad inicial: 16 y 18 %, y temperatura 160 °C. Para las otras condiciones experimentales (humedad inicial 16 y 18 %, y temperatura 190 °C) el funcionamiento del equipo no fue satisfactorio.

Se realizó la evaluación del proceso de extrusión para cada muestra mediante la determinación del consumo específico de energía mecánica (CEEM) y se determinaron las características fisicoquímicas de los productos obtenidos y de las harinas de los mismos (obtenidas luego de la molienda de los productos) con el fin de evaluar la factibilidad de lograr un producto que pudiera ser aceptado por los consumidores. Sobre las harinas, además, se determinó la actividad antioxidante, y se comparó con la obtenida con las mezclas de harina de frutos y harina de maíz, previamente a ser sometidas al proceso de extrusión.

Las propiedades tales como el CEEM durante el proceso de extrusión (CEEM), el volumen específico de los productos obtenidos, y la solubilidad en agua de las harinas de los productos expandidos se correlacionan y son indicadores del grado de cocción, parámetro directamente relacionado con la digestibilidad (González, Torres y De Greef 2002). La expansión radial es una propiedad relacionada con las características de porosidad del producto expandido y su textura, lo cual impactará en la aceptación del producto por parte de los consumidores (Asare y col., 2004). La absorción de agua está vinculada al grado de gelatinización experimentado por el almidón, el cual está relacionado con la apariencia, el sabor y la textura de los alimentos, y también determinará la aceptabilidad del producto (Gordo y col., 1986; León Ferreira, 2008).

Es importante destacar que en el caso de la extrusión, el término “grado de cocción” está relacionado no sólo con la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por parte de las amilasas, sino también al grado de ruptura o alteración de la integridad del gránulo de almidón, por lo que desde este punto de vista resulta ser un concepto más

amplio que el utilizado en el campo de la nutrición. En general, el grado de cocción es proporcional a la temperatura y a la relación de compresión del tornillo e inversamente proporcional a la humedad y al diámetro de la boquilla. El efecto de la velocidad de rotación del tornillo (rpm) depende del tiempo de residencia como del gradiente de velocidad impuesto al fluido. Una mayor velocidad de rotación se traduce en un menor tiempo de residencia y por lo tanto en un menor grado de cocción, pero simultáneamente en un mayor gradiente de velocidad y por lo tanto en una mayor intensidad de los esfuerzos de corte producidos con el consiguiente aumento del grado de cocción.

Con respecto al CEEM, en nuestro trabajo se observó que la muestra con menor nivel de humedad inicial (16 %) presentó un mayor CEEM y por lo tanto un mayor nivel de cocción, lo que estaría indicando un mejor grado de digestibilidad del producto.

En cuanto al análisis de las características fisicoquímicas de los productos obtenidos, se observó que la expansión radial fue significativamente mayor ($p < 0,05$) para la muestra con menor nivel de humedad inicial (16 %) en relación a la muestra con mayor nivel de humedad inicial (18 %). Los valores de $2,7 \pm 0,1$ para la primera y $2,18 \pm 0,09$ para la segunda, así lo demuestran. La expansión es una excelente propiedad para evaluar la porosidad de los productos expandidos y se ha establecido que a mayor expansión mejora la textura del producto y existe una mayor aceptación por parte del consumidor. A valores de expansión inferiores a 2,0 le corresponden bajos niveles de cocción y porosidad, y por lo tanto la aceptación del producto no es buena (González, Torres y De Greef, 1986). Si se toma como referencia la harina de maíz, principal materia prima para la elaboración de productos tipo *snack*, la misma presenta un valor de expansión de $4,2 \pm 0,06$ a 150°C .

Por otro lado, el volumen específico, también está directamente relacionado con el nivel de cocción, de ahí que para la muestra con menor nivel de humedad inicial (mayor nivel de cocción) el valor del volumen específico sea significativamente mayor ($p < 0,05$) que para la muestra con mayor nivel de humedad inicial $9,0 \pm 0,4 \text{ g/cm}^3$ y $6,6 \pm 0,4 \text{ g/cm}^3$, respectivamente (**Resultados, pág. 121**). En los productos obtenidos con

harina de maíz se han determinado volúmenes específicos de entre 6,8 y 8,35 cm³/g (González y col., 2004).

En cuanto a las características fisicoquímicas de las harinas obtenidas a partir de los productos extrudidos, cuando se evaluó la solubilidad en agua se obtuvieron valores de $0,370 \pm 0,03$ g/g y $0,370 \pm 0,004$ g/g para las muestras con 16 % y 18 % de humedad inicial, respectivamente (**Resultados, pág. 122**). En general, a menor nivel de humedad inicial de la muestra se observa mayor grado de cocción, y por lo tanto mayor solubilidad en agua, sin embargo, en este caso no se observaron diferencias significativas en esta propiedad. Con respecto a la absorción de agua, la misma está relacionada con la capacidad de hinchamiento de los gránulos de almidón y tiene que ver con la aceptabilidad de los productos. En general, se observa un aumento de absorción de agua acompañado por el aumento en el grado de cocción, siempre y cuando se conserve la morfología de los mismos. Esto permite deducir que la absorción de agua se verá favorecida en la muestra con mayor nivel de humedad inicial y explica los resultados obtenidos (menores esfuerzos de corte en la muestra con 18 % de humedad inicial) (**Resultados, Tabla 8**) (Gordo y col., 1986).

Finalmente se analizó la actividad antioxidante de las harinas de los productos obtenidos y se comparó con la actividad presentada por las mezclas de harinas de maíz y frutos antes del proceso de extrusión. Esta propiedad se expresó como la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC). Se observó que la muestra con mayor nivel de humedad inicial (18 %) mostró un aumento significativo en la actividad antioxidante luego del proceso de extrusión (**Resultados, Tabla 12**).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, los dos productos obtenidos presentaron niveles de cocción y características fisicoquímicas que los convertirían en productos aceptables por los consumidores (González y col., 2004). La muestra con menor nivel de humedad inicial presentó en general mejores condiciones de cocción y textura, por lo que podría llegar a tener mejor aceptación, sin embargo, la muestra con mayor nivel de humedad inicial presentó un aumento en la actividad antioxidante luego del proceso de extrusión.

La principal desventaja que presentaron los productos obtenidos fue su sabor amargo debido probablemente al ilexósido II, una de las principales saponinas presente en los frutos (Taketa, Breitmaier y Schenkel, 2004).

CONCLUSIONES

El cultivo de *Ilex paraguariensis* reviste gran importancia socioeconómica para nuestro país. Las hojas y ramas jóvenes de esta especie son procesadas para la elaboración de la yerba mate. La industrialización del producto comercial genera una gran cantidad de materia orgánica constituida esencialmente por los frutos de esta especie, los cuales deben ser desechados constituyendo en la actualidad un residuo industrial sin aprovechamiento. Se destina una gran cantidad de energía para el secado y recursos humanos y económicos para la separación, traslado y descarte, ocasionando un problema económico y ambiental.

I. El estudio fitoquímico permitió reportar por primera vez los principios activos presentes en los frutos maduros de *I. paraguariensis*:

Compuestos de naturaleza triterpénica:

- a) Ácido ursólico ($0,042 \pm 0,009$ %)
- b) Ácido oleanólico (trazas)
- c) Saponinas derivadas del ácido ursólico ($0,297 \pm 0,001$ %)
- d) Sapogenina triterpénica nueva (λ max. UV 225 nm.)

Polifenoles:

- a) Polifenoles totales ($4,0 \pm 0,1$ %) ^a – ($8,3 \pm 0,4$ %) ^b
- b) Flavonoides:
 - Antocianinas totales (170 ppm, cianidina 3-glucósido mayoritaria)
 - Rutina ($0,037 \pm 0,004$ %) ^{ab}
- c) Ácidos cafeilquínicos:
 - Ácido cafeico ($< 0,005$ %) ^{ab}
 - Ácido clorogénico ($0,535 \pm 0,006$ %) ^a – ($0,440 \pm 0,006$ %) ^b
 - Ácido 3,4-dicafeilquínico ($0,124 \pm 0,001$ %) ^a - ($0,200 \pm 0,005$ %) ^b
 - Ácido 3,5-dicafeilquínico ($0,607 \pm 0,004$ %) ^a - ($0,300 \pm 0,010$ %) ^b
 - Ácido 4,5-dicafeilquínico ($0,399 \pm 0,003$ %) ^a - ($0,430 \pm 0,020$ %) ^b

Metilxantinas:

a) Cafeína ($0,118 \pm 0,001 \%$)^a – ($0,106 \pm 0,002 \%$)^b

b) Teobromina ($0,0125 \pm 0,0002 \%$)^a - ($0,0108 \pm 0,0003 \%$)^b

^a: extractos metanolicos, ^b: extractos acuosos

II. El análisis nutricional permitió identificar y cuantificar por primera vez los principales nutrientes, conocer el perfil de ácidos grasos, analizar los minerales y determinar la composición centesimal.

