



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

**Aprovechamiento de especies vegetales de la región
norpatagónica para la obtención de antioxidantes naturales
mediante procesos ambientalmente favorables**

Trabajo de Tesis para optar al
Título de Doctor en Biología
Lic. María Celeste Gallia

Directora: Dra. Guillermina Azucena Bongiovanni

Codirectora: Dra. Ana Ferrari

2022

RESUMEN

En la última década, la química sostenible (también llamada química verde) ha atraído un gran interés en muchas áreas, en las que se incluyen los antioxidantes naturales. Principalmente, porque numerosos estudios indican que los antioxidantes pueden retrasar o prevenir las patologías más prevalentes de la humanidad. Los objetivos de esta tesis fueron analizar el poder antioxidante de extractos vegetales derivados de plantas nativas y obtenidos mediante procesos “verdes”, seleccionar aquellos extractos con actividad antioxidante alta, estudiar su efecto citoprotector frente a diversas sustancias oxidantes, realizar ensayos para anticipar posibles aplicaciones y subfraccionar los extractos activos para obtener fracciones enriquecidas en esta actividad. Se analizaron extractos de especies vegetales nativas de Argentina y de la región norpatagónica que son utilizadas tradicionalmente con fines medicinales, principalmente como antiinflamatorios, tales como *Larrea cuneifolia*, *Larrea nitida*, *Grindelia chilensis*, *Pteromonnina dictyocarpa*, *Mandevilla laxa* y *Monttea aphylla*. Por otra parte, se examinaron distintos tejidos de las semillas comestibles (piñones) de *Araucaria araucana*, una especie de conífera icónica de la Patagonia Argentina y Chilena, comúnmente conocida como “Pehuén”. Se profundizaron los estudios en estas semillas por presentar actividad antioxidante en todos sus tejidos, incluidas las cáscaras que son normalmente descartadas como residuos de su industrialización gastronómica. Se determinó la composición química mediante espectrofotometría, cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de fluorescencia de rayos X. La actividad biológica de extractos elaborados a partir de cáscaras de piñones y/o de fracciones purificadas se evaluó en modelos *in vitro* e *in vivo* de estrés oxidativo. Se determinaron marcadores redox en células mamíferas expuestas a arsénico y en glándulas salivales de ratas tratadas con ciclofosfamida (fármaco oncológico). La toxicidad aguda se descartó mediante pruebas *in vitro* y tinción fluorescente doble. También se analizó la capacidad de inhibir la corrosión de metales. Además, se obtuvieron cultivos celulares a partir de piñones por biotecnología, como método biosustentable de obtención de metabolitos de interés industrial. Los resultados mostraron que las especies vegetales analizadas son ricas en polifenoles, con alto poder antioxidante y baja toxicidad, excepto *G. chilensis*. Las cáscaras de los piñones, residuos de su industrialización, resultaron ser una fuente importante de antioxidantes, con los mayores niveles de fenoles y flavonoides y el mayor poder antioxidante de la semilla (hasta 404 µg equivalente de ácido ascórbico por mg de cáscara vs. 1,14 en la porción comestible). Además, ningún tejido del piñón, tanto de la parte comestible como de los residuos gastronómicos, mostró toxicidad *in vitro* en las líneas celulares mamíferas evaluadas. Se encontró que los oligoelementos de importancia nutricional como Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca son constituyentes mayoritarios en la cáscara y en la porción comestible (embrión y endosperma) del piñón. El extracto de la cáscara presentó alto contenido de ácido gálico, catequina, quercetina y taninos. En consistencia con estos resultados, el extracto de la cáscara del piñón mostró una significativa protección *in vivo* e *in vitro* contra el daño oxidativo y también fue capaz de inhibir la corrosión del acero en medio ácido. Por último, fue posible obtener metabolitos secundarios *in vitro* a partir de células desdiferenciadas de piñón, con mayor actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos, en comparación con los obtenidos del tejido originario de la semilla. Se concluye que especies vegetales usadas en medicina popular de la Norpatagonia, contienen elevado poder antioxidante y que los residuos biológicos de piñón son una fuente atractiva de antioxidantes naturales de bajo costo, con posibles aplicaciones nutraceuticas, farmacológicas y para la protección contra la corrosión de metales. Por otro lado, se demuestra que los metabolitos del piñón pueden ser obtenidos *in vitro*, como método biosustentado y ecológicamente favorable.

SUMMARY

In the last decade, sustainable chemistry (also called green chemistry) has attracted great interest in many areas, including natural antioxidants. Mainly, because numerous studies indicate that antioxidants can delay or prevent the main pathologies of humanity. The objectives of this thesis were to analyze the antioxidant power of extracts derived from native species and obtained using green processes, to select those extracts with high activity, to analyze their cytoprotective effect against various oxidizing substances, to carry out tests to anticipate possible applications and to sub-fractionate the active extracts to obtain fractions enriched in this activity. Extracts of plant species from the North Patagonian region that are traditionally used for medicinal purposes mainly as anti-inflammatories, were analyzed, such as *Larrea cuneifolia*, *Larrea nitida*, *Grindelia chiloensis*, *Pteromonnina dictyocarpa*, *Mandevilla laxa* and *Monttea aphylla*. On the other hand, different seed (piñones) tissues of *Araucaria araucana*, an iconic conifer from Argentine and Chilean Patagonia, commonly known as “Pehuén” and the residues of its industrialization in gastronomy were examined. Its chemical composition was determined by spectrophotometry, high performance liquid chromatography and X-ray fluorescence spectrometry. Biological activity of extracts obtained from piñon coat and/or its purified fractions was evaluated in *in vitro* and *in vivo* models of oxidative stress. Redox markers were determined in mammalian cells exposed to arsenic and in salivary glands of rats treated with cyclophosphamide (an oncological drug). Acute toxicity was discarded using *in vitro* tests and double fluorescent staining. The inhibitory properties of metal corrosion of extracts were also analyzed. Furthermore, cell cultures were obtained by biotechnology from piñones, as a bio-sustainable method for obtaining metabolites of industrial interest. The results showed that the analyzed plant species are rich in polyphenols, with high antioxidant power and low toxicity, except for *G. chiloensis*. Piñones coats, residues of its industrialization, turned out to be an important source of antioxidants, showing the highest levels of phenols and flavonoids and the highest antioxidant power of the seed (up to 404 µg of ascorbic acid equivalent per mg of coat vs. 1,14 in the edible part). Furthermore, no tissue, both in the edible part and in the gastronomic residues, showed *in vitro* toxicity in the mammalian cell lines evaluated. It was found that oligoelements with nutritional importance like Na, Mg, P, S, Cl, K and Ca were the major elements encountered in piñones coats and in the edible parts (embryo and endosperm). Piñon coat extract had a high content of gallic acid, ferulic acid, catechin, quercetin and tannins. According with these results, piñon coat extract showed significant *in vivo* and *in vitro* protection against oxidative damage and was able to inhibit steel corrosion in acid medium. Finally, it was possible to obtain secondary metabolites *in vitro* from dedifferentiated piñones cells with highest antioxidant activity and phenolic content compared with the tissue extracted from the seed. It can be concluded that the analyzed plant species used in traditional medicine in Norpatagonia contain high antioxidant activity and that piñon biowaste is an attractive source of low-cost natural antioxidants with potential nutraceutical, medical, and metal corrosion protection applications. On the other hand, it is shown that piñon antioxidants can be obtained *in vitro*, as a biosustained and ecologically favorable method.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, Guille y Anita, por la oportunidad brindada, por su dedicación y apoyo, y por sus enseñanzas, sin las cuales no hubiese sido posible este trabajo. También por sus consejos personales y su comprensión de la maternidad.

A mi compañero de vida, Nico, por el apoyo diario, por creer siempre en mí y acompañarme en cada paso que doy.

A mis hijos, Santi y Cata, por hacerme la vida feliz.

A mi mamá Elina y mi papá Rubén, por la libertad que me dieron de elegir lo que me gusta, su confianza y el apoyo incondicional.

A mis hermanos por escucharme y darme ánimo para transitar este camino.

A mis compañeros del Instituto, Leo, Marce, Horacio, Vicky, Andre, Eva, Flor, Bety, Euge, Flor, y todos aquellos que me ayudaron, aconsejaron e hicieron mis días más divertidos.

A Juli, por enseñarme a usar todos los equipos, por las charlas y las risas compartidas.

A Carmen, por su ayuda, sus consejos, el apoyo diario y su amistad.

A Lily, por su buena predisposición para ayudarme cuando lo necesité.

A Saulinho, por los momentos compartidos, la risa fuerte y las enseñanzas.

A mis amigas de la vida, que extraño pero que siempre están presentes.

A toda la gente del laboratorio de Micro por prestarme equipos y su buena predisposición.

Al Dr. Mazzeo y su equipo, por su colaboración para las mediciones *in vivo*.

Al Dr. Ignasi Queralt por su contribución en las mediciones de composición elemental.

Al equipo de Nous, por su predisposición para mandarme piñones todos los años.

A la Universidad del Comahue, al CONICET y a la Agencia por haberme dado el lugar y los medios para realizar este Doctorado.

A los que de alguna forma me ayudaron a crecer.

¡MUCHAS GRACIAS!

INDICE

<u>CAPITULO 1.....</u>	<u>1</u>
<u>INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS</u>	<u>1</u>
1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL	2
1.2. OBJETIVO GENERAL	5
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
1.4. HIPÓTESIS	6
<u>CAPITULO 2.....</u>	<u>7</u>
<u>ESPECIES VEGETALES ESTUDIADAS</u>	<u>7</u>
2.1. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES	8
2.1.1. MATA DE SEBO, <i>MONTEA APHYLLA</i> (MIERS) BERTHAN & HOOKER (SCROPHULARIACEAE):	8
2.1.2. MELOSA, <i>GRINDELIA CHILOENSIS</i> (CORN.) CABRERA (ASTERACEAE)	8
2.1.3. JARILLA DE LA SIERRA, <i>LARREA NITIDA</i> CAV. (ZYGOPHYLLACEAE)	9
2.1.4. JARILLA MACHO, <i>LARREA CUNEIFOLIA</i> CAV. (ZYGOPHYLLACEAE).....	10
2.1.5. JAZMÍN DE CHILE, <i>MANDEVILLA LAXA</i> (RUIZ & PAV.) WOODSON (APOCYNACEAE)	11
2.1.6. QUELÉN, <i>PTEROMONNINA DICTYOCARPA</i> (GRISEB.) B. ERIKSEN (POLYGALACEAE).....	12
2.1.7. PEHUÉN, <i>ARAUCARIA ARAUCANA</i> (MOL.) C. KOCH (ARAUCARIACEAE).....	13
2.2. ESQUEMA GENERAL Y ESTRUCTURA DE LOS CAPITULOS	15
<u>CAPITULO 3.....</u>	<u>16</u>
<u>ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA GENERAL DE LOS EXTRACTOS</u>	<u>16</u>
3.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	17
3.1.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y SALUD	17
3.1.2. PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES	19
3.1.3. METABOLITOS SECUNDARIOS	20
3.1.4. COMPUESTOS FENÓLICOS	20
3.1.5. FLAVONOIDES	22
3.1.6. HIPÓTESIS.....	23
3.1.7. OBJETIVO	23
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.2.1. REACTIVOS QUÍMICOS	24
3.2.2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL	24
3.2.2.1 Material vegetal recolectado a campo:.....	24
3.2.2.2 Productos y residuos derivados de la industria del piñón	27
3.2.2.3. Callos de células de piñón obtenidos <i>in vitro</i>	28
3.2.3. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES	29

3.2.3.1. Extractos de plantas con usos medicinales.....	29
3.2.3.2 Extractos a partir de piñones de <i>A. araucana</i>	31
3.2.3.2.1. Piñones frescos.....	32
3.2.3.2.2. Piñones hervidos	33
3.2.3.2.3. Piñones tostados	34
3.2.3.2.4. Piñones en conservas.....	35
3.2.3.3. Extractos a partir de callos de células de piñón obtenidos <i>in vitro</i>	35
3.2.4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS	35
3.2.4.1. Determinación de actividad antioxidante por método de FRAP	36
3.2.4.2. Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH.....	36
3.2.5. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	37
3.2.6. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES	38
3.2.7. ANÁLISIS DE CITOTOXICIDAD	38
3.2.7.1. Línea celular	38
3.2.7.2. Mantenimiento	38
3.2.7.3. Bioensayos para la evaluación de citotoxicidad.....	38
3.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.3.1. ESPECIES CON USO MEDICINAL	39
3.3.1.1. Poder antioxidante con técnica de FRAP	39
3.3.1.2. Poder antioxidante con técnica de DPPH.....	42
3.3.1.3. Contenido de fenoles y flavonoides	43
3.3.1.4. Toxicidad de extractos de plantas con uso medicinal	44
3.3.2. PRODUCTOS Y RESIDUOS DERIVADOS DE LA INDUSTRIA DEL PIÑÓN	48
3.3.2.1. Poder antioxidante con técnica de FRAP	48
3.3.2.2. Poder antioxidante con técnica de DPPH.....	55
3.3.2.3. Contenido de fenoles y flavonoides	57
3.3.2.4. Análisis de toxicidad de extractos de piñón	60
3.3.3. CALLOS DE CÉLULAS DE PIÑÓN OBTENIDOS <i>IN VITRO</i>	61
3.3.3.1. Selección de callos	61
3.3.3.2. Poder antioxidante con técnicas de FRAP y DPPH	63
3.3.3.3. Contenido de fenoles y flavonoides	64
3.3.3.4. Análisis de toxicidad de extractos de callo de piñón	65
3.4. CONCLUSIONES	66
<u>CAPITULO 4.....</u>	<u>68</u>
<u>CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO DE CÁSCARA DE PIÑÓN Y</u>	
<u>PURIFICACIÓN DE FRACCIONES BIOACTIVAS.....</u>	<u>68</u>
4.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	69
4.1.1. HIPÓTESIS.....	71
4.1.2. OBJETIVO	71
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	71

4.2.1. REACTIVOS QUÍMICOS	71
4.2.2. CUANTIFICACIÓN DE TANINOS	71
4.2.3. ANÁLISIS MULTIELEMENTAL POR FLUORESCENCIA DE RAYOS X DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA (EDXRF)	72
4.2.4. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES ACTIVAS	72
4.2.5. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).....	75
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
4.3.1. ANÁLISIS DE TANINOS TOTALES	79
4.3.2. COMPOSICIÓN ELEMENTAL POR EDXRF	79
4.3.3. PURIFICACIÓN Y PODER ANTIOXIDANTE DE CADA FRACCIÓN	82
4.3.4. COMPOSICIÓN DE POLIFENOLES ANALIZADOS POR HPLC	92
4.4. CONCLUSIONES	95
<u>CAPITULO 5.....</u>	<u>96</u>

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE CÁSCARA DE PIÑÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*..... **96**

5.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	97
5.1.1. HIPÓTESIS.....	100
5.1.2. OBJETIVO	100
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	101
5.2.1. REACTIVOS QUÍMICOS	101
5.2.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO CHT-UINF EN UN MODELO <i>IN VITRO</i>	101
5.2.2.1. Línea celular	101
5.2.2.2. Mantenimiento de la línea celular	101
5.2.2.3. Evaluación de citotoxicidad y efecto protector del extracto CHT-Uinf por fluorescencia.....	102
5.2.2.4. Evaluación de citotoxicidad y efecto protector del extracto CHT-Uinf por la técnica de cristal violeta	103
5.2.2.5. Determinación de hidroperóxidos celulares	103
5.2.2.6. Evaluación de actividad de enzimas del sistema antioxidante	104
5.2.2.6.1. Evaluación de actividad de Glutación S-transferasa -GST:.....	104
5.2.2.6.2. Evaluación de actividad de Catalasa:	105
5.2.2.6.3. Evaluación de proteínas totales	105
5.2.3. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA CÁSCARA DE PIÑÓN EN UN MODELO <i>IN VIVO</i>	106
5.2.3.1. Actividad de Superóxido dismutasa (SOD) en glándula submaxilar	107
5.2.3.2. Contenido de Ácido úrico (AU) en glándula submaxilar.....	108
5.2.3.3. Contenido de malondialdehído (MDA) en glándula submaxilar	108
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	108