Ácidos grasos:

a) Ácido oleico ($38,74 \pm 0,75 \%$)

b) Ácido linoleico ($2,21 \pm 0,11 \%$)

c) Ácidos monoinsaturados ($40,01 \%$)

d) Ácidos poliinsaturados ($1,83 \%$)

Minerales (mg/100 g):

a) Potasio (1.324 ± 15)

b) Magnesio (168 ± 15)

c) Calcio (150 ± 12)

d) Hierro ($6,4 \pm 0,5$)

e) Zinc ($2,3 \pm 0,3$)

f) Sodio ($1,3 \pm 0,1$)

g) Cobre ($1,1 \pm 0,1$)

Composicion centesimal:

a) Lípidos ($4,5 \pm 0,3 \%$)

b) Proteínas ($5,5 \pm 0,1 \%$)

c) Carbohidratos ($38,3 \pm 1,2 \%$)

d) Fibra dietaria FDI ($37,6 \pm 1,3 \%$), FDS ($4,4 \pm 0,3 \%$)

III. Los ensayos farmacológicos y toxicológicos realizados sobre los frutos maduros de *I. paraguariensis*, demostraron por primera vez:

Actividad antioxidante:

- a) Actividad antioxidante *in vitro* de los extractos acuosos y metanólicos.
- Capacidad eliminadora de los radicales libres ABTS y DPPH y la actividad inhibidora de la peroxidación lipídica. Participación del ácido clorogénico.
 - Actividad símil enzimática (catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa). Participación del ácido clorogénico en las actividades antes mencionadas.
- b) Actividad antioxidante de los extractos acuosos y metanólicos en un modelo biológico de glándulas submandibulares de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina.
- Capacidad de disminuir las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico) y aumentar la actividad de la enzima peroxidasa.

Acción de los frutos sobre el tránsito intestinal:

Enlentecimiento del tránsito intestinal

Toxicidad aguda:

Ausencia de efectos tóxicos

IV. El desarrollo tecnológico de un producto alimenticio permitió determinar los parámetros fisicoquímicos para la obtención de un producto tipo *snack*, preparado con harina de frutos en mezcla con harina de maíz, con propiedades antioxidantes. Parámetros evaluados:

Proceso de extrusión:

CEEM: M1 (611,51 J/g) y M2 (581,41 J/g)

Productos finales:

- a) Humedad: M1 ($7,85 \pm 0,04$ %) y M2 ($8,676 \pm 0,006$ %)
- b) Expansión radial (E): M1 ($2,7 \pm 0,1$) y M2 ($2,18 \pm 0,09$)
- c) Volumen específico (Ve): M1 ($9,0 \pm 0,4$ g/cm³) y M2 ($6,6 \pm 0,4$ g/cm³)

Harinas de los productos finales:

- a) Humedad: M1 ($8,167 \pm 0,003$ %) y M2 ($9,25 \pm 0,07$ %)
- b) Solubilidad en agua (SBS): M1 (37 ± 3 %) y M2 ($37,0 \pm 0,4$ %)
- c) Absorción de agua: M1 ($5,2 \pm 0,4$ ml/g) y M2 ($6,3 \pm 0,8$ ml/g)
- d) Actividad antioxidante: Se observó un aumento significativo de la actividad antioxidante en M2 luego del proceso de extrusión.
M1: 16 % de humedad inicial, M2: 18 % de humedad inicial

Los productos finales obtenidos presentaron capacidad antioxidante y parámetros fisicoquímicos dentro del rango de aceptabilidad por parte de los consumidores, con excepción del sabor amargo, que debería ser corregido.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis constituyen un aporte al conocimiento científico de los frutos de *I. paraguariensis*. Esperamos que sean de utilidad para el aprovechamiento biofarmacéutico de este residuo de la industria yerbatera y puedan generar un avance de importancia en el área de los cultivos industriales de Argentina.

RESUMEN

Las hojas y ramas jóvenes de *Ilex paraguariensis* constituyen la materia prima para la elaboración del producto comercial “yerba mate”. La cosecha inevitablemente incorpora los frutos presentes en el vegetal, los cuales deben ser separados para alcanzar los estándares de calidad exigidos por las Farmacopeas y Codex Alimentarios. Se generan grandes volúmenes de frutos que actualmente constituyen un residuo de la industria yerbatera; su separación, procesamiento y descarte requieren la utilización de recursos económicos y energéticos.

El objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral fue contribuir al conocimiento científico de los frutos de *I. paraguariensis* y particularmente realizar investigaciones que contribuyan a evaluar el potencial biofarmacéutico de este material vegetal. El trabajo comprende tres partes.

En la Parte I, se realizó el estudio de la composición química de los frutos maduros. Se investigaron los principales grupos fitoquímicos característicos del género *Ilex* y los compuestos de interés nutricional. Se prepararon extractos con solventes de diferente polaridad (hexano, acetona, metanol y agua) los cuales fueron fraccionados y analizados cuali-cuantitativamente utilizando diferentes técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

Los triterpenos presentes se caracterizaron por poseer estructura pentacíclica. Se cuantificaron las saponinas, las que en su mayoría derivaron del ácido ursólico y se caracterizó una estructura sin antecedentes previos. Se encontraron ácido ursólico (mayoritario) y ácido oleanólico en forma libre. Las metilxantinas (cafeína y teobromina) se hallaron presentes en concentraciones diez veces menores a las reportadas para la yerba mate. El estudio de polifenoles destacó una mayor concentración del ácido clorogénico y de los isómeros 3,5-dicafecilquínico y 4,5-dicafecilquínico con respecto al isómero 3,4-dicafecilquínico y al ácido cafeico. También se valoró el flavonoide rutina. Se identificaron antocianinas y se valoró su contenido en los frutos frescos. La cianidina 3-glucósido fue la mayoritaria dentro de este grupo. Los minerales más abundantes fueron: potasio, calcio, magnesio y hierro. En menores cantidades se hallaron presentes: zinc, cobre y sodio. Entre los ácidos grasos insaturados, se destacó el ácido oleico y en menor proporción el ácido linoleico. Se

realizó la determinación de la composición centesimal, destacándose el contenido de fibra dietaria insoluble, carbohidratos y proteínas.

En la Parte II, se realizaron ensayos farmacológicos y toxicológicos. Para los ensayos farmacológicos se utilizaron los extractos acuosos y metanólicos obtenidos en la Parte I. Se estudió la participación del ácido clorogénico en los ensayos *in vitro*. Se demostró la actividad antioxidante de los extractos y la participación del ácido clorogénico en la inhibición de la peroxidación lipídica y en la capacidad de eliminar los radicales libres ABTS y DPPH. Los extractos también mostraron una actividad similar enzimática (catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa). El ácido clorogénico estaría involucrado solamente en la actividad similar a catalasa. Otros ensayos farmacológicos de actividad antioxidante se realizaron utilizando un modelo biológico de glándulas submandibulares de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. Se analizó el efecto sobre la concentración de EROs y sobre la actividad de las enzimas peroxidasa y superóxido dismutasa. Los extractos demostraron tener un efecto protector sobre las glándulas, evidenciado por la disminución de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno y por el aumento en la actividad de la enzima peroxidasa.

Los ensayos farmacológicos *in vivo* mostraron la capacidad de los frutos de provocar un enlentecimiento en el tránsito intestinal en ratones.

Los ensayos de toxicidad aguda demostraron ausencia de efectos tóxicos.