5.3.1. DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO CHT-UINF POR FLUORESCENCIA	108
5.3.2. DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO CHT-UINF POR CRISTAL VIOLETA	112
5.3.3. DETERMINACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS CELULARES	115
5.3.3.1. Determinación de hidroperóxidos acuosos (HP acuosos)	116
5.3.3.2. Determinación de hidroperóxidos lipídicos (HP lipídicos)	122
5.3.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	125
5.3.4.1. Actividad de la enzima Glutación S-transferasa	125
5.3.4.2. Actividad de la enzima catalasa	127
5.3.4.3. Contenido de proteínas totales	128
5.3.5. ACTIVIDAD DE EXTRACTO DE CÁSCARA DE PIÑÓN <i>IN VIVO</i>	129
5.4. CONCLUSIONES	131
<u>CAPITULO 6.....</u>	<u>133</u>
<u>ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTICORROSIVA DE LA CÁSCARA DEL PIÑÓN..</u>	<u>133</u>
6.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	134
6.1.1. HIPÓTESIS	135
6.1.2. OBJETIVO	135
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	135
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	136
6.4. CONCLUSIONES	137
<u>CAPITULO 7.....</u>	<u>139</u>
<u>CONCLUSIONES FINALES.....</u>	<u>139</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA CITADA</u>	<u>142</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA GENERADA COMO RESULTADO DE LA TESIS.....</u>	<u>164</u>

Índice de figuras

Figura 1: Esquema representativo sobre factores que promueven la formación de radicales libres y sustancias antioxidantes que actúan como sistema de defensa.	3
Figura 2: Fotografía de <i>M. aphylla</i> en la cual se observan los tallos y braquiblastos sin hojas.	8
Figura 3: Fotografías de <i>G. chilensis</i> en época de floración.	9
Figura 4: Fotografía de <i>L. nitida</i> .	10
Figura 5: Fotografía de <i>L. cuneifolia</i> .	11
Figura 6: Fotografía de <i>M. laxa</i> en época de floración.	12
Figura 7: Fotografías de <i>P. dictyocarpa</i> extraída de Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Zuloaga et al. 2019).	12
Figura 8: Fotografía de ejemplares de <i>A. araucana</i> (izquierda) y de sus semillas conocidas como piñones (derecha).	14
Figura 9: Respuestas celulares según nivel de EROs y ERNs presentes en la célula.	19
Figura 10: Clasificación de compuestos fenólicos. Adaptada de Vuolo et al. (2018).	22

<i>Figura 11: Fotografía del lugar de recolección de L. nitida, El Chocón (Neuquén).</i>	26
<i>Figura 12: Fotografía del lugar de recolección de G. chilensis, zona de bardas de la UNCo, Neuquén.</i>	26
<i>Figura 13: Fotografía del lugar de recolección de piñones, Villa Pehuenia, Neuquén.</i>	27
<i>Figura 14: Productos y residuos derivados de la industria del piñón. A) Piñones en almíbar; B-E) piñones hervidos: B) endosperma, C) embriones, D) cáscaras gruesas y E) cáscaras finas.</i>	28
<i>Figura 15: Diagrama que muestra los diferentes procesos de obtención de los extractos del piñón (ver detalles en el texto). Los demarcados en gris oscuro corresponden a los residuos de la industria. Dónde: P: pulpa; EM: embrión; EN: endosperma; CF: cáscara fina; CG: cáscara gruesa; CT: cáscara total; A: agua; H: harina; CA: café.</i>	31
<i>Figura 16: A) Cáscaras de piñón trituradas y B) Extractos elaborados a partir de dicho material vegetal.</i>	33
<i>Figura 17: Poder antioxidante de especies vegetales con uso medicinal evaluado con la técnica de FRAP.</i>	41
<i>Figura 18: Eficiencia anti-radical de extractos de especies con uso medicinal obtenidos con agua a temperatura ambiente (A) y a 100°C (C).</i>	43
<i>Figura 19: Contenido de fenoles y flavonoides de las especies con uso medicinal que mostraron mayor poder antioxidante.</i>	44
<i>Figura 20: Porcentaje de viabilidad de células VERO a distintas concentraciones de extractos de especies con uso medicinal.</i>	46
<i>Figura 21: Porcentaje de viabilidad de células MCF-7 a 50 µg EAA/mg PS de extractos de especies con uso medicinal.</i>	47
<i>Figura 22: Poder antioxidante de extractos obtenidos de cáscara total (CT), fina (CF) y gruesa (CG) de piñones frescos, hervidos y tostados.</i>	51
<i>Figura 23: Porcentaje de poder antioxidante de cada tejido con respecto al poder antioxidante de un piñón fresco, tostado, hervido a 100°C y a 120°C completo.</i>	52
<i>Figura 24: Poder antioxidante medido por FRAP de extractos obtenidos a partir de un piñón completo, de embrión (Emb), endosperma (End) y pulpa de piñones frescos y hervidos a 100°C, y de pulpa de piñones hervidos a 120°C y tostados (harina y café).</i>	53
<i>Figura 25: Fotografía de A) piñón vacío, B) piñón defectuoso y C) piñón viable.</i>	54
<i>Figura 26: Eficiencia anti-radical de extractos de cáscara total de piñones frescos (CTFC y CTFA), hervidos a 100°C (CT100C y CT100A), hervidos a 120°C (CT120) y tostados (CTT), y de cáscara fina (CF), cáscara gruesa (CG) de piñones frescos, hervidos a 100°C, a 120°C y tostados; y agua de piñones hervidos a ambas temperaturas.</i>	56
<i>Figura 27: Eficiencia anti-radical de extractos de pulpa de piñones frescos (PFC), hervidos a 100°C (P100) y tostados (harina, HC), y de embrión (EM) y endosperma (EN) de piñones frescos.</i>	57
<i>Figura 28: Contenido de fenoles totales de extractos de pulpa (P), cáscara total (CT), cáscara fina (CF) y cáscara gruesa (CG) de piñones frescos, hervidos a 100°C, hervidos a 120°C y tostados; y de agua de piñones hervidos a ambas temperaturas.</i>	58
<i>Figura 29: Proporción de fenoles hallados en cáscaras de piñones frescos, tostados y hervidos, y en agua de piñones hervidos. EAG: µg equivalentes de ácido gálico por mg de peso seco.</i>	59
<i>Figura 30: Contenido de flavonoides de extractos de cáscara total (CT), cáscara gruesa (CG), cáscara fina (CF) de piñones frescos, hervidos a 100°C y 120°C y tostados, y de agua de piñones hervidos.</i>	60
<i>Figura 31: Porcentaje de viabilidad de células VERO a distintas concentraciones de extractos obtenidos a 100°C de embrión (EM), endosperma (EN) y cáscara total (CT) de piñón.</i>	61
<i>Figura 32: Porcentaje de viabilidad de células MCF-7 expuestas a 200 µg EAA/mg PS de extractos obtenidos a 100°C de cáscara total (CT), cáscara fina (CF), cáscara gruesa (CG), embrión (EM) y endosperma (EN) de piñones frescos.</i>	61
<i>Figura 33: Callos obtenidos a partir de piñones: A) rodajas de piñón con formación de callo en la zona del eje embrionario y B) embriones completos con callos formados en el eje embrionario.</i>	62
<i>Figura 34: Porcentaje de viabilidad de células VERO y MCF-7 a distintas concentraciones de extracto de callo de piñón.</i>	66
<i>Figura 35: Mezcla de extractos acuosos con acetato de etilo (izquierda), separación de fases en campana de decantación (medio) y secado de extracto en rotavapor (derecha).</i>	74
<i>Figura 36: Curvas de calibración de la mezcla 1: ácido gálico; ácido clorogénico; ácido ferúlico y ácido elágico.</i>	76

<i>Figura 37: Curvas de calibración de la mezcla 2: catequina; ácido cafeico; ácido p-cumárico; rutina y quercetina.</i>	76
<i>Figura 38: Curvas de calibración de la mezcla 3: delphinidina; epicatequina; kuromanina y resveratrol.</i>	77
<i>Figura 39: Curvas de absorción de los estándares utilizados.</i>	78
<i>Figura 40: Poder antioxidante medido con la técnica de FRAP de extractos obtenidos a partir de cáscara de piñones hervidos.</i>	83
<i>Figura 41: Poder antioxidante medido con la técnica de DPPH de extractos obtenidos a partir de cáscara de piñones hervidos.</i>	83
<i>Figura 42: Poder antioxidante medido con la técnica de FRAP de extractos obtenidos a partir de cáscara de piñones tostados. MeOH: extractos metanólicos, Ac: extractos acuosos, U: ultrasonido, M: microondas.</i>	84
<i>Figura 43: Poder antioxidante medido con la técnica de DPPH de extractos obtenidos a partir de cáscara de piñones tostados.</i>	85
<i>Figura 44: Poder antioxidante evaluado con la técnica de FRAP para los tres extractos elegidos bajo un pretratamiento: hexano (Hx) y un postratamiento carbón activado (CA) y sus controles respectivos.</i>	89
<i>Figura 45: Poder antioxidante evaluado con la técnica de DPPH para los tres extractos elegidos bajo un pretratamiento: hexano (Hx) y un postratamiento carbón activado (CA) y sus controles respectivos (1:1).</i>	89
<i>Figura 46: Poder antioxidante evaluado con la técnica de FRAP para extractos obtenidos por fraccionamiento con acetato de etilo.</i>	91
<i>Figura 47: Poder antioxidante evaluado con la técnica de DPPH para extractos obtenidos por fraccionamiento con acetato de etilo.</i>	92
<i>Figura 48: Reacciones que ocurren en la medición de actividad de superóxido dismutasa mediante el kit Ransod XOD: xantina oxidasa, O₂⁻: anión superóxido.</i>	107
<i>Figura 49: Esquema de las reacciones utilizadas para medir contenido de ácido úrico. UOD: uricasa, POD: peroxidasa 4-AF: 4-aminofenazona 3,5-DHS: sal sódica de 3,5-diclorohidroxibenceno sulfónico.</i>	108
<i>Figura 50: Imágenes de células CHO-K1 luego de 2 h de tratamiento con 2 µg/ml de extracto CHT-Uinf, 5 µg/ml arsénico (As), la combinación de ambos (CHT-Uinf+As) y control tomadas con microscopio de fluorescencia (100X).</i>	109
<i>Figura 51: Promedio total de células fluorescentes adheridas por campo bajo distintos tratamientos: control, con extracto CHT-Uinf 2 µg/ml, con As 5 µg/ml y con la combinación de ambos.</i>	110
<i>Figura 52: Ejemplos de tipos celulares hallados en los distintos tratamientos: a) célula no viable con núcleo teñido con YP (células necróticas); b) célula no viable teñida completa con YP (estado avanzado de apoptosis); c) célula viable con forma redondeada y aislada (en proceso de apoptosis); y d) célula viable con morfología normal.</i>	111
<i>Figura 53: Proporción de tipos de células adheridas por campo bajo distintos tratamientos: control, con extracto de cáscara de piñón CHT-Uinf 2µg/ml, con As 5 µg/ml y con la combinación de ambos.</i>	112
<i>Figura 54: Porcentaje de viabilidad celular de células CHO-K1 teñidas con cristal violeta tratadas con extracto CHT-Uinf 2µg/ml, As 5 µg/ml, la combinación de ambos y control.</i>	113
<i>Figura 55: Fotografías representativas tomadas con microscopio (100X) de células expuestas a extracto CHT-Uinf 2µg/ml, As 5 ppm, la combinación de ambos y el control teñidas con cristal violeta.</i>	115
<i>Figura 56: Formación de hidroperóxidos acuosos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, As 5 µg/ml y As 10 µg/ml. Los datos son promedio de dos experimentos con 8 réplicas, expresados en µM H₂O₂/10000 células.</i>	117
<i>Figura 57: Formación de hidroperóxidos acuosos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT-U 60°C 25' y CTT-U 60°C 50' en distintas concentraciones (4, 8, 20, 40 y 80 µg/ml).</i>	118
<i>Figura 58: Formación de hidroperóxidos acuosos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT-U 60°C 25' y CTT-U 60°C 50' en distintas concentraciones (8 y 20 µg/ml) con 10 µg/ml de As.</i>	119
<i>Figura 59: Formación de hidroperóxidos acuosos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT-Usup, CHT-Uinf, CTT-Usup o CTT-Uinf en dos concentraciones (4 y 40 µg/ml).</i>	120
<i>Figura 60: Formación de hidroperóxidos acuosos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT-Usup, CHT-Uinf, CTT-Usup o CTT-Uinf en dos concentraciones (8 y 20 µg/ml) con 10 µg/ml As.</i>	121

<i>Figura 61: Formación de hidroperóxidos lipídicos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, As 5 µg/ml y As 10 µg/ml.</i>	122
<i>Figura 62: Formación de hidroperóxidos orgánicos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT US 60°C 25' y Extracto CTT US 60°C 50' en distintas concentraciones (4, 8, 20, 40 y 80 µg/ml).</i>	123
<i>Figura 63: Formación de hidroperóxidos orgánicos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT US 60°C 25' y CTT US 60°C 50' en distintas concentraciones (8 y 20 µg/ml) con 10 µg/ml de As.</i>	124
<i>Figura 64: Formación de hidroperóxidos orgánicos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT-Usup, CHT-Uinf, CTT-Usup y CTT-Uinf en distintas concentraciones (4, 20 y 40 µg/ml).</i>	124
<i>Figura 65: Formación de hidroperóxidos orgánicos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT-Usup, CHT-Uinf, CTT-Usup y CTT-Uinf en distintas concentraciones (4, 20 y 40 µg/ml) con 10 µg/ml de As.</i>	125
<i>Figura 66: Actividad específica de GST expresada en UI/mg proteína en células CHO-K1 expuestas 2 h a 400 µg/ml de extracto CHT-Uinf, 5 µg/ml de As, la combinación de ambos y el control.</i>	127
<i>Figura 67: Actividad específica de catalasa expresada en UI/mg proteína en células CHO-K1 expuestas 2 h a 400 µg/ml de extracto CHT-Uinf, 5 µg/ml de As, la combinación de ambos y el control.</i>	128
<i>Figura 68: Contenido de proteínas totales en células CHO-K1 expuestas 2 h a 400 µg/ml de extracto CHT-Uinf, 5 µg/ml de As, la combinación de ambos y el control.</i>	129
<i>Figura 69: Efecto del extracto de cáscara de piñón, ciclofosfamida (CF), y el cotratamiento (CTFC+CF) en la actividad de superóxido dismutasa (SOD; unidades/g), contenido de ácido úrico (AU; mg/g) y de malondialdehído (MDA; M/g) en glándulas submandibulares de ratas Wistar.</i>	131
<i>Figura 70: Eficiencia de inhibición de la corrosión de extracto de cáscara fresca de piñón a diferentes concentraciones</i>	137
<i>Figura 71: Tasa de corrosión de extracto de cáscara fresca de piñón a diferentes concentraciones (50, 100, 200 y 400 µg de peso seco por ml de volumen de incubación) en HCl 1 M. L</i>	137

Índice de tablas

<i>Tabla 1: Referencias de extractos elaborados a partir de las distintas especies vegetales con uso medicinal</i>	30
<i>Tabla 2: Referencias de extractos elaborados a partir de piñones frescos recolectados desde 2016 hasta 2019</i>	32
<i>Tabla 3: Referencias de extractos elaborados a partir de piñones hervidos a 100°C</i>	34
<i>Tabla 4: Referencias de extractos elaborados a partir de piñones hervidos a 120°C en autoclave</i>	34
<i>Tabla 5: Referencias de extractos elaborados a partir de piñones tostados</i>	35
<i>Tabla 6: Poder antioxidante evaluado con la técnica FRAP de extractos de piñones frescos elaborados con agua a TA y a 100°C</i>	48
<i>Tabla 7: Poder antioxidante evaluado con la técnica FRAP de extractos de piñones hervidos elaborados con agua a TA y a 100°C</i>	49
<i>Tabla 8: Poder antioxidante evaluado con la técnica FRAP de extractos de piñones hervidos a 120°C elaborados con agua a 100°C</i>	49
<i>Tabla 9: Poder antioxidante evaluado con la técnica FRAP de extractos de piñones tostados elaborados con agua a TA y a 100°C</i>	50
<i>Tabla 10: Poder antioxidante evaluado con la técnica FRAP de extractos de piñones en almíbar elaborados con agua a TA y a 100°C</i>	50
<i>Tabla 11: Porcentaje de formación de callos de embrión de piñón en aquellos medios en los que se obtuvo un mínimo de 25% de formación</i>	62
<i>Tabla 12: Poder antioxidante medido por la técnica de FRAP y Eficiencia anti-radical de extractos obtenidos a partir de callos de piñón</i>	64
<i>Tabla 13: Contenido de fenoles y flavonoides de callos de piñón</i>	65
<i>Tabla 14: Contenido de fenoles totales (CFT), fenoles residuales (CFR) y taninos totales (CT), y porcentaje de taninos de extracto obtenido con agua a 100°C a partir de cáscara total de piñón fresco (CTFC), expresados en µg equivalentes de ácido gálico (EAG).</i>	79
<i>Tabla 15: Composición elemental de los tejidos de piñones frescos hervidos o tostados analizados por EDXRF</i>	