En la Parte III, se realizó un desarrollo tecnológico. Se elaboró por extrusión un producto alimenticio tipo *snack*, utilizando harina de frutos en mezcla con harina de maíz y se determinó las propiedades antioxidantes del producto final. El producto alimenticio obtenido presentó características aceptables en cuanto a textura, nivel de cocción y propiedades antioxidantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aal, E. S., Young, C. & Rabalski, I., 2006. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple and Red Cereal Grains. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 54: 4696-4704.
- Abdul-Hamid, A. & Luan, Y.S., 2000. Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food Chemistry* 68(1): 15-19.
- Agbor, G. A., Vinson, J. A. & Donnelly, P. E., 2014. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* 3(8): 147-156.
- Agriculture and Agri-Food Canada. En: <http://www.agr.gc.ca/eng/industry-markets-and-trade/statistics-and-market-information/by-product-sector/functional-foods-and-natural-health-products/functional-foods-and-natural-health-products-canadian-industry/what-are-functional-foods-and-nutraceuticals-/?id=1171305207040> (Acceso: 13-02-14).
- Aguilera Ortíz, M., Reza Vargas, M. del C., Chew Madinaveitia, R. G. & Meza Velásquez, J. A., 2011. Propiedades Funcionales de las Antocianinas. *Revista Biotecnia* 12(2): 16-22.
- Ajayi, I. A., Oderinde, R. A., Kajogbola, D. O. & Uponi, J. I., 2006. Oil content and fatty acid composition of some underutilized legumes from Nigeria. *Food Chemistry* 99(1): 115-120.
- Akihisa, T., Kawashima, K., Orido, M., Akazawa, H., Matsumoto, M., Yamamoto, A., Ogihara, E., Fukatsu, M., Tokuda, H. & Fuji, J., 2013. Antioxidative and melanogenesis-inhibitory activities of caffeoylquinic acids and other compounds from Moxa. *Chemistry and Biodiversity* 10(3): 313-327.

- Alexander, B., Browse, D. J., Reading, S. J. & Benjamin, I. S., 1999. A simple accurate mathematical method for calculating of the EC50. *Journal of Pharmacology and Toxicology* 41: 55-58.
- Alfadda, A. A. & Sallam, R. M., 2012. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2012, Article ID 936486.
- Alonso, E., Bassagoda M. J., & Ferreira F., 1992. Yuyos. Uso racional de las plantas medicinales. Montevideo: Fin de Siglo, 1992.
- Alonso,R., Aguirre, A. & Marzo, F., 2000. Effects of extrusion and tradicional processing methods on antinutrients and in Vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry* 68: 159-165.
- Amakura, Y., Yoshimura, M., Yamakami, S. & Yoshida, T., 2013. Isolation of phenolic constituents and characterization of antioxidant markers from sunflower (*Helianthus annuus*) seed extract. *Phytochemistry Letters* 6: 302–305.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M., 2003. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 7915-7922.
- Andersen, T. & Fogh, J., 2001. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 14(3): 243-250.
- Anesini, C., Ferraro, G. & Filip, R., 2006. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. *Food Chemistry* 97 (2006) 459–464.

- Anesini, C., Turner, S., Cogoi, L. & Filip, R., 2012. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). *LWT - Food Science and Technology* 45(2): 299-304.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. & Robards, K., 2001. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* 127: 183-198.
- Arai, S. 1996. Studies on functional foods in Japan – state of the art. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60: 9–15.
- Arai, S., Yasuoka, A. & Abe, K., 2008. Functional food science and food for specified health use policy in Japan: state of the art. *Current Opinion in Lipidology* 19(1): 69-73.
- Arango, M. C., Isaza, G., Bohórquez, A., Chica, L. F., López, H., 2005. Determinación de la toxicidad subaguda de la *Zebrina pendula* en ratones. *Biosalud* 4: 56-66.
- Arçari, D. P., Bartchewsky, W., Dos Santos, T. W., Oliveira, K. A., Funck, A., Pedrazzoli, J., De Souza, M. F. F., Saad, M. J., Bastos, D. H. M., Gambero, A., Carvalho, P. D. O. & Ribeiro, M. L., 2009. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity* 17(12): 2127-2133.
- Arthur, J. R., 2000. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57: 1825–1835.
- Arçari, D. P., Bartchewsky, W. Jr., Dos Santos, T. W., Oliveira, K. A., DeOliveira, C. C., Gotardo, E. M., Pedrazzoli, P. Jr., Gambero, A., Ferraz, L. F. C., Carvalho, P. de O. & Ribeiro, M. L., 2011. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 335(2): 110-115.

Asare, E. K., Sefa-Dedeh, S., Sakyi-Dawson, E. & Afoakwa, E. O., 2004 Application of response surface methodology for studying the product characteristics of extruded rice-cowpea-groundnut blends. *International Journal of Food Science and Nutrition* 55: 431-439.

Assis Jacques, R., dos Santos Freitas, L., Flores Petes, V., Dariva, C., de Oliveira, J.V. & Bastos Caramão, E., 2006. *Journal of Separation Science* 29(18): 2780-2784.

Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 17th edition. Washington DC USA: 2000.

Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 17th edition. Washington DC USA: 2000.

Atabani, A. E., Silitonga, A. S., Badruddin, I. A., Mahlia, T. M. I., Masjuki, H. H. & Mekhilef, S., 2012. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16: 2070-2093.

Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B. & Bak, S., 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72: 435-457.

Azuma, T., Kayano, S., Matsumura, Y., Konishi, Y., Tanaka, Y. & Kikuzaki, H., 2011. Antimutagenic and α -glucosidase inhibitory effects of constituents from *Kaempferia parviflora*. *Food Chemistry* 125: 471-475.

Bastos, D. H. M. & Torres E. A. F. S., 2003. Bebidas à base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição* 26: 77-89.

Becherel, P. A., Chosidow, O., LeGoff, L., Frances, C., Debre, P., Mossalayi, M. D. & Arock, M., 1997. Inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression by human keratinocytes during acute urticaria. *Molecular medicine* 3: 686-694.

Benowitz, N. L., Jacob, P. 3rd, Mayan, H., & Denaro, C., 1995. Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 58: 684–691.

Berente, B., De la Calle García, Reichenbacher, M. & Danzer, K., 2000. Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods. *Journal of Chromatography A* 871: 95–103.

Berhow, M. A., Cantrell, C. L., Duval, S. M., Dobbins, T. A., Maynes, J., & Vaughn, S. F., 2002. Analysis and quantitative determination of group B saponins in processed soybean products. *Phytochemical Analysis* 13: 343–348.

Betteridge, D. J., 2000. What is oxidative stress? *Metabolism* 49(2 Supl.1): 3-8.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* 5: 9–19.

Blois, M. S., 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200.

Boaventura, B. C. B., Murakami, A. N. N., Prudêncio, E.S., Maraschin, M., Murakami, F. S., Amante, E. R., Amboni, R. D., 2013. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.

Hil.) through freeze concentration technology. *Food Research International* 53: 686–692.

Bojić, M., Haas, V. S., Šarić, D. & Maleš, Z., 2013. Determination of Flavonoids, Phenolic Acids, and Xanthines in Mate Tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.). *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Article ID 658596.

Borré, G. L., Kaiser, S., Pavei, C., Da Silva, F. A., Bassani, V. L. & Ortega, G. G., 2010. Comparison of methylxanthine, phenolics and saponin contents in leaves, branches and unripe fruits from *Ilex paraguariensis* A. ST.-hil (mate). *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 33(3): 362-374.

Bordignon-Luiz, M. T., Gauche, C., Gris, E. F. & Falcao, L. D., 2007. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT-Food Science and Technology* 40: 549-599.

Bouzaza, D., Arhaliass, A., & Bouvier, J. M., 1996. Die design and dough expansion in low moisture extrusion cooking process. *Journal of Food Engineering* 29(2): 139–152.

Bowler, R. P., Barnes, P. J. & Crapo, J. D., 2004. The role of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Chronic obstructive pulmonary disease* 1(2): 255-277.

Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T. & Gugliucci, A., 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of ethnopharmacology* 136: 378– 384.

Bremer Boaventura, B. C., Di Pietro, P. F., Klein, G. A., Stefanuto, A., de Moraes, E. C., de Andrade, F., Wazlawik, E. & da Silva, E. L., 2013. Antioxidant potential of mate

tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic. Journal of Functional Foods 5(3): 1057-1064.

Bridle, P. & Timberlake, C. F., 1997. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. Food chemistry 58: 103-107.

Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J. Jr. & Krause, K. H., 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. Swiss Medical Weekly 142: w13659.

Brigelius-Flohe, R. & Traber, M. G., 1999. Vitamin E: function and metabolism. FASEB Journal 13: 1145–1155.

Burris, K. P., Davidson, P. M., Stewart Jr, C. N. & Harte, F. M., 2011. Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Science 76(6): M456-M462.