($\mu\text{g/g}$).....	81
Tabla 16: Poder antioxidante evaluado con la técnica de FRAP de extractos de cáscara de piñones tostados y hervidos bajo distintos tratamientos de extracción	86
Tabla 17: Poder antioxidante evaluado con la técnica de DPPH de extractos de cáscara de piñones tostados y hervidos bajo distintos tratamientos de extracción.....	87
Tabla 18: Concentración de polifenoles en muestras de cáscara de piñón analizadas por HPLC	93
Tabla 19: Grupos experimentales utilizados para en estudio <i>in vivo</i> . CF= ciclofosfamida; CP= Cáscara de piñones frescos.....	107

Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfónico)
AG	Ácido giberélico
ANDG	Ácido nordihidroguaiarético
ARE	Elemento de Respuesta Antioxidante
As	Arsénico
ASB	Albumina sérica bovina
AU	Ácido úrico
BAP	6-bencilaminopurina
BHT	Butilhidroxitolueno
CAT	Catalasa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CF	Ciclofosfamida
CFR	Contenido de fenoles residuales
CFT	Contenido de fenoles totales
CHO-K1	Línea celular derivada de ovario de hámster chino
CP	Extracto de cáscara piñón usado para experimentos <i>in vivo</i>
CT	Contenido de taninos
DAF	Diacetato de fluoresceína
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EA	Eficiencia anti-radical
EAA	Equivalentes de ácido ascórbico
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC ₄₀	Concentración de antioxidantes necesaria para inhibir en un 40% la cantidad inicial del radical DPPH
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDXRF	Fluorescencia de rayos X de dispersión de energía
EI	Eficiencia de inhibición de la corrosión
EQ	Equivalentes de quercetina
ERNs	Especies reactivas del nitrógeno
EROs	Especies reactivas del oxígeno
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GSH	Glutación
GST	Glutación S-transferasa
HEPES	Ácido 2(4(2hidroxietyl)1piperazinil)etanosulfónico
HP	Hidroperóxidos
HPLC	High performance liquid chromatography
MAD	Malondialdehído
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
MS	Medio Murashige y Skoog
NAA	Ácido naftalenacético
Nrf2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear E2
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa

TA	Temperatura ambiente
TC	Tasa de corrosión
tEC ₄₀	Tiempo que necesita cierta concentración de antioxidantes para inhibir el 40% de la absorbancia del radical DPPH
TPTZ	2,4,6-Tri(2-pyridil)-1,3,5-triazina
TRAP	Total radical trapping power
TROLOX	Acido 6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UNCo	Universidad Nacional del Comahue
VERO	Línea celular de epitelio de riñón de mono verde africano
YP	Yoduro de propidio

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL y OBJETIVOS

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la actualidad existe un gran interés científico por el estudio del papel que cumplen el estrés oxidativo y los antioxidantes en la relación salud/enfermedad, no sólo en humanos sino en toda la biota. Los factores que causan el estrés oxidativo pueden estar presentes en el aire, los alimentos, medicamentos, humo del cigarrillo, restos de insecticidas en los alimentos de origen vegetal, radiaciones solares, entre otros (Figura 1) (Leni *et al.* 2020; Vatner *et al.* 2020; Zheng *et al.* 2020). Evidencias firmes indican que el estrés oxidativo, generado ya sea por el aumento de las especies reactivas de oxígeno (EROs) y nitrógeno (ENOs) o por disminución de las defensas antioxidantes, altera la estructura y función de biomoléculas esenciales (lípidos, proteínas y ADN), y esto se asocia al envejecimiento y a numerosas enfermedades, entre ellas: cáncer, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, aterosclerosis, lesión hepática, artritis reumatoide, diabetes tipo 2, insuficiencia renal (O’Flaherty 2020; Eguchi *et al.* 2021; Ionescu-Tucker y Cotman 2021; Pisoschi *et al.* 2021). Además, se ha reportado que el estrés oxidativo tiene un papel clave en la patogénesis de COVID-19 y determina la gravedad de la enfermedad (Kountouri *et al.* 2021). Estas enfermedades impactan no sólo en la cantidad de años de vida, sino en la calidad de la vida y esto es un creciente problema de salud pública global que subyace a la mayor expectativa de vida que brinda la farmacología moderna. En relación a esto, puede citarse el aumento de algunas patologías como la insuficiencia renal crónica o la neuropatía periférica dolorosa, cuyas incidencias se han incrementado en correspondencia al avance de los tratamientos oncológicos, que tratan de manera efectiva el cáncer pero pueden producir daños oxidativos irreparables (Jha *et al.* 2013; Zajaczkowska *et al.* 2019).

Los antioxidantes de la dieta son capaces de frenar las cascadas de señales que llevan al estrés oxidativo a través del aumento de las defensas naturales y de la prevención de los daños oxidativos y las enfermedades asociadas a ellos (Figura 1) (Bjørklund y Chirumbolo 2017; Cömert y Gökmen 2018; Sun *et al.* 2020). Entre los antioxidantes de la dieta, se encuentran los polifenoles, metabolitos secundarios de las plantas que cumplen un papel en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión por agentes patógenos (Pandey y Rizvi 2009), y que en células de mamíferos pueden provocar en bajas concentraciones respuestas antioxidantes a través de la activación del factor de transcripción Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear E2) (Scuto *et al.* 2022).

La búsqueda de antioxidantes vegetales, basada en la riqueza florística de un país y los conocimientos etnobotánicos, puede resultar en nuevos principios activos que no son detectados de otra manera. Dentro de la flora Argentina, distribuida en 283 familias (253 son plantas vasculares), al menos 1500 especies son usadas en la medicina tradicional de Argentina

(Goleniowski *et al.* 2006; Barboza *et al.* 2009; Zuloaga y Belgrano 2015; Cantero *et al.* 2019; Zuloaga *et al.* 2019).

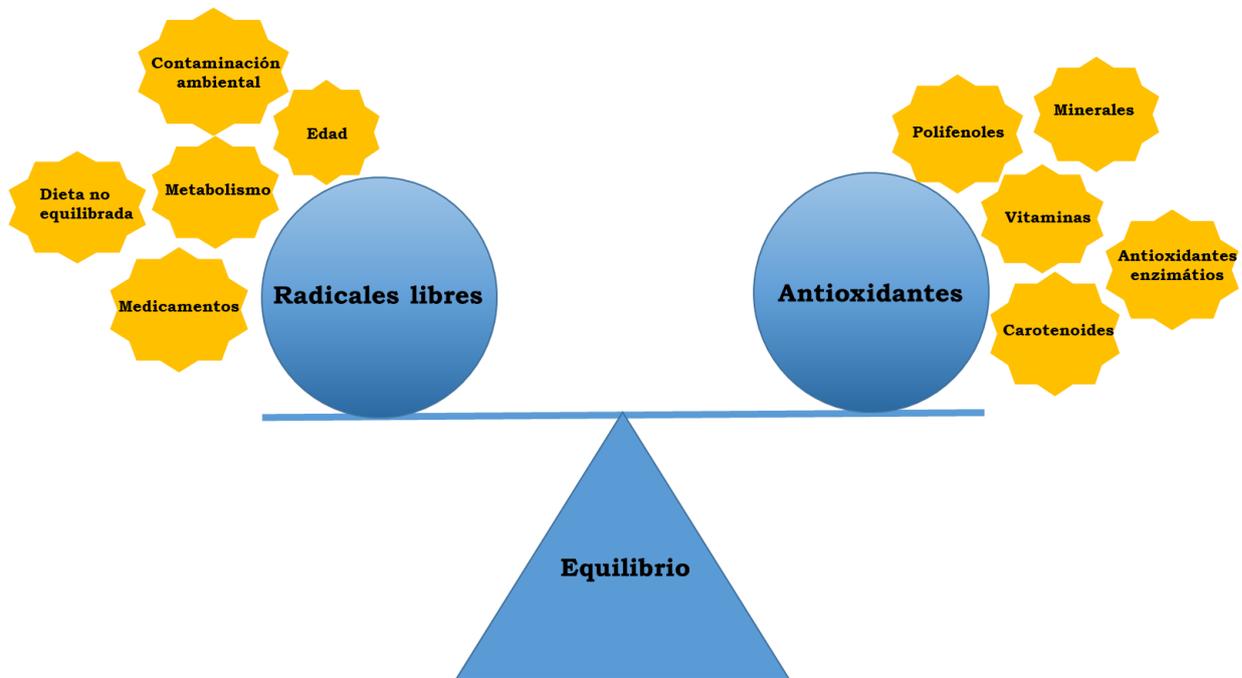


Figura 1: Esquema representativo sobre factores que promueven la formación de radicales libres y sustancias antioxidantes que actúan como sistema de defensa.

En la región Patagónica Argentina se han descrito numerosas especies de plantas con propiedades medicinales utilizadas contra afecciones hepáticas, intestinales, musculares, renales, entre otras (Muiño 2011); sin embargo, en muchas de ellas no se ha investigado la composición de metabolitos secundarios activos, ni los mecanismos involucrados en dichos efectos curativos. Los compuestos fenólicos, tales como taninos, antocianinas y flavonoides, tienen propiedades antioxidantes que, en muchos casos, se relacionan estrechamente con una acción antiinflamatoria, principal mecanismo involucrado con la patogenia de las enfermedades mencionadas (Shahidi y Ambigaipalan 2015; Chandrasekara y Shahidi 2018). Entre las especies usadas en medicina popular norpatagónica para tratar trastornos inflamatorios, resultan interesantes para estudiar: *Monttea aphylla*, *Mandevilla laxa*, *Larrea cuneifolia*, *Larrea nitida*, *Pteromonnina dictyocarpa* y *Grindelia chiloensis*, de las cuales ha sido poco estudiada su composición química, como también el mecanismo de su efecto terapéutico.

Según datos bibliográficos, la infusión de *M. aphylla* se utiliza para afecciones hepáticas y dolencias renales (Del Vitto *et al.* 1997; Azar 2008; Ladio y Lozada 2009; Muiño 2011); *G.*

chiloensis se utiliza para interrumpir diarreas, como antiinflamatorio para dolores generalizados, entre otras (Muiño 2011); *L. cuneifolia* y *L. nitida* se utilizan como descongestivos, para dolores articulares, como desinfectante, para afecciones gástricas, entre otras (Del Vitto *et al.* 1997; Muiño 2011; Musaubach y Plos 2015); y *P. dictyocarpa* como antidiarreico y digestivo (Del Vitto *et al.* 1997; Goleniowski *et al.* 2006). Por último, también se han descrito usos medicinales de mezclas de estas especies: por ejemplo las hojas de *G. chiloensis* se mezclan con raspaduras de tallos de *M. aphylla* para tratar dolores generalizados; mientras que para el tratamiento de fracturas de huesos, *G. chiloensis* se mezcla con *L. divaricata*, se hierve en aceite verde, se añaden cenizas y se aplican vendas sobre la fractura (Muiño 2011). Sobre la base de dichos usos etnomedicinales, resulta interesante evaluar la capacidad antioxidante de estas especies con actividad antiinflamatoria potencial.

Por otra parte, el Pehuén, *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch, es una conífera endémica de Argentina y Chile con un área de ocupación reducida en ambos países; solo presente en 392,51 km² en la provincia de Neuquén. Esta especie tiene una importancia cultural y espiritual para las comunidades que han coexistido con ella y que la han usado con propósitos medicinales, sociales y nutricionales (Reis *et al.* 2014). En la actualidad, después de sobrevivir miles de años a erupciones volcánicas, incendios y pastoreo, el uso intensivo de las semillas de Pehuén (piñones), tanto por el consumo de los pobladores locales como por aquellos atraídos por el turismo gastronómico de la región, han afectado la regeneración natural de la especie. Si bien habita Áreas Naturales protegidas en los términos de la Ley N° 22.351 y es el símbolo oficial de la provincia del Neuquén, de acuerdo a datos publicados se cosechan anualmente unos 90 kg/ha de piñones aproximadamente en Argentina (273 kg/ha en Chile) (Taha *et al.* 2010; Sanguinetti 2014). Todo esto, ha reducido su área de distribución y ha disminuido las poblaciones lo cual conduce a un alto riesgo de extinción (Premoli *et al.* 2013). Cada piñón contiene tejidos comestibles, como el embrión y el endosperma, y tejidos que son desechados, como las cáscaras que lo recubren. Los piñones se consumen tostados, hervidos y frescos, y se pueden utilizar para hacer productos como harina, café, bebidas fermentadas, conservas o platos gourmet. Puesto que presentan importancia a nivel regional y han sido utilizados históricamente con fines medicinales y nutricionales, resulta particularmente interesante estudiar las propiedades de los piñones, particularmente las relacionadas a la presencia de antioxidantes y la composición química de sus tejidos comestibles y desechados.

De acuerdo con lo planteado anteriormente y dado que existen diversos usos potenciales de los antioxidantes y que el Pehuén es una especie en peligro de extinción y protegida legalmente, surge la necesidad de obtener un protocolo biosustentado y proteccionista para el

aprovechamiento de los metabolitos del piñón. En este sentido, las herramientas biotecnológicas proveen opciones nuevas y complementarias para la producción de metabolitos secundarios y la conservación de las especies. En estudios preliminares realizados para la obtención *in vitro* de metabolitos vegetales bioactivos, se encontró que es posible obtener células de piñón y que las mismas tendrían capacidad antioxidante (Echeverri Del Sarto *et al.* 2016). Por lo tanto, resulta importante optimizar los protocolos de cultivo *in vitro*, así como caracterizar químicamente los metabolitos responsables de esta bioactividad.

Por todo lo descripto y dado el gran interés científico, medicinal e industrial en los antioxidantes naturales, el objetivo de este estudio fue analizar y comparar las propiedades antioxidantes y el contenido de fenoles de plantas nativas a partir de tres tipos de fuentes: material vegetal aéreo extraído a campo de diferentes especies, semillas del Pehuén (incluidos los productos y residuos derivados de la industria del piñón) y células obtenidas *in vitro* a partir de piñones; y además, caracterizar químicamente los extractos con mayor poder antioxidante. Todos los procedimientos ensayados en este estudio fueron seleccionados por su nulo o escaso impacto ambiental, a fin de considerar una futura aplicación de los extractos o sus fracciones como aditivos nutraceuticos.

1.2. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las propiedades antioxidantes de plantas nativas de la Norpatagonia Argentina y su aprovechamiento sustentable.

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la capacidad antioxidante de extractos obtenidos a partir de los órganos de plantas medicinales nativas de la región norpatagónica que son utilizados como antiinflamatorios.
2. Estudiar la capacidad antioxidante de extractos obtenidos de los tejidos que constituyen las semillas de *A. araucana*, de productos alimenticios de la industria del piñón, de los residuos de esta industria y también de cultivos de células de piñón.
3. Utilizar “procesos verdes” para extraer fracciones con antioxidantes presentes en recursos vegetales de la región norpatagónica, y así proteger el medioambiente y considerar un posible uso como nutraceutico).
4. Caracterizar químicamente los extractos con mayor actividad antioxidante.
5. Estudiar la capacidad bioprotectora de las fracciones antioxidantes en modelos *in vitro* e

in vivo de daño oxidativo.