Burris, K. P., Davidson, P. M., Neal Stewart Jr., C., Zivanovic, S. & Harte, F. M., 2012. Aqueous extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) as a natural antimicrobial against *Escherichia coli* O157:H7 in a microbiological medium and pH 6.0 apple juice. Journal of Food Protection 75(4): 753-757.

Butterfield, D., Castegna, A., Pocernich, C. B., Drake, J., Scapagnini, G. & Calabrese, V., 2002. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. Journal of Nutritional Biochemistry 13(8): 444.

Cadenas, E., 1997. Basic mechanisms of antioxidant activity. Biofactors 6(4): 391-397.

Cañigüeral, S., Vila, R., & Wichtl, M. (Ed.), 1998. Plantas medicinales y drogas vegetales para infusión y tisana. Milán: OEMF Internacional S. R. L., 1998.

- Carrillo, M. C., Danai, S., Nokubo, M. & Kitani, K., 1991. Derprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life science* 48: 517-521.
- Castilho, R. L., Medronhob, R. A. & Alves, T. L. M., 2000. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 71(1): 45–50.
- Castillejo, G., Bulló, M., Anguera, A., Escribano, J. & Salas-Salvadó, J., 2006. A controlled, randomized, double-blind trial to evaluate the effect of a supplement of cocoa husk that is rich in dietary fiber on colonic transit in constipated pediatric patients. *Pediatrics* 118(3): 641-648.
- Chattopadhyay, D., Dungdung, S. R., Mandal, A. B. & Majumder, G. C., 2005. A potent sperm motility-inhibiting activity of bioflavonoids from an ethnomedicine of Onge, *Alstonia macrophylla* Wall ex A. DC, leaf extract. *Contraception* 71(5): 372-378.
- Chen, L., Tai, W. C. S. & Hsiao, W. L. W., 2015. Dietary saponins from four popular herbal tea exert prebiotic-like effects on gut microbiota in C57BL/6 mice. *Journal of Functional Foods* 17: 892-902.
- Chu, F. F., Doroshov, J. H. & Esworthy, R. S., 1993. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *Journal of biological chemistry* 268(4):2571-2576.
- Claude, B., Morin, Ph., Lafosse, M. & Andre, P., 2004. Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triperpene acids complexes with derivatized β - and γ -cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1049: 37-42.

Clos, E.C. & Bellati, J.I., 1937. Biología floral de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire)". Revista Argentina de Agronomía 4: 273-277.

Código Alimentario Argentino, Ley 18284, Decreto N° 2126/71 reglamentario de la Ley 18.284. En: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp (Acceso 22-06-15).

Cooke, M. S., Evans, M. D., Herbert, K.E. & Lunec J., 2000. Urinary 8-oxo-2V-deoxyguanosine-source, significance and supplements. Free Radical Research 32: 381–97.

Cooper-Driver, G.A., 2001. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. Phytochemistry 56: 229-236.

Corti, A., Franzini, M., Casini, A. F., Paolicchi, A. & Pompella, A., 2008. Vitamin C supply to bronchial epithelial cells linked to glutathione availability in elf — A role for secreted γ -glutamyltransferase? Journal of Cystic Fibrosis 7: 174–178.

Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., Almeida, C., Nogueira, J. M. F. & Romano, A., 2013. Metabolic profile and biological activities of *Lavandula pedunculata* subsp. lusitanica (Chaytor) Franco: Studies on the essential oil and polar extracts. Food Chemistry 141: 2501–2506.

Coulter, T. P. Food: The chemistry of its components. London, Burlington House: The Royal Society of Chemistry, 1984. p. 113.

Courtois, P., 1996. Control of bucal peroxidases by a bacterial NADH-hypothiocyanite oxidoreductase. Bulletin et mémoires de l'Académie royale de médecine de Belgique 151(12): 511-516.

Crapo, J. D., Ouryf, T., Rabouille, C., Slot, J. W. & Chang, L. Y., 1992. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. USA: Proceedings of the National Academy of Sciences, Cell Biology 89: 10405-10409.

de Araújo Mariath, J. E., Coelho, G.C., Pires dos Santos, R., Diefenthaler Heuser, E., Martins Ayub, D. & Cocucci, A. E., 1995. Aspectos Anatômicos e embriológicos em espécies do gênero *Ilex*. En: Winge, H., Ferreira, A.G., de Araújo Mariath, J. E., & Tarasconi, L.C. (Eds.). Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS., p. 263-279.

de la Haba, C., Palacio, J. R., Martínez, P. & Morros, A., 2013. Effect of oxidative stress on plasma membrane fluidity of THP-1 induced macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828: 357–364.

De Moraes, E. C., Stefanuto, A., Klein, G. A., Boaventura, B. C. B., De Andrade, F., Wazlawik, E., Di Pietro, P. F., Maraschino, M. & Da Silva, E. L., 2009. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy . *Journal of agricultural and Food Chemistry* 57(18): 8316-8324.

de Pascual-Teresa, S., Moreno, D. A. & García-Viguera, C., 2010. Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *International Journal of Molecular sciences* 11(4): 1679-1703.

de Souza, L. M., Dartora, E., Scoparo, C. T., Cipriano, T. R., Gorin, P. A. J., Iacomini, M. & Sasaki, G. L., 2011. *Journal of Chromatography A* 1218: 7307-7315.

Dellacasa, E. & Bandoni, A. L., 2001. El Mate. *Revista de Fitoterapia* 4: 269-278.

Deng, Y., Zhao, Y., Padilla-Zakour, O. & Yang, G., 2015. Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L. *Industrial Crops and Products* 74: 803-809.

Dickel, M. L., Rates, S. M., Ritter, M. R., 2007. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 109(1): 60–71.

Ding, H., Hashem, M. & Triggle, C., 2007. Increased oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse: changes in expression of NADPH oxidase subunits and eNOS. *European Journal of Pharmacology* 561(1-3): 121-128.

Durst, R. & Wrolstad, R. E., 2001. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. En: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2001. pp. 33-45.

Dziomba, S., Kowalski, P. & Baogonekczek, T., 2012. Field-amplified sample stacking-sweeping of vitamins B determination in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1267(7): 224-230.

Edwin, G. & Reitz, R., 1967. Aquifoliáceas. En: Reitz, R. (Ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*. I. Fascículo AQUÍ. Itajaí.

Elekofehinti, O. O., 2015. Saponins: Anti-diabetic principles from medicinal plants – A review. *Pathophysiology* 22(2): 95-103.

Ella Missang, C., Guyot, S., & Renard, C. M. G. C., 2003. Flavonols and anthocyanins of bush butter, *Dacryodes edulis* (G. Don) H.J. Lam, Fruit. Changes in their composition during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(25): 7475–7480.

Ellington, A. A., Berhow, M. A., & Singletary, K. W., 2006. Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soya saponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 27: 298–306.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H. & Aykin-Burns, N., 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1 (6): 529-539.

European Medicines Agency. Committee on Herbal Medicinal Products. En: [http://ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal - Community herbal monograph/2010/01/WC500059234.pdf](http://ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2010/01/WC500059234.pdf) (Acceso 6-2-13).

Farmacopea Argentina VII Edición. 2003.

En: <http://www.anmat.gov.ar/fna/volumen3.asp> (Acceso 22-06-15).

Ferrari, R., Guardigli, G., Mele, D., Percoco, G. F., Ceconi, C. & Curello, S., 2004. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Current Pharmaceutical Design* 10(14): 1699-1711.

Ferreira, A. G., Kaspar, R., Ferreira, H. B. & Rosa, L. M., 1983. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hill. *Brasil Forestal* 53: 29-33.

Ferreira, A.G. & Hu, C.Y., 1984. Influência da luz na embriogênese tardia de *Ilex* – Culturas in vitro. Porto Alegre: Anais do XXXIV Congresso Nacional de Botânica, Vol II: 441-449.

Ferreira Leite, M., Martins de Lima, A., Miyuki Massuyama, M. & Otton, R., 2010. Astaxanthin restores the enzymatic antioxidant profile in salivary gland of alloxan-induced diabetic rats. *Archives of Oral Biology* 55: 479-485.

Filip, R., Lopez, P., Coussio, J. & Ferraro, G., 1998. Mate substitutes or adulterants: Study of xanthine content. *Phytotherapy Research* 12 (2): 129-131.

Filip, R., Lotito, S., Ferraro, G. & Fraga, C. G., 2000. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research* 20(10): 1437-1446.

Filip, R., López, P., Giberti, G., Coussio, J. & Ferraro, G., 2001. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 72: 774-778.