6. Estudiar la capacidad protectora de los antioxidantes vegetales en un modelo no biológico de daño oxidativo.
7. Promover el avance en el conocimiento sobre la caracterización química, biológica y posibles aplicaciones de la flora nativa norpatagónica mediante la difusión y publicación de los resultados obtenidos bajo estricto rigor científico.

1.4. HIPÓTESIS

En base a los antecedentes de sus usos medicinales, especialmente con fines antiinflamatorios, las especies estudiadas presentan actividad antioxidante dada por su contenido de polifenoles, baja toxicidad y capacidad protectora en modelos biológicos *in vitro* e *in vivo*.

CAPITULO 2

ESPECIES VEGETALES ESTUDIADAS

2.1. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES

Sobre la base de su abundancia en Norpatagonia, su uso tradicional como plantas medicinales con propiedades antiinflamatorias, la utilización de órganos aéreos que no ponen en peligro a la planta y la experiencia del grupo en el tema, se seleccionaron las especies nativas que se describen a continuación. El objetivo de este capítulo fue describir las especies, su distribución geográfica, sus usos medicinales y, si existen, los antecedentes fitoquímicos que justifican su estudio detallado.

2.1.1. Mata de sebo, *Monttea aphylla* (Miers) Berthán & Hooker (Scrophulariaceae):

Es un arbusto intrincado de 0,5- 2 m de alto, glabro, con ramas verdes cubiertas de una gruesa capa de cera que se desprende en placas en las ramas viejas. Sus hojas son pequeñas y se desprenden rápidamente de la planta (Figura 2). Las flores ubicadas en braquiblastos son violáceas y contienen 2-4 pétalos; y el fruto es una cápsula de color amarillo con una única semilla (Gruneisen 1996; Gandullo *et al.* 2016).

Esta especie se distribuye en el centro de la Argentina y norte de la Patagonia y es acreditada como medicinal contra afecciones hepáticas para lo cual se suministran trocitos de ramas en infusión teiforme (Del Vitto *et al.* 1997; Azar 2008; Ladio y Lozada 2009; Muiño 2011). Se ha descrito que posee diferentes metabolitos secundarios como apigenina (flavona), ácido 3-epi betulínico (triterpeno) y penduletina (flavonol) (Barboza *et al.* 2009).



Figura 2: Fotografía de *M. aphylla* en la cual se observan los tallos y braquiblastos sin hojas.

2.1.2. Melosa, *Grindelia chilensis* (Corn.) Cabrera (Asteraceae)

Especie característica de las regiones secas, rocosas o arenosas, del sur de la Provincia Fitogeográfica del Monte y de toda la Patagonia. Adquiere forma de mata ramificada de 30 a 80 cm de alto, con gran cantidad de hojas en sus ramas. Las hojas son largas y aserradas en el

margen, y contienen una resina pegajosa. Las flores están dispuestas en una inflorescencia grande de más de 5 cm de diámetro, de color amarillo (Figura 3). Comúnmente el centro de la inflorescencia posee una sustancia lechosa y las flores que la rodean no tienen pétalos. La floración ocurre durante casi todo el año, aunque es más abundante en primavera-verano. El fruto es seco y pequeño, con una única semilla (Sapoznikow *et al.* 2002).

En medicina tradicional se utiliza para interrumpir diarreas y como antiinflamatorio para dolores generalizados, entre otras (Muiño 2011). En esta especie se han hallado compuestos antioxidantes, tales como: cariofileno, D-germacreno, ácido grindela-6-8(17)-dienoico, ácido grindélico, ácido oxograndélico, 3-metileter kampferol y 3,4-dimetileter kampferol (Barboza *et al.* 2009).



Figura 3: Fotografías de *G. chilensis* en época de floración.

2.1.3. Jarilla de la Sierra, *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae)

Es una especie arbustiva con una altura de hasta 1,7 m, con tallos hojosos orientados hacia el norte al igual que sus hojas. Las hojas son subsésiles, con 5-8 pares de folíolos soldados con la base ensanchada y muy resinosa. Las flores son amarillentas y los frutos tienen una pubescencia blanco-grisácea (Figura 4). Las semillas miden 4-5 mm, son lisas y tienen forma arriñonada. Habita la región seca del oeste de Argentina, desde Salta hasta Chubut. Es utilizada en medicina popular para facilitar los partos, provocar abortos y como antiinflamatorio de uso externo. El emplasto hecho con las hojas se utiliza para luxaciones y fracturas, dado que es muy eficaz como desinflamatorio (Azar 2008; Barboza *et al.* 2009; Ladio y Lozada 2009). El género *Larrea* presenta lignanos y flavonoides; entre los cuales el ácido nordihidroguaiarético (ANDG) constituye su principal lignano. Este compuesto presenta actividad anti-cancerígena *in vitro* e *in vivo*; y además, se ha demostrado *in vitro* que inhibe la transcripción y replicación del virus

de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y de varios tipos de herpes (Gnabre *et al.* 1996; Craigo *et al.* 2000). Dentro de los flavonoides que posee, se puede citar a la quercetina por su importancia como potencial agente antiviral, anticancerígeno y antioxidante (Panche *et al.* 2016). Otros compuestos antioxidantes hallados en esta especie son: 2'-4'-dihidroxi chalcona, 3-3'-7-trimetil éter quercetina, ácido ferúlico, asparagina, entre otros (Barboza *et al.* 2009). Por otra parte, Ahn *et al.* (2014) han demostrado que los extractos obtenidos a partir de hojas de *L. nitida* inhiben la proliferación de células mamarias tumorales MCF-7 inducida por estrógenos en presencia de estradiol. Los autores señalan que estos extractos pueden ser utilizados para el tratamiento de diferentes condiciones (patológicas o normales) relacionadas con la señalización por estrógenos, como el cáncer de mama y la menopausia.



Figura 4: Fotografía de *L. nitida*.

2.1.4. Jarilla macho, *Larrea cuneifolia* Cav. (Zygophyllaceae)

Es un arbusto que puede alcanzar una altura de 1,5 m y que puede habitar suelos pobres y arcillosos. Habita en las zonas más cálidas y secas de la Provincia Fitogeográfica del Monte. En Argentina se distribuye desde Mendoza y el límite sur de la provincia de Buenos Aires hasta Chubut. Sus ramas se disponen en forma de palma y se orientan hacia el este al igual que sus hojas. Las hojas están constituidas por dos folíolos unidos que forman una cuña (Figura 5). Las flores son pedunculadas de color amarillo y los frutos son cápsulas densamente pubescentes que en su madurez se separan en 5 mericarpos, los cuales contienen una semilla cada uno (Gandullo *et al.* 2016). Se ha descubierto que los extractos a partir de partes aéreas tienen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antifúngicas (Barboza *et al.* 2009; Königheim *et al.* 2009; Ladio y Lozada 2009). Los compuestos con actividad biológica que se han

encontrado comprenden asparagina, kaempferol, isorhamnetina y gosipetina. (Lorenzo *et al.* 2020; Ariza *et al.* 2009).



Figura 5: Fotografía de *L. cuneifolia*.

2.1.5. Jazmín de Chile, *Mandevilla laxa* (Ruiz & Pav.) Woodson (Apocynaceae)

Es una enredadera o liana perenne, con hojas opuestas, ovadas a oblongas y pubescentes en el envés. Las flores son grandes, con pétalos que miden 4-8,5 cm de longitud y con la corola contraída en un tubo angosto por debajo de la inserción de los estambres. Las inflorescencias son racimos laterales que portan de 8 a 15 flores, las cuales son de color blanco (Figura 6). Las semillas son oblongas, comprimidas, con una longitud de 8 mm (Lorenzo-Cáceres 1835; Ezcurra 1981).

A pesar del nombre vulgar no crece de forma natural en Chile; es nativa de Argentina y Bolivia. En Argentina, habita principalmente en las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, sudeste de Catamarca y noroeste de Córdoba (Giorgis *et al.* 2011). Toda la planta es usada por sus propiedades medicinales y también en festividades religiosas. Sus semillas tienen alta concentración de ácido oleico, linoleico y palmítico (Barboza *et al.* 2006, 2009). Aunque no se trate de una planta nativa de la región patagónica, fue incluida en esta tesis con fines comparativos, porque resultó positiva en un estudio previo de actividad antioxidante en plantas nativas de Córdoba (Soria *et al.* 2007).



Figura 6: Fotografía de *M. laxa* en época de floración.

2.1.6. Quelén, *Pteromonnina dictyocarpa* (Griseb.) B. Eriksen (Polygalaceae)

Es una especie herbácea perenne, con hojas alargadas, glabras o con pelos aislados (Figura 7). Las flores se encuentran en inflorescencias acrescentes que luego de la fructificación se hacen laxas. Las flores son de color violáceo, con sépalos mayores que la quilla y los pétalos laterales están unidos a la vaina de los filamentos por las caras. El fruto es una sámara, con 2 alas desiguales, uniseminado (Zuloaga *et al.* 2019). Se extiende a través de toda la formación del Monte, desde Salta en el norte hasta el norte de Santa Cruz en la Patagonia. Las infusiones son utilizadas como antidiarreico, digestivo, balsámico, entre otros (Del Vitto *et al.* 1997; Goleniowski *et al.* 2006; Barboza *et al.* 2009; Muiño 2011).



Figura 7: Fotografías de *P. dictyocarpa* extraída de Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Zuloaga *et al.* 2019).

2.1.7. Pehuén, *Araucaria araucana* (Mol.) C. Koch (Araucariaceae)

El género *Araucaria* es uno de los tres géneros que pertenecen a la familia Araucariaceae dentro de las coníferas y su área de distribución está restringida a Sudamérica, Sudoeste Asiático y Región del Pacífico Occidental, a pesar de su distribución extensa en ambos hemisferios durante la Era Mesozoica (Kershaw y Wagstaff 2001; van der Ham *et al.* 2010). Además, la mayoría de los taxones de *Araucaria* actuales han evolucionado desde el Período Terciario temprano, lo que sugiere que el éxito de estas coníferas puede depender de su capacidad para sobrevivir durante largos períodos en condiciones climáticas adversas, como sequía, frío, fuego, suelo de baja fertilidad o actividad volcánica destructiva. Quizás por estas razones, la especie *A. araucana* ha sido exitosa en ambientes volcánicos en la Patagonia Argentina y Chilena (Kershaw y Wagstaff 2001; van der Ham *et al.* 2010; Escapa y Catalano 2013). Gran parte de esa capacidad de sobrevivir por largos períodos de tiempo bajo condiciones ambientales desfavorables es atribuible a la composición de polifenoles presente en sus diversos órganos, como así también a sus formas de reproducción.

Son árboles mayormente dioicos, perennifolios, que pueden alcanzar los 50 m de altura, con copa umbeliforme en ejemplares adultos (Figura 8). La corteza es muy gruesa y rugosa, se resquebraja y desprende en placas. Las hojas se disponen en espiral, son sésiles, rígidas y de color verde-oscuro. Los conos masculinos son terminales y amentiformes; mientras que los conos femeninos son globosos y de mayor diámetro. Los conos femeninos maduros (piñas) contienen entre 120 y 180 semillas. Las semillas, comúnmente conocidas como piñones, miden 4-5 cm de largo, 1,5 cm de ancho y pesan aproximadamente 3 g (Zuloaga *et al.* 2019) (Figura 8). La parte comestible del piñón corresponde a la pulpa (peso medio 1,8 g por piñón) y está compuesta por el endosperma y el embrión; mientras que la parte descartada corresponde a la cáscara que está conformada por una capa externa de mayor rigidez y grosor, y una capa interna delgada y frágil. Habita en suelos volcánicos en los bosques andino-patagónicos. Los piñones se comen como postre o alimento en sí mismo porque poseen un gran valor alimenticio por su alto contenido en hidratos de carbono. Estas semillas les proporcionaban a los mapuches comida de reserva para dos o tres años, cuando la cosecha había sido abundante. Los piñones tostados son molidos y se obtiene harina de piñón, con la cual se hacen tortas y otros alimentos. Debido a su elevado contenido de fibra dietética y de almidón resistente, y por ser un alimento libre de gluten podría ser relevante en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades como cáncer de colon, divertículos, enfermedades crónicas no transmisibles y afecciones cardiovasculares y en personas con enfermedad celíaca (Bergesse *et al.* 2020).

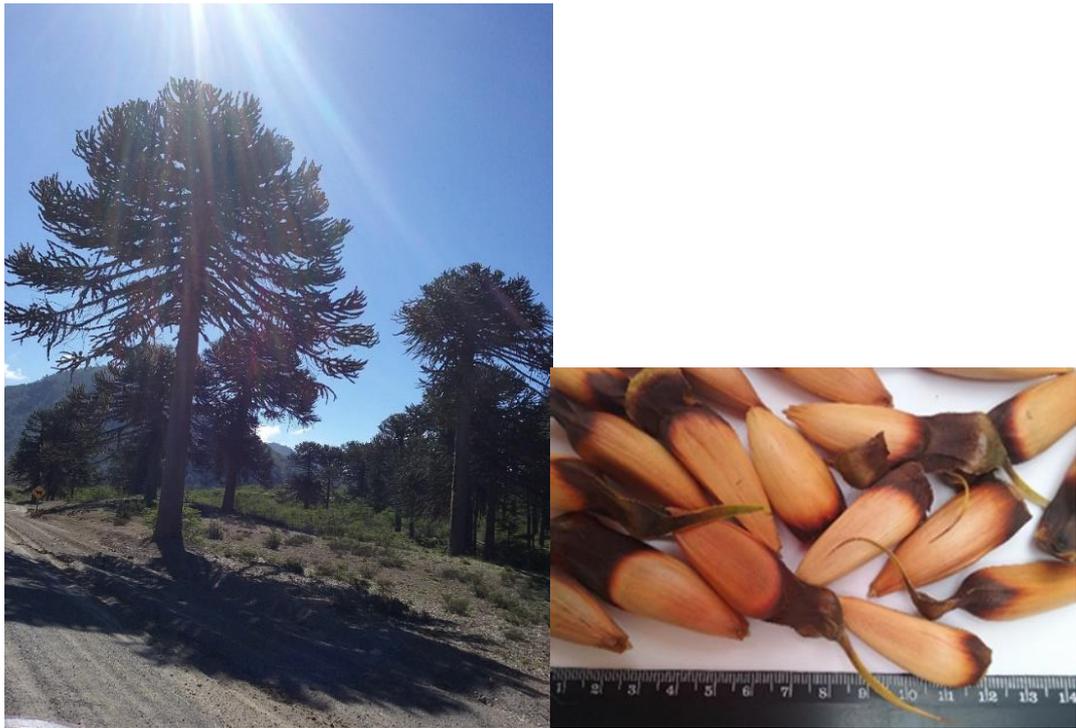
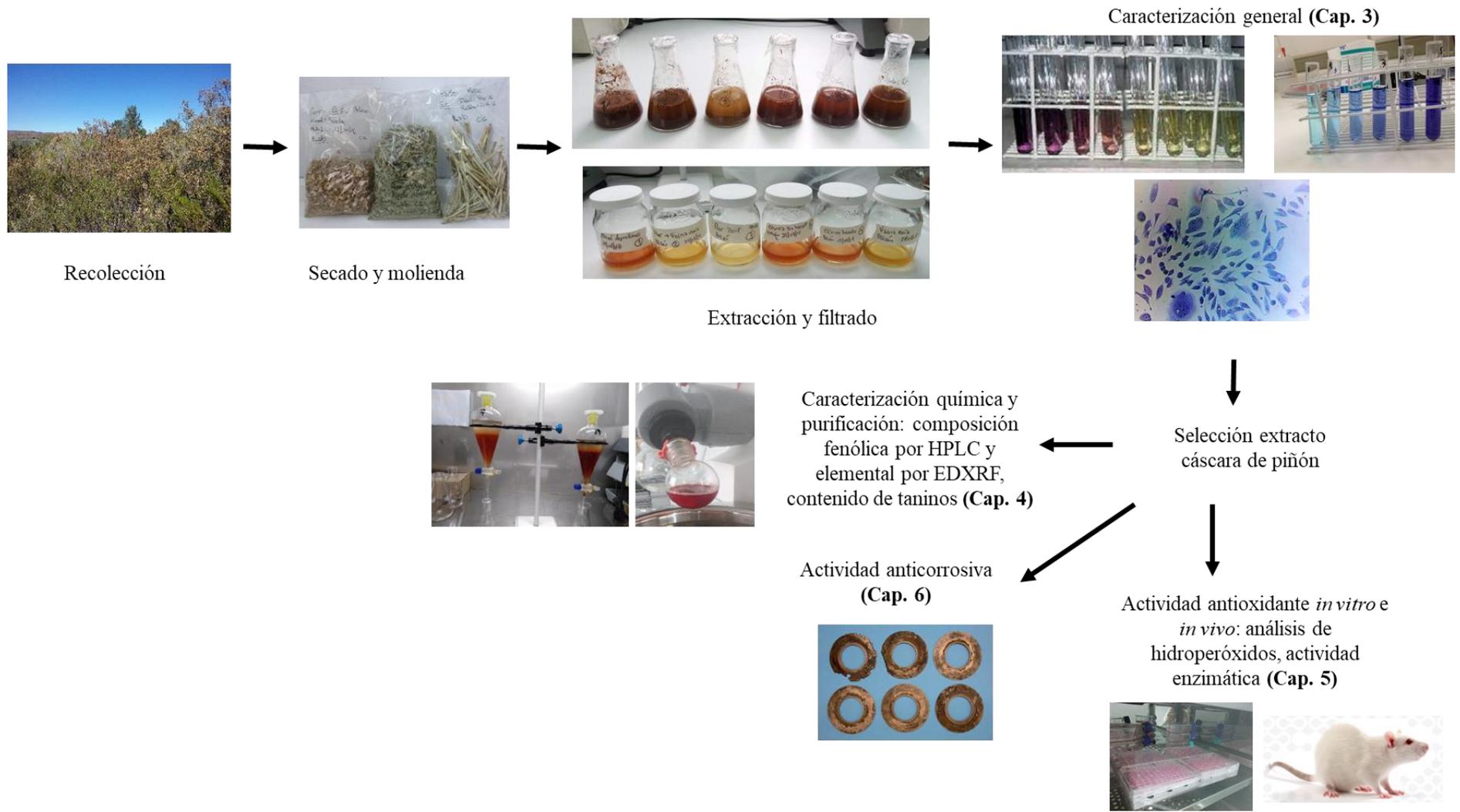


Figura 8: Fotografía de ejemplares de *A. araucana* (izquierda) y de sus semillas conocidas como piñones (derecha).