Filip, R., Turner, S., Ferraro, G., Anesini, C., 2007. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. *Food and Chemical Toxicology* 45: 649–655.

Filip, R., Davicino, R. & Anesini, C., 2010. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. *Phytotherapy Research* 24(5): 715-719.

Filip R., 2011. Argentine *Ilex* species: A Review on its Chemistry and Biological Activities. En: R. Filip (Ed.). *Multidisciplinary Approaches on Food Science and Nutrition for the XXI Century*. Kerala, India: Transworld Research Network, 2011.

Food Standard Agency. En:

<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/listofukhealthclaims04.pdf> (Acceso 6-2-13).

Garaguso, I. & Nardini, M., 2015. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. *Food Chemistry* 179: 336-342.

Ghadermarzi, M., Moosavi-Movahedi, A. A., 1997. The effects of temperature and pH on the kinetics of reactions between catalase and its suicide substrate hydrogen peroxide. *Italian Journal of Biochemistry* 46(4): 197-205.

Giberti, G. C., 1979. Las especies argentinas del género *Ilex* L. (Aquifoliaceae). *Darwiniana* 22(1-3): 217-240.

Giberti, G. C., 1992. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*). En: Hernandez Bermejo, J. E. & León, J. Cultivos marginados otra perspectiva de 1492. Colección FAO: Producción y protección vegetal N° 26. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Publicado en colaboración con el Jardín Botánico de Córdoba (España) en desarrollo del Programa Etnobotánica 92 (Andalucía 92), 1992. pp. 245-252.

Giberti, G. C., 1994a. Aquifoliaceae. En : Spichiger, R. & Ramella, L. (Eds.). Flora del Paraguay 24. Ginebra, Suiza: Editions des Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Geneve – Missouri Botanical Garden.

Giberti, G. C., 1994b. Aquifoliaceae. En: Flora Fanerogámica de Argentina. Programa Proflora (CONICET). Córdoba, Argentina: Museo Botánico, IMBIV. Fascículo I, p. 157.

Giberti, G. C., 1994c. Maté (*Ilex paraguariensis*). En: Hernández Bermejo J. E. & León J. (Eds.) published in collaboration with the Botanical Garden of Córdoba (Spain) as part of the Etnobotánica 92 Programme (Andalucía, 1992). Neglected crops: 1492 from a different perspective. Rome: Food And Agriculture Organization of The United Nations, 1994.

Giberti, G. C., 1998. Hallazgo de *Ilex brasiliensis* (Aquifoliaceae) en la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 33: 137-140.

Giberti, G.C. 1998b. Plant Resources of South East Asia (PROSEA). 16, 1.

Giberti, G. C. & Gurni, A. A., 2008. Anatomía floral comparada de once especies sudamericanas de *Ilex* L.(Aquifoliaceae) relacionadas con la yerba mate. *Dominguezia* 24(2): 77.

Giberti, G.C., 2008. Aquifoliaceae. En: Zuloaga, F. O., Morrone, O. & Belgrano, M. J. (Eds.). Catálogo de las Plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), Dicotyledoneae: Acanthaceae – Fabaceae (Abarema-Schizolobium). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 2008. Vol. 2, pp 1143-1146.

Gnoatto, S. C. B., Schenkel, E. P. & Basani, V. L., 2005. HPLC Method to Assay Total Saponins in *Ilex paraguariensis* Aqueous Extract. *Journal of Brazilian Chemical Society* 16(4): 723-726.

Gnoatto, S. C. B., Dassonville-Klimpt, A., Da Nascimento, S., Galéra, P., Boumediene, K., Gosmann, G., Sonnet, P. & Moslemi, S. 2008. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43: 1865-1877.

González Torres D., 1992. Catálogo de Plantas Medicinales Usadas en Paraguay. Asunción, Paraguay, pp 371-391.

González, R. J., Torres, R. L. & De Greef, D. M., 2002. Extrusión cocción de cereales. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnología de Alimentos* 36(2): 104-115.

González, R.J., Robutti, J.L., Borrás, F.S., Torres, R.L. & De Greef, D.M., 2004 Effects of endosperm hardness and extrusion temperature on properties obtained with grits from commercial maize cultivars. *Food Science and Technology* 37: 193-198.

- Gordo, N. A., González, R. J., Torres, R. & de Greef, D. M., 1986. Evaluación de almidón de maíz precocido por extrusión-cocción. *Revista de agroquímica y tecnología de alimentos* 26(4): 552-564.
- Gorzalczany, S., Filip, R., Alonso, M. R., Miño, J., Ferraro, G. E. & Acevedo, C., 2001. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *Journal of Ethnopharmacology* 75: 291–294.
- Gorzalczany, S., Cogoi, L., Miño, J., Acevedo, C., Ferraro, G. & Filip, R., 2009. Efecto de los extractos de yerba mate sobre parámetros asociados a trastornos metabólicos inducidos experimentalmente. España: Proceeding II Congreso Iberoamericano de Fitoterapia. *Revista de Fitoterapia* 9 (1): 114.
- Gosmann, G., Schenkel, E. P. & Seligmann, O., 1989. A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. *Journal of Natural Products* 52(6): 1367-1370.
- Gosmann, G., Guillaume, D., Taketa, A. T. C. & Schenkel, E. P., 1995. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. *Journal of Natural Products* 58(3): 438-441.
- Grigelmo-Miguel, N. & Martín-Belloso, O. 1998. Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. *Food Research International* 31(5): 355-361.
- Grondona, E. M., 1954. Historia de la yerba mate. II. Sinonimia, cariólogía y distribución geográfica. *Revista Argentina de Agronomía* 21: 9–24. En: http://www.nature.com/hdy/journal/v84/n6/fig_tab/6886870f1.html (Acceso 31-3-14).
- Gugliucci, A. & Stahl, A. J. C., 1995. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochemistry and Molecular Biology International* 35(1): 47-56.

Gugliucci, A. & Menini, T. 2002. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. *Life Sciences* 72(3-6): 279-292.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Office of Science and Health Reports, DPR/NIH (1978). 1980. DHEW Publication no. (NIH)80-23, Revised 1978.

Gupta, M. (Ed.). 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Colombia: CYTED-SECAB, 1995.

Gutteridge, J. M. C. & Halliwell, B., 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393: 561-564.

Hakamata, W., Kurihara, M., Okuda, H., Nishio, T. & Oku, T., 2009. Design and screening strategies for α -glucosidase inhibitors based on enzymological information. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 9: 3–12.

Hannan, M. A., Ali, L., Rokeya, B., Khaleque, J., Akhter, M., Flatt, P. R. & Abdel-Wahab, Y. H., 2007. Soluble dietary fibre fraction of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed improves glucosa homeostasis in animal models of type 1 and type 2 diabetes by delaying carbohydrate digestion and absorption, and enhancing insulin action. *British Journal of Nutrition* 97(3): 514-521.

Hartwig, V. G., Brumovsky, L. A. & Fretes, M. R., 2012. A Total Polyphenol Content of Mate (*Ilex paraguariensis*) and Other Plants-derived Beverages. *Journal of Food Research* 1(3).

Haslam, E., 1995. Fruit and floral pigmentation. Review of Progress in Colaboration and Related Topics 25(1): 18-28.

He, J. & Giusti, M. M., 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology* 1: 163-187.

He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J. & Duan, C. Q., 2012. Anthocyanins and Their Variation in Red Wines II. Anthocyanin Derived Pigments and Their Color Evolution. *Molecules* 17: 1483-1519.

Heck, C. I. & de Mejía, E. G., 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *Journal of Food Science* 72(9): 138-151.

Heinrichs, R. & Malavolta, E., 2001. Mineral Composition of a Commercial Product From Mate-Herb (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Ciência Rural* 31(5): 781-785.

Hertel, R. J. G., 1954. Contribuição para Fitologia teórica, alguns conceitos na Carpologia. *Humanitas* 4(4): 1-43.

Herzog, V. & Fahimi, H. D., 1973. A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donors. *Analytical Biochemistry* 55: 554-562.

Hutchings, J. H. *Food Color and Appearance*. 2nd Ed. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, Inc., 1999.

Ibrahim, M. A., Aliyu, A. B., Meduteni, K. & Yunusa, I., 2013. Saponins-rich fraction of *Calotropis procera* leaves elicit no antitrypanosomal activity in a rat model. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3(7): 569-572.

Imai, H. & Nakagawa, Y., 2003. Biological Significance of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (Phgpx, Gpx4) in Mammalian Cells. *Free Radical Biology & Medicine* 34(2): 145-169.

- INDEC: Censo Nacional Agropecuario, 2002. Cultivos industriales: superficie implantada por cultivo, según período de ocupación y provincia. Total del país. En: <http://www.indec.gov.ar> (Acceso: 31-3-14).
- Ives, S.A. 1923. Maturation and germination of seeds of *Ilex opaca*. Botanical Gazette 76: 61-77.
- Jacques, R. A., Santos, J. G., Dariva, C., Oliveira, J. V. & Caramão, E. B., 2007. GC/MS characterization of mate tea leaves extracts obtained from high-pressure CO₂ extraction. Journal of Supercritical Fluids 40(3): 354-359.
- Jurkovič, S., Osredkar, J. & Marc, J., 2008. Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes. Biochemia Medica 18(2): 162-174.
- Kasai, H., 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2V-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. Mutation Research 387: 147– 163.
- Kaur, V. I. & Saxena, P. K., 2004. Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps. Bioresource Technology 91(1): 101–104.
- Keller, G.-A., Warner, T. G., Steimert, K. S. & Hallewell, R. A., 1991. Cu, Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. USA: Proceedings of the National Academy of Sciences. Cell Biology 88: 7381-7385.
- Keller, H. A. & Giberti, G. C., 2011. Primer registro para la flora argentina de *Ilex affinis* (Aquifoliaceae), sustituto de la “yerba mate”. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 46(1-2): 187-194.

Kerr, S., Brosnan, M. J., McIntyre, M., Reid, J.L., Dominiczak, A. F. & Hamilton, C.A., 1999. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension* 33(6):1353-1658.

Khlebnikov, A. I, Schepetkin, I.A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N. & Quinn, M.T., 2007. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15: 1749-1770.

Kin, Y.-I., 2000. A technical review: Impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology* 118: 1235- 1257.

Kondo, M., MacKinnon, S. L., Craft, C. C., Matchett, M. D., Hurta, R. A. & Neto, C. C., 2011. Ursolic acid and its esters: occurrence in cranberries and other *Vaccinium* fruit and effects on matrix metalloproteinase activity in DU145 prostate tumor cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(5): 789-796.

Kuniyoshi, Y., S., 1983. Morfologia de semente e de germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta de araucária. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Eng. Florestal. Curitiba: UFPr.

Kunkel, S. D., Suneja, M, Ebert, S. M., Bongers, K. S., Fox, D. K., Malmberg, S. E., Alipour, F., Shields, R. K. & Adams, C. M., 2011. mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. *Cell Metabolism* 13(6):627-638.

Kumar, R., Sharma, R. J., Bairwa, K., Roy, R. K. & Kumar, A., 2010. Pharmacological review on natural antidiarrhoeal agents. *Der Pharma Chemica* 2(2): 66-93.

Laufenberg, G., Kunz, B. & Nystroem, M., 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology* 87(2): 167-198.

Lee, J., Durst, R. W. & Wrolstad, E., 2005. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC Internacional* 88 (5): 1269-1278.

Lee, S., Simons, A. L., Murphy, P. A., & Hendrich, S., 2005b. Soya saponins lowered plasma cholesterol and increased fecal bile acids in female golden Syrian hamsters. *Experimental Biology and Medicine* 230: 472–478.

León Ferreyra, J., 2008. Presentación. *Ingeniería Industrial* 26.

Liu, Y., Zhao, H., Li, H., Kalyanaraman, B., Nicolosi, A. C. & Gutterman, D. D., 2003. Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circulation Research* 93(6): 573–580.

Liu, Q., Wang, S. & Cai, L., 2014. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage. *Journal of Diabetes Investigation* 5(6): 623–634.

Loizeau, P. A., Barriera, G., Manen, J.F. & Broennimann, O., 2005. Towards an understanding of the distribution of *Ilex* L. (Aquifoliaceae) on a World-wide scale. *Biologiske Skrifter* 55: 501-520.

Longo, L. & Vasapollo, G., 2005. Determination of Anthocyanins in *Ruscus aculeatus* L. Berries. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 53: 475-479.

- López-Huertas, E., 2010. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological Research* 61: 200–207.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A. & Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lunceford, N. & Gugliucci, A., 2005. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia* 76(5): 419-427.
- Malhotra, S., Rana, S. V., Sinha, S. K. & Khurana, S., 2004. Dietary fiber assessment on patients with irritable bowel síndrome from northern India. *Indian Journal of Gastroenterology* 23(6): 217-218.
- Manios, T., 2004. The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete. *Environment International* 29(8): 1079–1089.
- Markowicz Bastos, D. H., Ishimoto, E. Y., Ortiz M. Marques, M., Ferri, A. F. & Torres, E. A. F. S., 2006. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 538–543.
- Markowicz Bastos, D. H., Moura de Oliveira, D., Lobato Teixeira Matsumoto, R., de Oliveira Carvalho, P. & Lima Ribeiro, M., 2007. Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 1(1): 37-46.
- Martindale 32th Ed.. The complete drug referente. Kathleen Parfit (Ed). London: Pharmaceutical Press, 1999.

Martinet, A., Ndjoko, K., Terreaux, C., Marston, A. Hostettmann, K. & Schutz, Y., 2001. NMR and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. *Phytochemical análisis* 12(1): 48-52.

Martinez Crovetto, R., 1980. Yerba mate: usos no tradicionales y posibilidades. *Participar* 2(12): 58-61.

Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. & Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16: 577–586.

Masuda, Y., Uemura, S., Ohashi, R., Nakanishi, A., Takegoshi, K., Shimizu, T., Shirasawa, T. & Irie, K., 2009. Identification of physiological and toxic conformations in Aβ₄₂ aggregates. *ChemBioChem* 10(2): 287-295.

Mayo Clinic. En: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/periodontitis/basics/risk-factors/con-20021679> (Acceso 24-08-15)

Mazzafera, P. R., 1994. Caffeine, Theobromine and Theophylline Distribution In *Ilex paraguayensis*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 6(2):149-151.

McEligot, A J., Largent, J., Ziogas, A., Peel, D. & Anton-Culver, H., 2006. Dietary fat, fiber, vegetable and micronutrients are associated with overall survival in postmenopausal women diagnosed with breast cancer. *Nutrition and Cancer* 55(2): 132-140.

Menini, T., Heck, C., Schulze, J., De Mejia, E. & Gugliucci, A., 2007. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. *Planta Medica* 73(11): 1141-1147.

- Mikanagi, Y., Saito, N., Yokoi, M. & Tatsuzawa, F., 2000. Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections *Cinnamomeae* (=Rosa), *Chinenses*, *Gallicanae* and some modern garden roses. *Biochemical Systematics and Ecology* 28(9): 887–902.
- Milioli, E. M., Cologni, P., Santos, C. C., Marcos, T. D., Yunes, V. M., Fernández, M. S., Schoenfelder, T. & Costa-Campos, L., 2007. Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. *Phytotherapy Research* 21(8): 771-776.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Informe “Yerba Mate” En: http://64.76.123.202/SAGPYA/economias_regionales/_infusiones/_cadenas/yerba_mate.htm (Acceso 4-4-14).
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Informe N° 27 sobre Yerba mate, Agosto 2010. En: http://64.76.123.202/SAGPYA/economias_regionales/_infusiones/_informes/_ym/ym_27_08_10.pdf (Acceso: 31-3-14).
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Informe: Yerba mate value chain, Julio 2013. En: http://64.76.123.202/site/economias_regionales/producciones_regionales/01_origen_vegetal/05_infusiones/_informes/yerba_mate_chain_argentina_July_2013.pdf (Acceso: 4-4-14).
- Miyamae, Y., Kurisu, M., Murakami, K., Han, J., Isoda, H., Irie, K. & Shigemori, H., 2012. Protective effects of caffeoylquinic acids on the aggregation and neurotoxicity of the 42-residue amyloid b-protein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20: 5844–5849.

Muccillo Baisch, A. L., Johnston, K. B. & Paganini Stein, F. L., 1998. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. *Journal of Ethnopharmacology* 60(2): 133-139.

Müller, V., Chávez, J. H., Reginatto, F. H., Zucolotto, S. M., Niero, R., Navarro, D., Yunes, R. A., Schenkel, E. P., Barardi, C. R. M., Zanetti, C. R. & Simões, C. M. O., 2007. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. *Phytotherapy Research* 21(10): 970-974.