Desde el punto de vista etnomedicinal, el piñón es usado como purgante y laxante, también como cataplasma y para la caries; contra la hemorroides, quemaduras, gingivitis, hongos de la piel, leucorrea, abscesos, diarreas infantiles, tos, asma, amigdalitis, emenagogo, inflamaciones, queratolítico, disentería, ictericia, paludismo, reumatismo, conjuntivitis (Iturralde 2022). Por otra parte, la resina de Pehuén se usa con fines gastroprotectores, para tratar contusiones, para mejorar la cicatrización de heridas y también contra la fiebre (Schmeda-Hirschmann *et al.* 2005; Azar 2008). Además, la resina combinada con barro se usa para úlceras de la piel, ciática y dolores de cabeza (Azar 2008). La actividad gastro protectora de la resina se ha relacionado con la presencia de diterpenos como principales constituyentes de la misma (Schmeda-Hirschmann *et al.* 2005). También se ha descrito que la madera tiene actividad antibacteriana y antifúngica (Barboza *et al.* 2009; Reis *et al.* 2014).

2.2. ESQUEMA GENERAL y ESTRUCTURA DE LOS CAPITULOS.....



CAPITULO 3

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA GENERAL DE LOS EXTRACTOS

3.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

3.1.1. Estrés oxidativo y salud

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) y del nitrógeno (ERNs) son iones o moléculas diversas que incluyen tanto a especies no radicales como a los radicales libre (Sies y Jones 2020). Los radicales libres contienen uno o más electrones desapareados en su orbital externo y permanecen muy poco tiempo en ese estado ya que rápidamente son capaces de sustraer o donar un electrón para estabilizarse. Las EROs y ERNs son generadas normalmente en las células en cantidades limitadas y participan de diversas funciones, tales como: transducción de señales, expresión génica, proliferación, migración y diferenciación celular (Pisoschi *et al.* 2021). Sin embargo, la sobreproducción de especies como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), anión superóxido (O₂⁻), anión hidroxilo (OH⁻), óxido nítrico (NO⁻) y peroxinitrito (ONOO⁻), entre otras, ocasiona alteración de la estructura y función de las biomoléculas y se relaciona con la liberación de moléculas inflamatorias como prostaglandinas e isoprostanos, por ejemplo (Galano *et al.* 2017). En este sentido, los radicales libres inducidos por la peroxidación están implicados en la patogénesis de la inflamación crónica que puede desencadenar diversas condiciones patológicas como la artritis y el cáncer, entre otras (Nunes *et al.* 2020). Además, los procesos inflamatorios también promueven un aumento de la concentración de radicales libres en el organismo (Khansari *et al.* 2009). Los agentes externos que ocasionan aumento de la producción celular de EROs y ERNs incluyen el aire y agua contaminada, herbicidas, plaguicidas, tabaco, alcohol, metales pesados, drogas y algunos alimentos; y las fuentes internas son las reacciones catalizadas por enzimas como lipooxigenasa, mieloperoxidasa, angiotensina II y NADPH oxidasa, entre otras (Leni *et al.* 2020; Warraich *et al.* 2020; Zheng *et al.* 2020). Por otra parte, el organismo puede regular o neutralizar la acción de las especies reactivas con compuestos antioxidantes de origen endógeno o exógeno. Según Ighodaro y Akinloye (2018), en la respuesta antioxidante del organismo existen cuatro líneas de defensa: la primera formada por aquellas enzimas que previenen o suprimen la formación de radicales o especies reactivas, como las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa; la segunda línea formada por aquellos compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico, glutatión, ubiquinol, tocoferol y ácido úrico, que neutralizan o remueven los radicales donándoles un electrón y convirtiéndose en especies químicas menos dañinas. Una vez que el daño ha ocurrido, actúa la tercera línea de defensa constituida por enzimas proteolíticas, polimerasas, nucleasas, glicosilasas, que se encargan de reparar el ADN, las proteínas y lípidos dañados. Por último, una cuarta línea involucra un mecanismo adaptativo en el que la formación de un radical libre o especie reactiva produce una señal que induce la síntesis de un antioxidante apropiado o

enzima antioxidante a través del ARE (Elemento de Respuesta Antioxidante) por unión del factor de transcripción Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear E2).

Los antioxidantes obtenidos de fuentes exógenas pueden ser consumidos a partir de tejidos vegetales, en frutas, verduras, infusiones, especias y de otros alimentos. Estos compuestos ejercen su función mediante distintos mecanismos, tales como el secuestro de radicales libres (free radical scavenging, en inglés), la remoción de los agentes oxidantes o la quelación de iones metálicos que intervienen en algunas de las reacciones en cadena de peroxidación (Cömert y Gökmen 2018). Una clasificación general de estos antioxidantes los divide en varios grupos, dentro de los cuales, el de los polifenoles (fenoles comúnmente llamados polifenoles) es el grupo más importante ya que abarca sustancias con gran poder antioxidante como los flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos, lignanos, taninos y otros. Se ha observado que los polifenoles activan a Nrf2 y, este mecanismo adaptativo, se genera como una respuesta hormética que muestra efectos benéficos antioxidantes a bajas dosis y efectos prooxidantes, cuando se administran en dosis elevadas (Murakami 2022).

El desbalance provocado por la acumulación de las especies prooxidantes endógenas y/o exógenas y la insuficiencia de defensas antioxidantes generan estrés oxidativo, el cual puede derivar en alteraciones de las biomoléculas, daño celular y en última instancia en algún tipo de enfermedad (Pisoschi *et al.* 2021). Dentro de las enfermedades vinculadas al estrés oxidativo se encuentran los desórdenes neurodegenerativos, envejecimiento, enfermedades autoinmunes y cardiovasculares, inflamación, cáncer, artritis, entre otras (Bjørklund y Chirumbolo 2017; Feillet-Coudray *et al.* 2019; Barbosa *et al.* 2020; Vatner *et al.* 2020; Warrach *et al.* 2020; Zheng *et al.* 2020). Así, la inflamación y el estrés oxidativo están implicados de forma independiente o en conjunto, en el desarrollo y la progresión de muchas enfermedades.

La Figura 9 adaptada de Leni *et al.* (2020) muestra un resumen de lo anteriormente descrito e indica las diferentes respuestas celulares según si el nivel de EROs y ERNs es bajo o alto; es decir, si existe señalización redox fisiológica o estrés oxidativo, respectivamente.

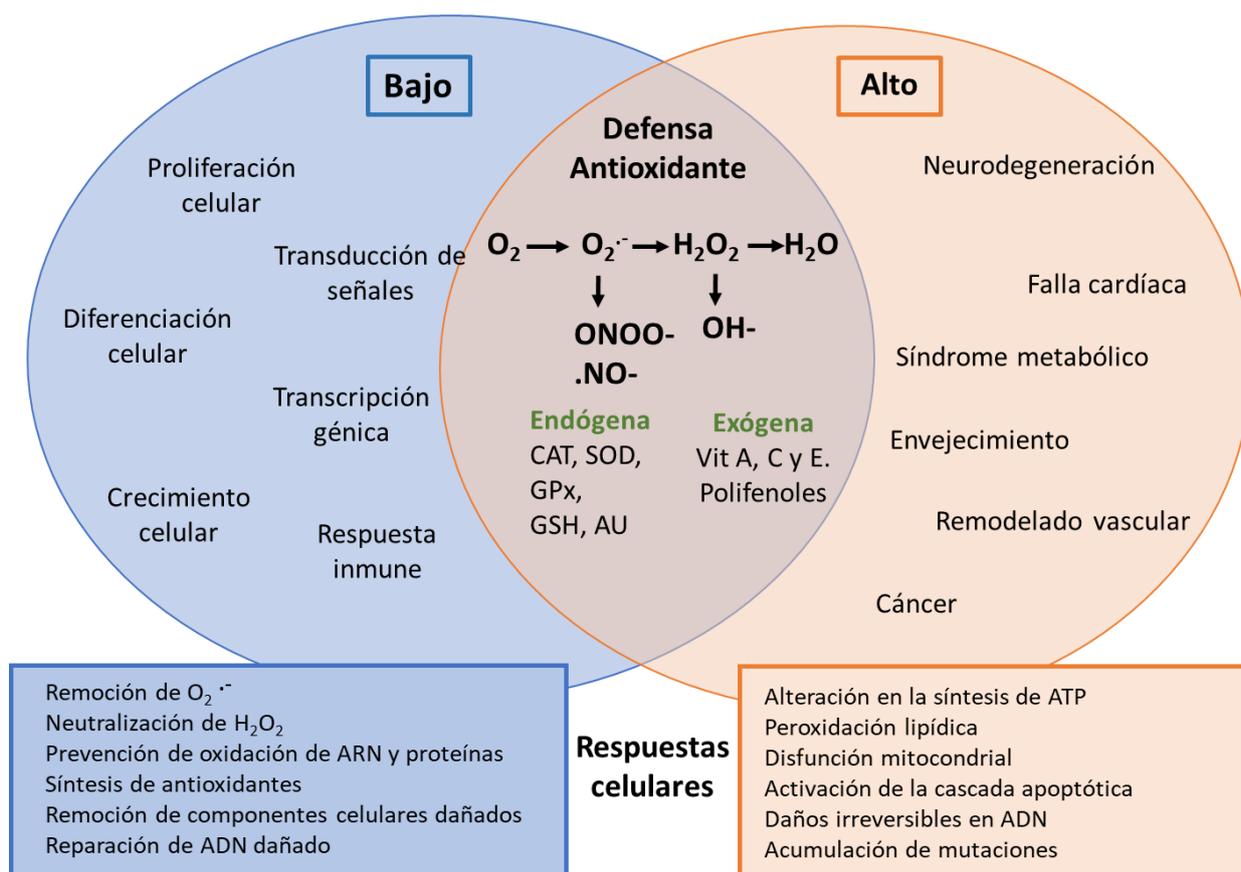


Figura 9: Respuestas celulares según nivel de EROs y ERNs presentes en la célula. Adaptada de Leni et al. (2020).

3.1.2. Plantas medicinales como fuente de antioxidantes

Como parte de la adaptación contra el ataque de patógenos y el estrés ambiental, las plantas producen varias sustancias que ejercen actividades biológicas. Estas moléculas orgánicas que provienen del metabolismo secundario y se pueden encontrar en distintos órganos o tejidos de las plantas, pueden ser utilizadas por los humanos debido a que presentan numerosas actividades biológicas. Entre las diversas funciones que presentan, destacan las acciones antiinflamatorias/antioxidantes. Debido a la estrecha relación entre inflamación/estrés oxidativo y patogénesis, algunos investigadores sugieren que dos tercios de las especies vegetales que existen en el mundo tienen valor medicinal. Es por esto que las plantas han sido históricamente la base de la medicina tradicional a lo largo del mundo y continuamente proporcionan nuevos principios activos a la humanidad. En la medicina moderna, son fuente directa de agentes terapéuticos o se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semi-sintéticos más complejos. Además, la estructura química de principios activos vegetales puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos

medicamentos (Akerle 1994). De esta forma, el descubrimiento de nuevos principios activos involucra un estudio multidisciplinario que combina técnicas botánicas, fitoquímicas, biológicas, moleculares y análisis de datos.

Par conocer la actividad biológica de un tejido vegetal (si es medicinal, antibacterial, antifúngica, venenosa o nutritiva) es necesario conocer sus componentes químicos. Los metabolitos secundarios son aquellas moléculas que le confieren actividad biológica a las plantas; y dentro de este grupo, los compuestos antioxidantes han ganado gran interés debido a que cumplen un papel muy importante ya que contrarrestan los efectos de los procesos oxidativos y previenen enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo o la inflamación (Pandey y Rizvi 2009; Krishnaiah *et al.* 2011; Bjørklund y Chirumbolo 2017; Nunes *et al.* 2020).

3.1.3. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios de las plantas medicinales son la base de sus efectos curativos, a partir de los cuales se han creado muchas drogas y remedios comerciales. La síntesis y acumulación de metabolitos secundarios es muy compleja e involucra factores internos (como el control de la transcripción) y externos (como la exposición a estrés ambiental); y comienza en las vías básicas como la glucólisis y la ruta del ácido shikímico y se diversifica según el tipo de célula, el estado de desarrollo y las señales ambientales (Li *et al.* 2020; Mahajan *et al.* 2020). Las vías de síntesis de metabolitos secundarios y su regulación son altamente susceptibles a variaciones ambientales, ya que la expresión de los genes involucrados en la síntesis de estos compuestos es alterada por diferentes tipos de estrés, como la sequía, radiación UV, salinidad, altas temperaturas, metales pesados, herbívoros, competencia con otras especies, entre otros (Borges *et al.* 2017; Sanchita y Sharma 2018; Mahajan *et al.* 2020). Por ejemplo, un efecto común de la luz UV en plantas medicinales; es que estas plantas expuestas a altas radiaciones muestran elevado contenido de fenoles y en particular, flavonoides (Christie y Jenkins 1996; Agati y Tattini 2010; Brunetti *et al.* 2019). Otro ejemplo es el incremento de la expresión de muchos genes relacionados con la síntesis de compuestos fenólicos y el contenido de polifenoles en plantas bajo condiciones de sequía (Xu *et al.* 2010; Gao *et al.* 2020).

Los metabolitos secundarios pueden agruparse en tres grandes grupos basándose en su ruta de biosíntesis: compuestos que contienen N o S, compuestos fenólicos y terpenos.

3.1.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, también conocidos como polifenoles, son el grupo más grande y

ubicuo dentro de los metabolitos secundarios vegetales y se caracterizan por poseer uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Estos compuestos son sintetizados en la vía fenilpropanoide y contribuyen al desarrollo de las plantas y a la interacción planta-medioambiente (Dong y Lin 2021). Se subdividen en tres grupos: ácidos fenólicos (de los cuales derivan los lignanos), cumarinas y chalconas (de las cuales se obtienen las flavonas, flavononas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas y taninos condensados) (Vuolo *et al.* 2018) (Figura 10). Pueden cumplir una serie de funciones metabólicas en las plantas relacionadas con el crecimiento y la reproducción, así como también otorgar protección contra rayos UV y patógenos, defensa contra herbívoros, entre otros. Se ha confirmado ampliamente que estos compuestos presentan gran capacidad de contrarrestar los efectos de las EROs, a través de la regulación enzimática que reduce las especies reactivas y la modulación de los procesos que ocurren durante las reacciones de reducción (Pisoschi *et al.* 2021).

En las plantas estos compuestos pueden acumularse en diferentes células, tejidos y órganos, y su presencia les puede conferir distintas propiedades medicinales, muchas de ellas aprovechadas por la industria farmacológica, alimenticia y nutracéutica. Entre los numerosos ejemplos, se puede citar a *Vitis vinífera* que presenta diferentes compuestos fenólicos como proantocianidinas, catequinas, ácido gálico, resveratrol, quercetina, rutina, kaempferol en fruta, semillas, tallos y hojas (Oyenihi y Smith 2019). Por otra parte, en hojas de especies medicinales de la familia *Lamiaceae*, como *Salvia officinalis*, *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* y *Melissa officinalis*, se ha encontrado que los principales compuestos fenólicos son los ácidos cinámico e hidrocarboxílico, y también se describió la presencia de otros compuestos como ácido rosmarínico, ácido cafeico, hesperetina, epicatequina, naringenina, quercetina (Milevskaya *et al.* 2019). Las raíces también pueden ser fuentes de compuestos fenólicos, como las de *Zingiber officinalis* que tienen gingerol y shogaol, con propiedades anticancerígenas (Shukla y Singh 2007); como también los frutos como la granada *Punica granatum* y las bayas (berries) ricas en antocianinas, con propiedades antiinflamatoria, anticancerígena y antihipertensiva (Khwairakpam *et al.* 2018; Golovinskaia y Wang 2021).

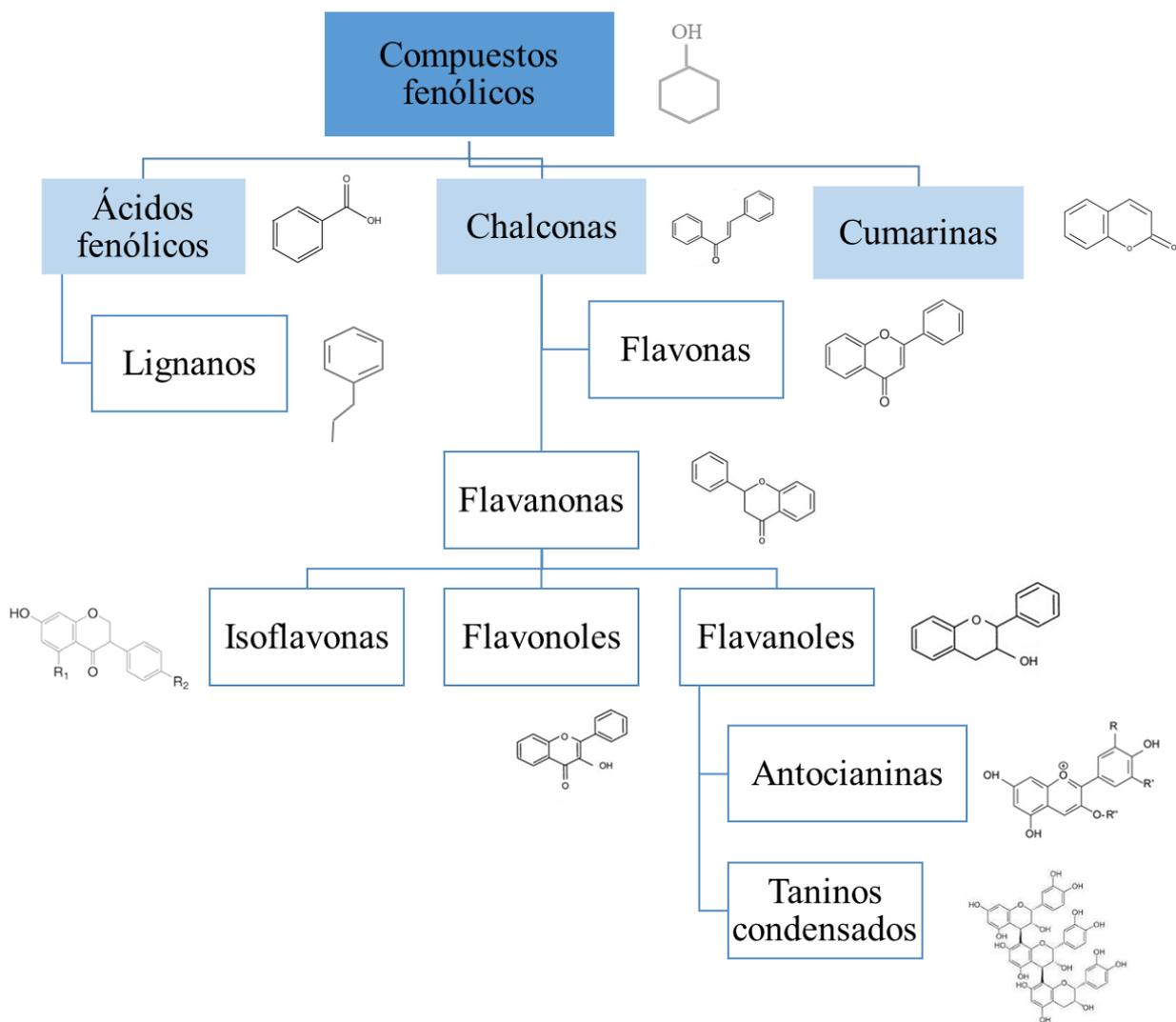


Figura 10: Clasificación de compuestos fenólicos. Adaptada de Vuolo et al. (2018).

3.1.5. Flavonoides

Los flavonoides forman el grupo más grande dentro de los compuestos fenólicos, con una amplia diversidad estructural y funcional. Son utilizados por las plantas para su crecimiento y defensa contra plagas, como agentes detoxificantes y antimicrobianos, como así también son responsables del color y aroma de flores para atraer a los polinizadores (Panche *et al.* 2016). Las diferencias entre las subclases radican en el grado de hidroxilación, sustituciones y conjugaciones, y el grado de polimerización. Están formados por un esqueleto carbonado de más de 15 carbonos que consiste en dos anillos de benceno (A y B) unidos por un anillo heterocíclico de pirano (C). Según el patrón de sustitución del anillo C se pueden distinguir las distintas clases de flavonoides: flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, antocianinas y taninos condensados; y según el patrón de sustitución de los anillos A y B, se diferencian los compuestos individuales como: kaempferol, quercetina, luteolina, naringenina, entre otros

(Panche *et al.* 2016).

Los flavonoides que se encuentran en las frutas y verduras son los responsables, generalmente, de su color, sabor y conservación; y entre ellos, los más comunes son las flavonas, flavonoles, antocianidinas e isoflavonas. Es ampliamente conocido que los flavonoides poseen propiedades que promueven la salud humana y que ayudan a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas (Dias *et al.* 2021). Por ejemplo, se ha sugerido que beber té verde o negro disminuye la concentración de colesterol y la presión sanguínea, que comer frutos rojos puede contrarrestar efectos causados por el Parkinson y mejorar la memoria en ancianos y que la cáscara de la naranja tiene propiedades antitrombogénicas, antiinflamatorias y anticancerígenas, entre otras (Kumar y Pandey 2013; Shahidi y Ambigaipalan 2015; Cömert y Gökmen 2018).

Numerosos trabajos científicos y estudios epidemiológicos han demostrado que una dieta rica en múltiples antioxidantes, como flavonoides, carotenoides, vitaminas y fibras, puede ofrecer un alto valor nutricional y beneficios para la salud ya que estos compuestos podrían actuar tanto individualmente como sinérgicamente (Panche *et al.* 2016). Esto es resultado de la combinación de los diferentes modos de acción de estos compuestos activos, que aumenta la eficacia y minimiza la toxicidad (Lee y Lee 2006). Por ejemplo, la combinación de α -tocoferol y flavonoides o Vitamina C mostró mayor potencial antioxidante que la suma de sus efectos antioxidantes individuales, generándose un sinergismo entre los distintos compuestos (Jørgensen *et al.* 1999). Otro ejemplo de sinergismo se ha encontrado entre frutas como naranja, manzana, uva y arándanos (Liu *et al.* 2000). En este contexto, una dieta rica en frutas, verduras y granos, sin alimentos ultraprocesados y ricos en azúcar, parece estar asociada con una alta prevención de enfermedades ligadas al estrés oxidativo.

3.1.6. Hipótesis

Los extractos acuosos de plantas nativas, seleccionadas por su uso en medicina tradicional, presentan alto poder antioxidante dado por su alto contenido de fenoles y flavonoides, y constituyen una fuente potencial de ingredientes nutraceuticos.

3.1.7. Objetivo

Evaluar el poder antioxidante de extractos acuosos de especies vegetales nativas usadas tradicionalmente como antiinflamatorias, caracterizarlos según su contenido de fenoles y flavonoides y estudiar su toxicidad en líneas celulares normales y tumorales con el fin de evaluar su posible uso como nutraceutico o fitoterápico.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Reactivos químicos

El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), los antibióticos, los reactivos y los estándares se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Saint Louis, MO, EEUU. El suero fetal bovino se adquirió de Natocor, Córdoba, Argentina. Se usó agua Milli-Q en todos los experimentos. Los filtros PES estériles de 0,22 μm procedían de GVS Filter Technology, Bolonia, Italia. Las auxinas, citoquininas, agar, D-sacarosa y el medio basal Murashige y Skoog con vitaminas y MES procedían de PhytoTechnology Laboratories L.L.C, Lenexa, KS, EE. UU. El ácido giberélico Giberelina GA3 KA® se adquirió de S. ANDO Y CÍA SA, Buenos Aires, Argentina.

3.2.2. Obtención del material

Con el objetivo de comparar las propiedades antioxidantes se utilizaron tres fuentes vegetales diferentes: material vegetal aéreo extraído a campo de diferentes especies, semillas del Pehuén (que incluyen productos y residuos derivados de la industria del piñón) y células obtenidas *in vitro* a partir de piñones.

3.2.2.1 Material vegetal recolectado a campo

A fin de obtener los extractos vegetales con potencial actividad antioxidante, se utilizaron los tejidos vegetales que han sido utilizados por la medicina tradicional de la región con propiedades antiinflamatorias. Se recolectaron hojas y tallos de las siguientes especies: *M. aphylla*, *L. cuneifolia*, y *L. nitida* en el mes de febrero en El Chocón, Provincia de Neuquén (Figura 11). Las hojas y tallos de la *G. chilensis*, fueron recolectados en el mes de octubre en la zona de bardas de la ciudad de Neuquén, cercana a la Sede Central de la Universidad Nacional del Comahue (UNCo) (Figura 12). Las especies *P. dictyocarpa* y *M. laxa* fueron identificadas y recolectadas por el Dr. J.J. Cantero en los alrededores de la localidad de Valle Hermoso, Sierras Chicas, de la provincia de Córdoba en el mes de febrero. Se seleccionaron partes sanas, con ausencia de insectos, mohos, polvo, etc. Todo el material recolectado de cada una de las especies mencionadas fue lavado luego de su recolección durante 30 minutos y luego secado en un ambiente controlado, con temperatura de $20\pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa menor al 30% (testado con higrómetro) y protegido de la luz durante 20 días aproximadamente. Se controló visualmente la preservación del material durante el proceso de secado y se aseguró el correcto secado mediante la obtención de un peso estable y un valor de actividad acuosa de $0,3\pm 0,1$, empleando un higrómetro de punto de rocío modelo Series 3 (Aqua-Lab, Decagon Devices Inc., EEUU). Una vez seco, se trituró con un molinillo de café hasta obtener un polvo

moderadamente grueso, que se recomienda para el tipo de extracción utilizado posteriormente (infusión y maceración) (Sharapin *et al.* 2000). Luego, cada material fue tamizado con tamiz N°40 (tamaño de la abertura: 425 µm), rotulado y almacenado en bolsas herméticas en un lugar seco, fresco y oscuro.

Con respecto a la especie *A. araucana*, se recolectaron del suelo piñones en distintos estados (normales-maduros, defectuosos y vacíos) y conos masculinos a partir de árboles adultos cercanos a la localidad de Villa Pehuenia (38°50'02.3"S 71°12'24.1"O) en los meses de marzo o abril de los años 2016, 2017 y 2018 (Figura 13). Desde 2018, los piñones fueron provistos por la Empresa Nous de Villa Pehuenia (Neuquén, Argentina), en el marco de acuerdos de colaboración establecidos entre la misma (<https://www.facebook.com/NousVillaPehuenia/about>) y el Grupo de Investigación en Biotecnología Ambiental del PROBIEN (CONICET-UNCo). Los piñones en buen estado fueron separados en las siguientes partes: embrión, endosperma, pulpa (embrión + endosperma), cáscara fina interna, cáscara gruesa externa, cáscara total (cáscara fina interna + cáscara gruesa externa). Aquellos defectuosos (con escasa pulpa) y vacíos (sin pulpa) fueron utilizados íntegramente. Los distintos tejidos fueron secados durante 24 h en estufa de secado (marca: San Jor, Modelo: SL30SDB, Argentina) a 40°C, según el método utilizado para el secado de tejidos de *A. angustifolia* (Oliveira *et al* 2015). Luego se procedió con la molienda y tamizado de las muestras siguiendo el mismo protocolo utilizado para las especies con uso medicinal. Una parte de los piñones frescos fue utilizada sin el proceso de secado (ver detalles de extracción en el punto 3.2.3.1.)



*Figura 11: Fotografía del lugar de recolección de *L. nitida*, El Chocón (Neuquén).*



*Figura 12: Fotografía del lugar de recolección de *G. chilensis*, zona de bardas de la UNCo, Neuquén.*



Figura 13: Fotografía del lugar de recolección de piñones, Villa Pehuenia, Neuquén.

3.2.2.2 Productos y residuos derivados de la industria del piñón

Diferentes productos y residuos derivados de la industria alimenticia del piñón fueron provistos por la empresa Nous de Villa Pehuenia, en el marco de un Proyecto de Vinculación Tecnológica y posteriores acuerdos de colaboración. Como parte de este trabajo de tesis se analizaron piñones “hervidos” utilizados por la empresa para la elaboración de varios productos alimenticios y además algunos de los productos como piñones en almíbar (Figura 14 A), almíbar, café y harina. Para la elaboración del café y la harina, la empresa utiliza piñones “tostados”. Los piñones hervidos fueron separados en endosperma, embrión (Figura 14 B y C) y cáscara. Todas las partes del piñón fueron analizadas, lo cual incluye a los residuos de la elaboración de los productos alimenticios de Nous: cáscaras de piñones hervidos y tostados y agua del hervor. Las cáscaras de los piñones hervidos o tostados fueron secadas y luego separadas en cáscara gruesa (Figura 14 D) y cáscara fina (Figura 14 E). La pulpa de los piñones tostados a 150 y 180°C corresponde a harina y café, respectivamente. El agua de piñones hervidos y el almíbar fueron utilizados en el estado en el que fueron provistos por la empresa. Los piñones en almíbar fueron procesados con los mismos procedimientos descritos para los piñones frescos y los resultados fueron obtenidos para caracterizar un producto alimenticio elaborado con piñones.