Murakami, K., Sasaki, S., Okubo, H., Takahashi, Y., Hosoi, Y & Itabashi, M., 2007. Dietary fiber intake, dietary glycemic index and load, and body mass index: a cross-sectional study of 3931 Japanese women aged 18-20 years. *European Journal of Clinical Nutrition* 61(8): 986-995.

National Institute of Dental and Craniofacial Research. Periodontal (Gum) Disease: Causes, Symptoms, and Treatments. NIH Publication No. 13-1142. September 2013.

Nelson, D. P. & Kiesow, L.A., 1972. Enthalphy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Analytical Biochemistry* 49: 474-478.

Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios, Anexo B (CODEX STAN 192-1995). En <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/> (Acceso 22-06-15).

Norma ISO 14502-1: 2005. International Organization for Standardization. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.

Norma ISO 12966-2: 2011. Animal and vegetable fats and oils. Gas chromatography of fatty acid methyl esters. Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids.

Ohama, H., Ikeda, H. & Moriyama, H., 2006. Health foods and foods with health claims in Japan. *Toxicology* 221(1): 95–111.

Ojewole, J. A., Awe, E. O. & Chiwororo, W. D., 2008. Antidiarrhoeal activity of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rodents. *Journal of Smooth Muscle Research* 44 (6): 195–207.

Omode, A. A., Fatoki, O. S. & Olaogun, A., 1995. Physicochemical properties of some underexploited and nonconventional oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(11): 2850-2853.

Ortega, G. M. & Guerra, M., 2006. Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos. Parte II. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 40(3): 3-11.

Osawa, T. & Namiki, M., 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agricultural Biological Chemistry* 45: 735-740.

Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K. & Levine, M., 2003. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition* 22(1): 18-35.

Pamplona Mosimann, A.L., Wilhelm-Filho, D. & Da Silva, E.L., 2006. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *BioFactors* 26(1): 59-70.

Pansawat, N., Jangchud, K., Jangchud, A., Wuttijummong, P., Saalia, F. K., Eitenmiller, R. R. & Phillips, R. D., 2008. Effects of extrusion condition on secondary extrusion variables and physical properties of fish, rice-based snacks. *LWT-Food Science and Technology* 41: 632-641.

Paquette, L. A. *Fundamentos de Química Heterocíclica*. Quinta reimpressão. Grupo Noriega Editores. México D.F.: Edidtorial Limusa S.A. de C.V., 1999.

Pathak, A. K., Bhutani, M., Nair, A. S., Ahn, K. S., Chakraborty, A., Kadara, H., Guha, S., Sethi, G. & Aggarwal, B. B., 2007. Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. *Molecular Cancer Research* 5(9): 943-955.

Pazmino-Duran, A., Giusti, M., Wrolstad, R. & Gloria, M., 2001. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potencial food colorants. *Food Chemistry* 75: 211-216.

Peixoto, M. P. G., Kaiser, S., Verza, S. G., De Resende, P. E., Treter, J., Pavei, C., Borré, G. L. & Ortega, G. G., 2012. LC-UV assay method and UPLC/Q-TOF-MS characterisation of saponins from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Mate) unripe fruits. *Phytochemical Analysis* 23(4): 415-420.

Peralta, I. N., Cogoi, L., Filip, R. & Anesini, C., 2013. Prevention of Hydrogen Peroxide-Induced Red Blood Cells Lysis by *Ilex paraguariensis* Aqueous Extract: Participation of Phenolic and Xanthine Compounds. *Phytotherapy Research* 27(2): 192-198.

Pereira, D. F., Kappel, V. D. Cazarolli, L. H., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Guesser, S. M., Da Silva, E. L. & Silva, F. R. M. B., 2012. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. *Phytomedicine* 19(10): 868-877.

Peres, R. G., Tonin, F. G., Tavares, M. F. M. & Rodriguez-Amaya, D. B., 2013. 3,4 y 4,5-dicafeilquínicos HPLC-DAD-ESI/MS identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity. *Molecules* 18(4): 3859-3871.

Pérez, A. J., Hassan, E. M., Pecio, L., Omer, E. A., Kucinska, M., Murias, M. & Stochmal, A., 2015. Triterpenoid saponins and C-glycosyl flavones from stem bark of *Erythrina abyssinica* Lam and their cytotoxic effects. *Phytochemistry Letters* 13: 59-67.

Petersen, S. V., Oury, T. D., Ostergaard, L., Valnickova, Z., Wegrzyn, J., Thøgersen, I.B., Jacobsen, C., Bowler, R.P., Fattman, C.L., Crapo, J. D. & Enghild, J. J., 2004. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. *The Journal of Biological Chemistry* 279(14): 13705-13710.

Physician Desk Reference for Herbal Medicines, 1998. Montvale, New Jersey: Medical Economics Company.

Poljsak, B., Šuput, D. & Milisav, I., 2013. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Article ID 956792, 11 pages.

Powell, M., Savolainen, V., Cuénoud, P., Manen, J.-F. & Andrews, S., 2000. The mountain holly (*Nemopanthus mucronatus*: Aquifoliaceae) revisited with molecular data. *Kew Bulletin* 55: 341–347.

Quinlan, G. J., Evans, T. W. & Gutteridge, J. M., 1994. Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radical Research* 20(5): 289-298.

Rahman, I., Skwarska, E., Henry, M., Davis, M., O'Connor, C. M., FitzGerald, M. X., Greening, A. & MacNee, W., 1999. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radical Biology & Medicine* 27(1-2): 60-68.

Ramallo, L. A., Smorcowski, M., Valdez, E. C., Paredes, A. M. & Schmalko, M. E., 1998. Contenido nutricional del extracto acuoso de la yerba mate en tres formas diferentes de consumo. *La alimentación Latinoamericana* 225: 48-52.

Ramirez-Mares, M.V., Chandra, S. & De Mejia, E.G., 2004. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 554(1-2): 53-65.

RDA and NAS/NRC, Recommended Dietary Allowances. 10th edition . National Academy of Sciences/National Research Council. Washington, DC, USA: 1989.

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

Real Farmacopea Española, 3a. Edición, Madrid: 2005.

Reissek, S. 1861. Celastrineae, Ilicineae Et Rhamneae. En: C.F.P. Martins. *Flora Brasiliensis. Monachii*, vol. XI(1).

Rivelli, D. P., Da Silva, V. V., Ropke, C. D., Miranda, D. V., Almeida, R.L., Sawada, T. C. H. & Barros, S. B. D. M., 2007. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH• reduction.

Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 43(2): 215-222.

Rodríguez-Saona, L. & Wrolstad, R. E., 2001. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. En: Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc., UNIT F1.1.

Romero, A. L., West, K. L., Zern, T. & Fernandez, M. L., 2002. The seeds from *Plantago ovata* lower plasma lipids by altering hepatic and bile acid metabolism in guinea pigs. *Journal of Nutrition* 132(6): 1194-1198.

Rowlands, J. C., Berhow, M. A., & Badger, T. M., 2002. Estrogenic and antiproliferative properties of soy saponins in human breast cancer cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1767–1774.

Rubio-Moraga, A., Gómez-Gómez, L., Trapero, A., Castro-Díaz, N. & Ahrazem, O., 2013. Saffron corm as a natural source of fungicides: The role of saponins in the underground. *Industrial Crops and Products* 49: 915-921.

Sanches-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and agriculture* 76: 270-276.

Saval, S., 2012. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *BioTecnología* 16(2): 14-46.

Sayre, L. M., Smith, M. A. & Perry, G., 2001. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Current Medicinal Chemistry* 8(7): 721-738.

Schaafsma, G., 2004. Health claims, options for dietary fiber. En: van der Kamp, J. M., Asp, N. G., Miller, J. & Schaafsma, G. (Eds.). Dietary Fiber. Wageningen, the Netherlands: Academia Publishers, 2004. pp. 27-38.

Schinella, G., Fantinelli, J. C. & Mosca, S. M., 2005. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: Evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. Clinical Nutrition 24(3): 360-366.

Shipp, J. & Abdel-Aal, S. M., 2010. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. The Open Food Science Journal 4: 7-22.

Schoenberg & Dinoutti, 1989. Ontogenese do fruto de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hilaire. En: Estefano Francisco Jablonski y João Carlos Jaszczerski Eds. Estudos de Biología. Número XXII. Pontificia Universidade Católica do Paraná. Paraná: Julio de 1989. Ed. EDUCA.

Schopf, R. E., Mattar, J., Meyenburg, W., Scheiner, O., Hammann, K. P. & Lemmel, E. M., 1984. Measurement of the respiratory burst in human monocytes and polymorphonuclear leukocytes by nitro blue tetrazolium reduction and chemiluminescence. Journal of Immunological Methods 67(1): 109-117.

Schubert A., Pereira, D. F, Zanin F.F., Alves, S. H., Beck, R. C. & Athayde, M. L., 2007. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Pharmazie 62(11): 876-880.

Scipioni, Ferreira, & Schmalko, 2007. Physicochemical characterization of different trademarks of compound yerba maté and their herbs. Brazilian Archives of Biology and Technology 50(4): 735-741.

Sharma, A. & Sharma, S., 2011. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Periodontics: A Review. *International Journal Of Dental Clinics* 3(2): 44-47.

Sharma, S., Ali, A., Ali, J., Sahni, J.K. & Baboota, S., 2013. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug de-livery. *Expert Opin on Investigational Drugs* 22:1063-1079.

Stein, F. L. P., Schmidt, B., Furlong, E. B., Soares, L. A., Soares, M. C. F., Vaz, M. R. C. & Baisch, A. L.M., 2005. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biological Research for Nursing* 7(2): 146-156.

Steinmetz, K. A. & Potter, J. D., 1991a. Vegetables, fruits and cancer I. Mechanisms, *Cancer Causes Control* 2: 325-357.

Stevens, P. F., 2001 onwards. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008 [and more or less continuously updated since]. En: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> Marzo 2012. (Acceso Junio 2012).

Strack, D. & Wray, V. The Anthocyanins. En: Harbone, J. B. (Ed.). *The Flavonoides. Advances in Research Since 1986*. Boca Raton FL: CRC Press, 1994.

Taira, J., Taira, K., Ohmine, W. & Nagata, J., 2013. 3,4; 3,5 y 4,5-dicafetilquínicos Mineral determination and anti-LDL oxidation activity of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *Journal of Food Composition and Analysis* 29: 117–125.

Taketa, A. T. C., Breitmaier, E & Schenkel, E. P., 2004. Triterpenes and Triterpenoidal Glycosides from the Fruits of *Ilex paraguariensis* (Maté). *Journal of Brazilian Chemical Society* 15(2): 205-211.

Tenorio Sanz, M. D. & Torija Isasa, M. E., 1991. Mineral elements in mate herb (*Ilex paraguariensis* St. H.). Archivos Latinoamericanos de Nutrición 41(3): 441-454.

The Ayurvedic Pharmacopoeia of India. En: <http://www.ayurveda.hu/api/API-Vol-1.pdf>. (Acceso 10-07-15).

Tránsito López Luengo, M., 2003. Drogas con bases xánticas. Fitoterapia 22(4).

Turner, S., Cogoi, L., Isolabella, S., Filip, R. & Anesini, C., 2011. Evaluation of the Antioxidant Activity and Polyphenols Content of *Ilex paraguariensis* (Mate) During Industrialization. Advanced Journal of Food Science & Technology 3(1): 23-30.

Uddin, S. J., Shilpi, J. A., Alam, S. M. S., Alamgir, M., Rahman, M. T. & Sarker, S. D., 2005. Antidiarrhoeal activity of the methanol extract of the barks of *Xylocarpus moluccensis* in castor oil and magnesium sulphate-induced diarrhoea models in mice. Journal of Ethnopharmacology 101: 139–143.

Valavanidis, A., Vlachogianni, T. & Fiotakis, C., 2009. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicological Review 27(2): 120-139.

Valls, J., Pasamontes, N., Pantaleón, A., Vinaixa, S., Vaqué, M., Soler, A., Millán, S., Gómez, X. K.G. & Ramawat, J.M. Prospects of Functional Foods/Nutraceuticals and Markets. En: Mérillon (Eds.) Natural Products. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. pp 2491-2525.

Van Rosendaal, G. M., Shaffer, E. A., Edwards, A. L. & Brant, R., 2004. Effect of time of administration on cholesterol-lowering by *psyllium*: a randomized cross-over study in

normocholesterolemic or slightly hypercholesterolemic subjects. *Nutrition Journal* 3: 17.

Vasconcellos, A. 2014. Alimentos funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. *The World of Food Science*. En:
http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm (Acceso: 14-02-1).

Vieira, M. A., Rovaris, A. A., Maraschin, M., De Simas, K. N., Pagliosa, C. M., Podestá, M., Amboni, R. D. M. C., Barreto, P. L. M. & Amante, E. R., 2008. Chemical characterization of candy made of Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 4637–4642.

Wagner, G. J., 1982. Cellular and Subcellular Location in Plant Metabolism. En: Creasy, L. & Hrazdina, G. (Ed.). *Recent advances in Phytochemistry*. New York: Plenum Press, 1982. pp. 1-45.

Wakai, K., Date, C., Fukui, M., Tamakoshi, K., Watanabe, Y., Hayakawa, N., Kojima, M., Kawado, M., Suzuki, K., Hashimoto, S., Tokudome, S., Ozasa, K., Suzuki, S., Toyoshima, H., Ito, Y. & Tamakoshi, A., 2007. Dietary fiber and risk of colorectal cancer in the Japan collaborative cohort study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 16(4): 668-675.

Wang, J., Zhou, H., Jiang, Z., Wong, Y. F., & Liu, L., 2008. *In vivo* anti-inflammatory and analgesic activities of a purified saponin fraction derived from the root of *Ilex pubescens*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 31: 643–650.

Waris, G. & Ahsan, H., 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* 5: 14.

Warnholtz, A., Nickenig, G., Schulz, E., Macharzina, R., Bräsen, J.H., Skatchkov, M., Heitzer, T., Stasch, J.P., Griendling, K.K., Harrison, D.G., Böhm, M., Meinertz, T., Münzel, T., 1999. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99(15): 2027–2033.

Weisiger, R. A. & Fridovich, I., 1973. Superoxide Dismutase Organelle Specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 248: 3582-3592.

Willett, W. C., 2006. The Mediterranean diet: science and practice. *Department of Nutrition Public Health Nutrition* 9(1A): 105–110.

Wua, L. L., Chioud, C. C., Change, P.-Y. & Wu, J. T., 2004. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta* 339: 1–9.

Xiao, J., Kai, G., Yamamoto, K. & Chen, X., 2013. Advance in Dietary Polyphenols as α -Glucosidases Inhibitors: A Review on Structure-Activity Relationship Aspect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53 (8): 818-836.

Xiong, J., Li, S., Wang, W., Hong, Y., Tang, K. & Luo, Q., 2013. Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. leaves. *Food Chemistry* 138: 327–333.

Xu, G.-H., Kim, Y.-H., Choo, S.-J., Ryoo, I.-J., Yoo, J.-K., Ahn, J.-S. & Yoo, I.-D., 2009. Chemical constituents from the leaves of *Ilex paraguariensis* inhibit human neutrophil elastase. *Archives of Pharmacal Research* 32(9): 1215-1220.

- Xu, X.-H., Su, Q. & Zang, Z.-H., 2012. Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid by RP-HPLC in the leaves of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2(3): 238–240.
- Yanamandra, N., Berhow, M., Konduri, S., Dinh, D., Olivero, W., Nicolson, G. & Rao, J. S., 2003. Triterpenoids from *Glycine max* decrease invasiveness and induce caspase-mediated cell death in human SNB19 glioma cells. *Clinical & Experimental Metastasis* 20: 375–383.
- Zhang, X., Wu, C., Wu, H., Sheng, L., Su, Y., Zhang, X., Luan, H., Sun, G., Sun, X., Tian, Y., Ji, Y., Guo, P & Xu, X., 2013. Anti-Hyperlipidemic Effects and Potential Mechanisms of Action of the Caffeoylquinic Acid-Rich *Pandanus tectorius* Fruit Extract in Hamsters Fed a High Fat-Diet.. *PLoS ONE* 8 (4): e61922.
- Zhang, J., Bing, L. & Reineccius, G. A., 2016. Comparison of modified starch and Quillaja saponins in the formation and stabilization of flavor nanoemulsions. *Food Chemistry* 192: 53-59.
- Zong, J., Wang, R., Bao, G., Ling, T., Zhang, L., Zhang, X. & Hou, R., 2015. Novel triterpenoid saponins from residual seed cake of *Camellia oleifera* Abel. show anti-proliferative activity against tumor cells. *Fitoterapia* 104: 7-13.