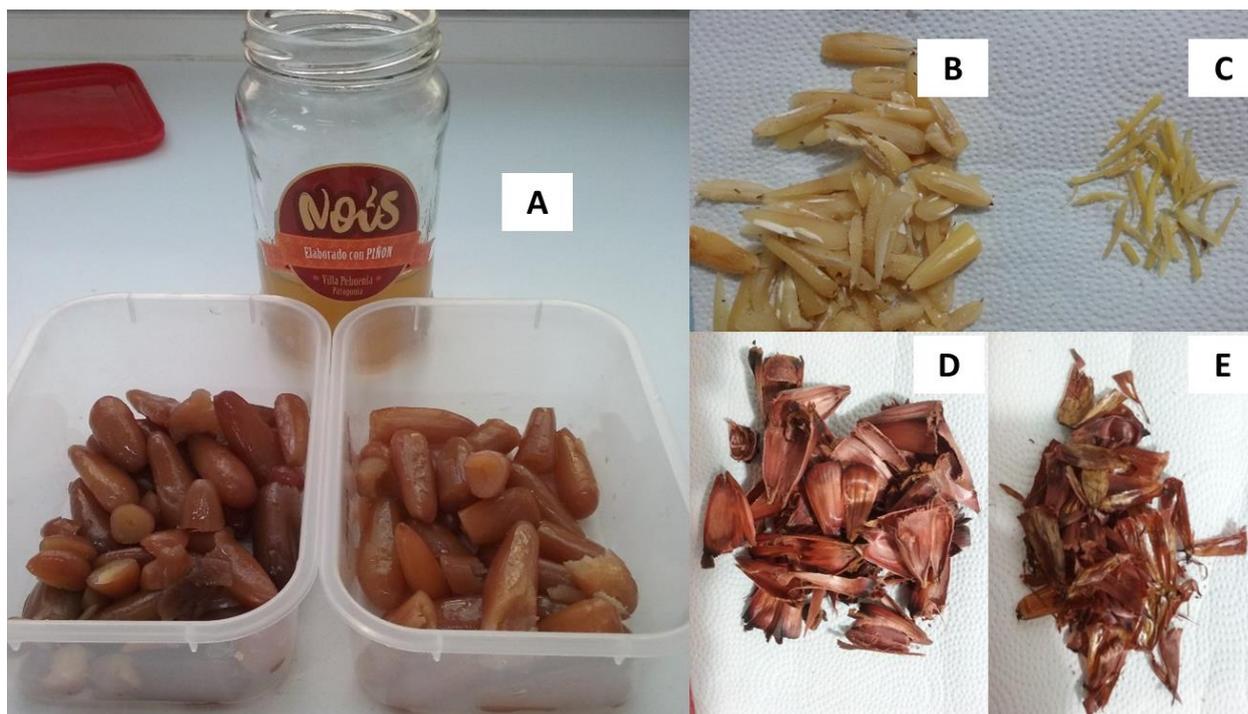


Figura 14: Productos y residuos derivados de la industria del piñón. A) Piñones en almíbar; B-E) piñones hervidos: B) endosperma, C) embriones, D) cáscaras gruesas y E) cáscaras finas.

3.2.2.3. Callos de células de piñón obtenidos *in vitro*

Se analizaron callos de piñón obtenidos en diferentes condiciones. La inducción de callos a partir de varias especies vegetales, incluida *A. araucana*, fue iniciada por la Ing. Qca. Julieta Echeverri Del Sarto que demostró que los piñones de esta especie producen callos *in vitro*. Para optimizar la inducción de callos, mejorar el rendimiento de biomasa y la producción de antioxidantes desde los cultivos celulares, se ensayaron diferentes condiciones de crecimiento, en colaboración con la Ing. Del Sarto. Para iniciar los cultivos, la cáscara de los piñones fue removida y las pulpas fueron cultivadas en dos formas: rodajas de piñón que contenían endosperma y embrión o embriones solos (separados del endosperma); en ambos casos se utilizaron semillas seleccionadas por su color, tamaño y turgencia. El proceso de desinfección se realizó en cabina de flujo laminar bioseguridad y consistió en sumergir las rodajas o embriones por dos minutos en una solución de etanol al 70% y luego en una solución de hipoclorito de sodio comercial (1,5 % de cloro activo diluido en agua) durante 15 minutos. Los lavados intermedios y finales fueron hechos en agua Milli-Q estéril. Los cultivos de callos fueron inducidos en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agarosa, y se ajustó el pH a $5,6 \pm 0,2$. El medio fue suplementado con distintas combinaciones y concentraciones de auxinas y citoquininas y una concentración de giberelina. Se probó ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) en dos concentraciones (1 y 2 mg/l) sólo o

combinado con 6-bencilaminopurina (BAP) en dos concentraciones (1 y 2 mg/l). También, ácido α -naftalenoacético (NAA) en dos concentraciones: 1 mg/l combinado con 6-bencilaminopurina (BAP) en tres concentraciones (1, 1,5 y 2 mg/l); y 2 mg/l NAA combinado con 2 mg/l BAP. Además se probó el medio combinando 1 mg/l NAA, 1,5 mg/l BAP y 0,5 mg/l ácido giberélico (AG), y el medio sólo con BAP 1 mg/l. Todas estas combinaciones fueron testeadas en condiciones de luz (L) y oscuridad (O) para evaluar las mejores condiciones de crecimiento y producción de antioxidantes.

Los cultivos fueron puestos a crecer en una cámara de cultivo a 23°C bajo un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad (luces LED blanca, azul y roja) o en oscuridad y subcultivados cada 4 semanas. El porcentaje de formación de callos se estimó a los 70 días, a través de la evaluación de presencia/ausencia de callo por embrión a partir de 5-6 embriones por caja de Petri, por triplicado en 3 experimentos independientes.

3.2.3. Preparación de extractos vegetales

3.2.3.1. Extractos de plantas con usos medicinales

Para la elaboración de extractos a partir de hojas y tallos, se utilizaron diferentes proporciones de material vegetal/solvente, ya que según Sharapin *et al.* (2000), la extracción depende de la naturaleza, del tamaño de partícula y de la capacidad de absorción de agua del material vegetal; y el rendimiento del extracto disminuye cuando la relación material vegetal/solvente aumenta. Por este motivo, se utilizaron diferentes volúmenes de solvente para cada especie, dependiendo de la capacidad de absorción de agua de la molienda (Tabla 1). En todos los casos, se obtuvo un $50 \pm 10\%$ de volumen de extracto con respecto al volumen de solvente utilizado inicialmente. Dado que los extractos podrían tener un futuro uso como ingredientes nutracéuticos, se eligió al agua como solvente para asegurar un proceso más seguro para la salud. Por otro lado, la infusión en agua es un método comúnmente aplicado para su uso medicinal. En todos los extractos se utilizaron 12 g de material vegetal a los cuales se les agregaron distintas cantidades de agua según la especie: en el caso de *P. dictyocarpa* y *M. laxa* se agregaron 250 ml; en *G. chilensis* 150 ml, en *M. aphylla*, *L. cuneifolia* y *L. nitida* 50 ml (Tabla 1). Por otro lado, se elaboraron extractos a partir de la mezcla de especies que se utilizan en medicina tradicional con fines antiinflamatorios: una de ellas a partir de 6 g de *G. chilensis* más 6 g de *M. aphylla*; y otra a partir de 6 g de *G. chilensis* y 6 g. de *L. cuneifolia*; a las cuales se les agregaron 150 ml de agua.

Tabla 1: Referencias de extractos elaborados a partir de las distintas especies vegetales con uso medicinal

Especie	Proporción (g/ml agua)	Solvente de extracción	Referencia
<i>M. laxa</i>	12:250	agua TA	MLA
		agua 100°C	MLC
<i>P. dictyocarpa</i>	12:250	agua TA	MDA
		agua 100°C	MDC
<i>L. nitida</i>	12:50	agua TA	LNA
		agua 100°C	LNC
<i>L. cuneifolia</i>	12:50	agua TA	LCA
		agua 100°C	LCC
<i>G. chiloensis</i>	12:150	agua TA	GCA
		agua 100°C	GCC
<i>M. aphylla</i>	12:50	agua TA	MAA
		agua 100°C	MAC
<i>G. chiloensis</i> + <i>M. aphylla</i>	6:6:150	agua 100°C	GCC+MAC
<i>G. chiloensis</i> + <i>L. cuneifolia</i>	6:6:150	agua 100°C	GCC+LCC
Pulpa piñones <i>A. araucana</i>	30:50	agua TA	PFA
		agua 100°C	PFC

La pulpa de piñones frescos de *A. araucana* se utilizó en estado fresco (sin secar), y los extractos se prepararon a partir de 30 g de material y 50 ml de agua.

Se realizaron dos tipos de extracciones: una partió de una infusión a 100°C, que luego se dejó enfriar y macerar durante 24 h a temperatura ambiente (TA); y la otra, se obtuvo únicamente por maceración a TA durante 24 h. Para las mezclas sólo se utilizó la extracción con agua a 100°C. Posteriormente, fueron filtrados con discos de 125 mm de papel de filtro cualitativo de velocidad media y almacenados en freezer a -20°C para su análisis posterior.

3.2.3.2 Extractos a partir de piñones de *A. araucana*

En la Figura 15 se muestran los diferentes procesos de obtención de los extractos a partir de piñones frescos, hervidos a 100°C, hervidos a 120°C y tostados a 150°C. Los piñones se componen de la pulpa (conformada por el endosperma y el embrión) y la cáscara total formada por dos capas: una capa externa, de mayor rigidez y grosor, a la que se denominó “cáscara gruesa”; y una capa interna, delgada y frágil, a la que se denominó “cáscara fina”. Al igual que con los extractos de especies con uso medicinal, se utilizaron distintos volúmenes de solvente según la capacidad de absorción del tejido. Por esto, para tejidos con mayor capacidad de absorción de agua como las cáscaras se usaron mayores volúmenes, mientras que, para embrión, endosperma y pulpa, se utilizaron menores volúmenes.

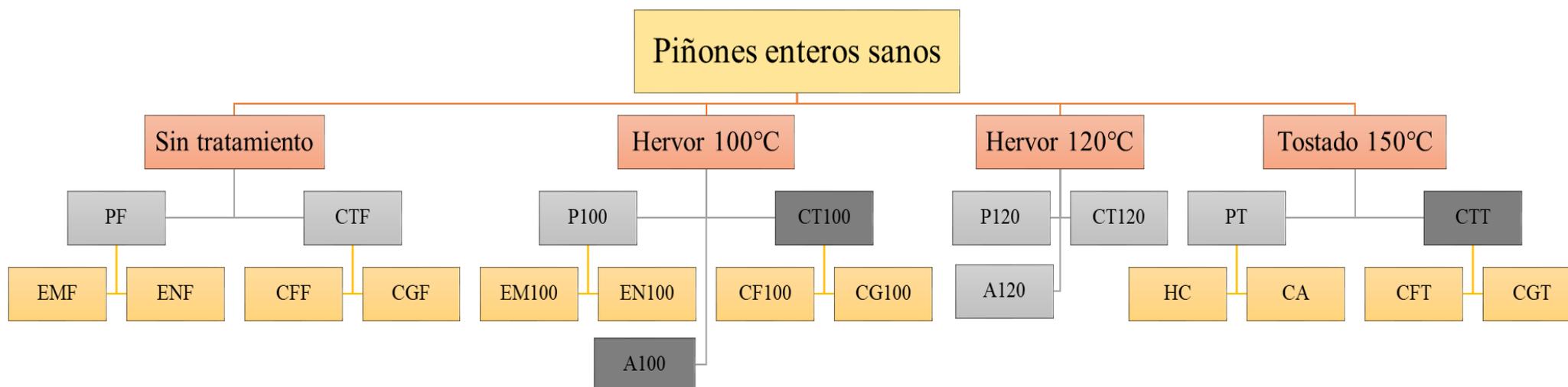


Figura 15: Diagrama que muestra los diferentes procesos de obtención de los extractos del piñón (ver detalles en el texto). Los demarcados en gris oscuro corresponden a los residuos de la industria. Dónde: P: pulpa; EM: embrión; EN: endosperma; CF: cáscara fina; CG: cáscara gruesa; CT: cáscara total; A: agua; H: harina; CA: café.

3.2.3.2.1. Piñones frescos

Se obtuvieron extractos a partir de la cáscara total de los piñones frescos. Se utilizaron 12 g de material vegetal (Figura 16 A) a los cuales se les agregó 150 ml de agua a TA o a 100°C. Por otro lado, se realizaron extractos a partir de la cáscara fina y gruesa de los piñones con las mismas proporciones que con cáscara total (Figura 16 B).

La pulpa, el endosperma y los embriones se utilizaron en estado fresco (sin secar). En cada caso se agregaron 50 ml de agua (TA o 100°C) a 30 g de material vegetal (Tabla 2).

Los extractos a partir de conos masculinos, piñones defectuosos y vacíos fueron realizados a 100°C en una proporción de 12 g de material vegetal en 150 ml de agua.

Tabla 2: Referencias de extractos elaborados a partir de piñones frescos recolectados desde 2016 hasta 2019

Extracto	Proporción (g muestra/ml agua)	Solvente de extracción	Referencia
<i>Pulpa</i>	30:50	agua TA	PFA
		agua 100°C	PFC
Embrión	30:50	agua TA	EMFA
		agua 100°C	EMFC
Endosperma	30:50	agua TA	ENFA
		agua 100°C	ENFC
Cáscara total	12/150	agua TA	CTFA
		agua 100°C	CTFC
Cáscara fina	12/150	agua TA	CFFA
		agua 100°C	CFFC
Cáscara gruesa	12/150	agua TA	CGFA
		agua 100°C	CGFC
Piñones defectuosos	12/150	agua 100°C	PDC
Piñones vacíos	12/150	agua 100°C	PVC

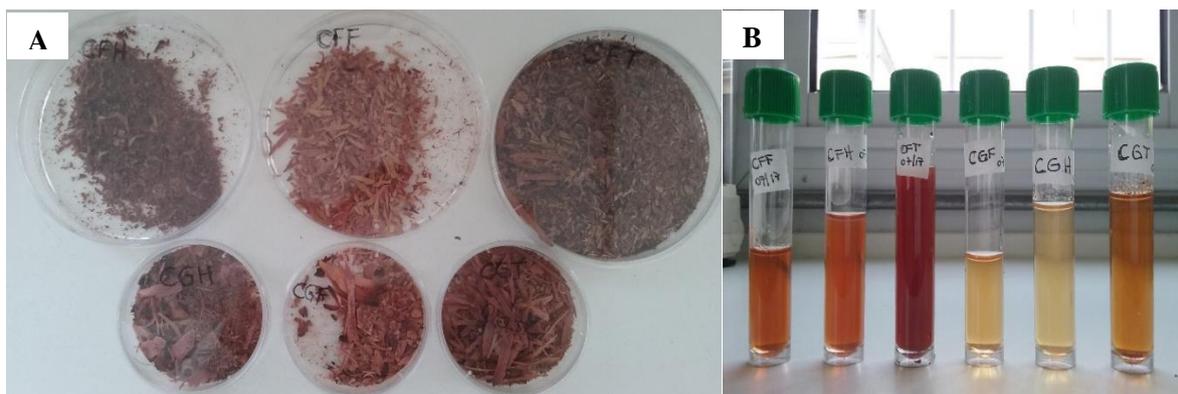


Figura 16: A) cáscaras de piñón trituradas y B) extractos elaborados a partir de dicho material vegetal.

3.2.3.2.2. Piñones hervidos

Por otra parte, algunos de los piñones frescos fueron sometidos a dos tratamientos de calor: hervor a 100°C y 120°C durante 10 minutos, de los cuales se obtuvieron por un lado el agua y por el otro los piñones hervidos. El tratamiento a 100°C es equivalente al procedimiento utilizado para la preparación de alimentos como piñones en almíbar, por lo que, en algunos casos, se utilizaron las cáscaras y el agua de hervor provistos por Nous. Los piñones sometidos a 100°C fueron separados en: embrión, endosperma, pulpa (embrión + endosperma), cáscara total, cáscara fina y gruesa (excepto los piñones defectuosos y vacíos que fueron utilizados enteros). En cuanto a los piñones hervidos a 120°C en autoclave, se separaron cáscara total y pulpa. Todas las partes obtenidas en los dos tratamientos fueron secadas en estufa a 40°C y luego molidas para elaborar los extractos. Las proporciones utilizadas fueron 12 g en 50 ml de agua a TA o a 100°C para embrión y endosperma, 12 g en 50 ml de agua a 100°C para pulpa y 12 g en 150 ml de agua a 100°C para todos los tipos de cáscaras (Tablas 3 y 4). Por otra parte, el agua de hervor a ambas temperaturas fue filtrada y congelada en freezer a -20°C.

Tabla 3: Referencias de extractos elaborados a partir de piñones hervidos a 100°C

Extracto	Proporción (g muestra/ml agua)	Solvente de extracción	Referencia
Embrión	12/50	agua TA	EM100A
		agua 100°C	EM100C
Endosperma	12/50	agua TA	EN100A
		agua 100°C	EN100C
Pulpa	12/50	agua 100°C	P100C
Cáscara total	12/150	agua 100°C	CT100C
Cáscara fina	12/150	agua 100°C	CF100C
Cáscara gruesa	12/150	agua 100°C	CG100C
Piñones defectuosos	12/150	agua 100°C	PD100C
Agua piñones sanos	12/150	agua 100°C	A100
Agua piñones defectuosos	12/150	agua 100°C	AD100

Tabla 4: Referencias de extractos elaborados a partir de piñones hervidos a 120°C en autoclave

Extracto	Proporción (g muestra/ml agua)	Solvente de extracción	Referencia
Pulpa	12/50	agua 120°C	P120
Cáscara total	12/150	agua 120°C	CT120
Agua piñones sanos	12/150	agua 120°C	A120
Agua piñones defectuosos	12/150	agua 120°C	AD120

3.2.3.2.3. Piñones tostados

La cáscara de los piñones tostados fue separada en cáscara total, cáscara fina y gruesa; todas fueron molidas y utilizadas en una proporción 12:150 de agua a 100°C. Con la harina y café provenientes de las pulpas de piñones tostados se elaboraron extractos a TA y/o 100°C en una proporción 12:150 de agua (Tabla 5). No se realizaron extractos de cáscara a TA porque los resultados obtenidos con piñones frescos indicaron que este tratamiento tiene poca eficiencia para la extracción de antioxidantes.

Tabla 5: Referencias de extractos elaborados a partir de piñones tostados

Extracto	Proporción (g muestra/ml agua)	Solvente de extracción	Referencia
Cáscara total	12/150	agua 100°C	CTTC
Cáscara fina	12/150	agua 100°C	CFTC
Cáscara gruesa	12/150	agua 100°C	CGTC
Harina	12/50	agua TA	HC
		agua 100°C	HA
Café	12/50	agua 100°C	CC

3.2.3.2.4. Piñones en conservas

El frasco con los piñones en almíbar fue abierto inmediatamente antes del proceso de extracción. Los piñones en almíbar fueron discriminados en oscuros y claros, ya que se desconocía si la coloración se debía a una diferencia en la absorción de taninos provenientes de la cáscara durante el hervor o a las condiciones de almacenamiento. Ambos fueron procesados en mortero y luego se agregó agua a TA o a 100°C en una proporción 30 g/50 ml por tratarse de peso húmedo.

Todos los extractos de piñones, descritos anteriormente, fueron macerados toda la noche, filtrados con papel de filtro cualitativo de velocidad media (tamaño de poro: 125 micras), luego centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos y por último se extrajo el sobrenadante, que fue almacenado en freezer a -20°C para su análisis posterior. Por su parte, el almíbar fue filtrado y almacenado en freezer a -20°C.

3.2.3.3. Extractos a partir de callos de células de piñón obtenidos in vitro

Los callos frescos de embriones de *A. araucana* fueron triturados en mortero con el agregado de agua a TA, en una proporción 30 g en 50 ml. Con fines comparativos, se utilizó la misma proporción de material fresco/solvente que para los embriones de piñones frescos. Una vez homogeneizados, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y se extrajo el sobrenadante. Los extractos fueron almacenados en freezer a -20°C.

3.2.4. Métodos para la determinación de actividad antioxidante de los extractos

Debido a la complejidad de los procesos de óxido-reducción, no existe un único método que

refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, por lo cual es necesario evaluarlo con diferentes métodos a fin de poder valorar su actividad e interpretar la variabilidad entre extractos. Existen dos tipos de ensayos para determinar la actividad antioxidante de una muestra: aquellos ensayos basados en la transferencia de electrones y aquellos que determinan la transferencia de átomos de hidrógeno. En la primera categoría, los más usados son ABTS, DPPH y FRAP; y en la segunda, los ensayos ORAC y TRAP. El método a utilizarse debe ser sencillo, con buena reproducibilidad, que permita diferenciar significativamente extractos vegetales y adaptables a muestras con antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

3.2.4.1. Determinación de actividad antioxidante por método de FRAP

Este método desarrollado por Benzie y Strain (1996) se basa en la reducción, por un antioxidante y en condiciones ácidas, del hierro férrico (Fe^{3+}) a hierro ferroso (Fe^{2+}). Esta reducción se puede cuantificar gracias a la acción del TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridil)-1,3,5-triazina) capaz de quelar al hierro, de forma que el complejo Fe^{3+} -TPTZ tiene una intensa coloración azul con un máximo de absorción a 595 nm y el complejo Fe^{2+} -TPTZ tiene coloración amarilla. Así, se genera una coloración de intensidad proporcional a la actividad reductora de la muestra. Por lo tanto, la formación de este complejo se puede evaluar mediante un espectrofotómetro. El método FRAP es sencillo, rápido (generalmente la reacción se completa entre 4 y 8 minutos) y se debe realizar en una matriz acuosa, por lo que debe usarse como antioxidante de referencia al ácido ascórbico o TROLOX. Para alimentos, normalmente se usa el ácido ascórbico como referencia.

Para la determinación, se preparó la solución de FRAP que consiste en la mezcla de 25 ml buffer acetato de sodio 300 mM (pH 3,6) con una solución de 2,5 ml 2,4,6-tripiridyl-s-triazina 10 mM en HCl 40 mM y 2,5 ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Se agregaron 900 μl de esta solución a 50 μl de cada muestra y se incubó 30 minutos a TA en oscuridad. Luego se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro UV-Visible PG, modelo T60V, marca PG INSTRUMENTS LTD.

Los valores se compararon con la curva de calibración realizada con ácido ascórbico 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y los resultados fueron expresados como μg equivalentes de ácido ascórbico por mg de peso seco o fresco (μg EAA/mg PS o PF).

3.2.4.2. Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH

La determinación de la eficiencia anti-radical con el método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), desarrollado por Blois (1958) se basa en la reacción de reducción del radical DPPH• por parte del compuesto antioxidante. Este método consiste en una reacción de óxido-reducción

en la cual el reactivo DPPH de color violeta (con un pico de absorbancia a 517 nm) se reduce frente al agente antioxidante y cambia a color amarillo, por lo cual la decoloración (disminución de la absorción a 517 nm) es proporcional a la actividad antioxidante.

Se realizaron curvas con diferentes diluciones de los extractos, con el fin de asegurar linealidad de la respuesta redox. Las muestras se diluyeron de acuerdo con los resultados obtenidos y se utilizaron 50 µl de cada extracto vegetal para las determinaciones, por duplicado. A los 50 µl de extracto se les agregó 0,625 ml de solución etanólica (50%) y 0,125 ml de solución etanólica de DPPH 0,8 mM (en cada paso se agitó con vórtex). Inmediatamente, se midió la cinética del proceso en un espectrofotómetro a 517 nm en cubeta de 1 ml durante 10 minutos y luego, se elaboró una curva de absorbancia a lo largo del tiempo. Se estimó un índice, conocido como Eficiencia Anti-radical (EA) descrito por Sanchez-Moreno *et al.* (1998), con algunas modificaciones. Este índice está formado por dos parámetros: la EC₄₀ que es la concentración de antioxidantes necesaria para inhibir en un 40% la cantidad inicial del radical y el tEC₄₀ que es el tiempo que necesita dicha concentración de antioxidantes para inhibir el 40% del radical. Se eligió dicho porcentaje, ya que algunos extractos no lograban inhibir el 50% del radical en un amplio rango de tiempo por lo que se dificultaba el cálculo del índice EC₅₀. Con estos dos parámetros, se construye el siguiente índice:

$$EA = 1/(EC_{40} \times tEC_{40})$$

Es decir, que cuanto mayor sea la EA, mayor es el poder antioxidante, ya que se requerirá menor concentración del antioxidante y menor tiempo para lograr la inhibición del 40%. Los valores se expresaron en (mg/ml)⁻¹ s⁻¹.

3.2.5. Determinación de fenoles totales

Para determinar el contenido de fenoles totales en los extractos se utilizó el método de Folin-Ciocalteu. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de coloración amarilla. Estos compuestos se reducen cuando reaccionan con compuestos fenólicos y generan una mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno de coloración azul intenso, con un pico de absorción a 765 nm. La absorbancia de la muestra es proporcional al contenido de polifenoles. Se utiliza como patrón una solución de ácido gálico de 0,1 mg/ml para realizar la curva de calibración.

Las determinaciones se realizaron por triplicado de acuerdo al método de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. A 50 µl de extracto se le agregaron 250 µl de agua Milli-Q y 125 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N. Luego de 5 minutos, se incorporaron 625 µl de una solución 20% de Na₂CO₃. Los tubos se mantuvieron 30 minutos a TA y se leyó la

absorbancia a 760 nm. La cuantificación de los fenoles totales presentes en las muestras se llevó a cabo por interpolación directa en la curva de calibración y se expresó como μg equivalentes de ácido gálico por mg peso seco (μg EAG/mg PS).

3.2.6. Determinación de flavonoides totales

La cuantificación del contenido de flavonoides totales se realizó según el método colorimétrico diseñado por Shohael *et al.* (2006), con algunas modificaciones. Esta determinación se basa en que el tricloruro de aluminio forma complejos estables de ácidos con el grupo cetona en C-4 o bien con el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles; y además puede formar enlaces con los grupos dihidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides (Ricco *et al.* 2015). Se utilizó como patrón una solución de quercetina de 1 mg/ml para realizar la curva de calibración. Para la determinación se utilizaron 50 μl de extracto, que fueron mezclados con 30 μl de NaNO_2 al 5% (p/v). Luego de 6 minutos de incubación se agregó 60 μl de AlCl_3 20 % (p/v). Seguido a esto, se agitaron en vórtex y se incubaron 5 minutos a TA. Por último, se agregó 200 μl de NaOH 1N y se ajustó con agua Milli-Q hasta un volumen final de 1000 μl . La lectura espectrofotométrica fue realizada a 510 nm de longitud de onda y se utilizó una curva patrón de quercetina para los cálculos. Los resultados fueron expresados como μg equivalentes de quercetina/mg de peso seco (μg EQ/mg PS).

3.2.7. Análisis de citotoxicidad

3.2.7.1. Línea celular

Para testear la citotoxicidad de diferentes concentraciones de los extractos vegetales obtenidos se emplearon dos líneas celulares comerciales: VERO y MCF-7. La línea VERO corresponde a células epiteliales renales extraídas de un mono verde africano (*Chlorocebus sp.* antes llamado *Cercopithecus aethiops*) y la línea MCF-7, deriva de un adenocarcinoma de mama humano.

3.2.7.2. Mantenimiento

Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM 10 g + NaHCO_3 3,75 g + HEPES 4,76 g + H_2O Milli-Q csp 1 l) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 IU/ml de penicilina G sódica y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sulfato de gentamicina. Las células fueron mantenidas en estufa a una atmósfera de 5% de CO_2 a 37°C. Los subcultivos fueron obtenidos por tratamiento suave con tripsina al 0,25%, y se sembraron 10^5 células/ml para tratarlas 48 h después.

3.2.7.3. Bioensayos para la evaluación de citotoxicidad

La potencial citotoxicidad de los extractos antioxidantes fue determinada por colorimetría por

tinción con cristal violeta de células vivas según Soria *et al.* (2008). Se eligió la tinción con cristal violeta ya que es un ensayo rápido para evaluar la viabilidad celular bajo diversas condiciones de estimulación y por no presentar interferencia con otros reactivos.

Para los bioensayos se sembraron 6000 células por pozo en placas multipozo que fueron cultivadas en estufa durante 24 h. Luego, se les removió el medio, se agregó medio fresco (control) o medio fresco con extracto (tratamiento con extractos vegetales) y fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ durante 2 h.

Se realizaron curvas de citotoxicidad de los extractos a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg EAA/mg PS) y se determinó la concentración óptima en la que el extracto no disminuye más del 20% de la viabilidad celular.

Después de los tratamientos, las células fueron coloreadas con una solución de cristal violeta al 0,5% en metanol al 50% durante 15 minutos. Para eliminar el excedente del colorante, cada placa fue lavada tres veces con metanol al 50% y secada. Luego, se agregaron 50 µl de una solución de citrato de sodio 0,1 M (pH: 5,4 en metanol al 20%). Dado que las células viables coloreadas se mantienen adheridas a la placa, la viabilidad celular se definió como porcentaje de densidad óptica respecto al control (100%) en cada pozo medida a 630 nm en un lector de placas Elisa Rayto RT-2100C (Rayto Life y Analytical Sciences Co., Ltd. China). La adhesión celular a la placa luego del ensayo y previa al análisis espectrofotométrico, fue controlada de forma visual en un microscopio invertido biológico ZOU-T trinocular (Marca: Arcano).

3.2.8. Análisis estadístico

Se utilizó el programa InfoStat versión 2020 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar y para detectar diferencias entre medias se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) y posterior test de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05. En cada caso se evaluó el cumplimiento de los supuestos mediante el mismo programa. Las curvas de calibración para actividad antioxidante, fenoles y flavonoides totales fueron calculadas por análisis de regresión lineal.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Especies con uso medicinal

3.3.1.1. Poder antioxidante con técnica de FRAP

Los resultados de la actividad antioxidante de los extractos vegetales analizados se muestran de forma gráfica en la Figura 17. Dentro de la variedad de especies con usos medicinales

evaluadas, los extractos elaborados a partir de hojas y tallos de *L. cuneifolia* presentaron el mayor poder antioxidante medido con la técnica de FRAP. El extracto elaborado en agua a TA (LCA), presentó un valor de $149,71 \pm 5,23$ μg EAA/mg PS, y se destaca por ser mayor (pero no significativo) al extracto obtenido con agua a 100°C (LCC) que presentó un valor de $131,93 \pm 5,23$ μg EAA/mg PS (Figura 17). Estos resultados concuerdan con el alto poder antioxidante hallado a partir de infusiones y extractos etanólicos de hojas de *L. cuneifolia* en otros estudios recientes (Carabajal *et al.* 2017; Lorenzo *et al.* 2019).

Por otra parte, los valores de FRAP determinados en el extracto obtenido a partir de hojas y tallos de *L. nitida* con agua a 100°C (LNC) y en los dos extractos elaborados a partir de *M. aphylla* (MAA y MAC), resultaron significativamente menores a los de ambos extractos de *L. cuneifolia* (Figura 17). Además, el extracto obtenido con agua a TA de *L. nitida* (LNA) presentó un valor de poder antioxidante significativamente menor ($78,76 \pm 5,23$ μg EAA/mg PS) al del obtenido con agua a 100°C ($95,68 \pm 5,23$ μg EAA/mg PS) (Figura 17). Mientras que los valores de FRAP de los extractos de *M. aphylla* (MAA y MAC) no presentaron diferencias significativas entre sí.

En un estudio reciente (Moreno *et al.* 2020), se comparó la actividad antioxidante mediante la técnica ABTS en extractos etanólicos de hojas de especies y mezclas de especies con usos medicinales y, entre ellas, *L. cuneifolia* y *L. nitida*. A diferencia de nuestros resultados, los autores encontraron una mayor actividad antioxidante en *L. nitida* con respecto a *L. cuneifolia* que resultó estadísticamente significativa, lo cual podría deberse a la diferencia en el solvente utilizado para la extracción. En dicho trabajo, la mezcla de *L. cuneifolia* con otras especies no mostró diferencias significativas en cuanto a capacidad antioxidante con respecto al extracto individual; sin embargo, la mezcla mostró actividad antioxidante *in vitro* y actividad antiinflamatoria. Por su parte, Carabajal *et al.* (2017), tampoco encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante en los extractos individuales de *L. cuneifolia* con respecto a la mezcla de estos con otras especies; y a su vez encontraron que la mezcla tuvo actividad antimutagénica mientras que el extracto individual no. A diferencia de lo informado en dichos trabajos, el extracto que se obtuvo a partir de la mezcla de *G. chiloensis* y *L. cuneifolia* (GCC+LCC) (cada especie aporta el 50% del material extraído) mostró el mayor valor de poder antioxidante medido con la técnica de FRAP, con un valor que es 2,4 veces mayor que la suma de los valores de los extractos por separado. Por su parte, la actividad antioxidante de la mezcla GCC+MAC no mostró diferencias significativas con las de los extractos por separado (Figura 17).

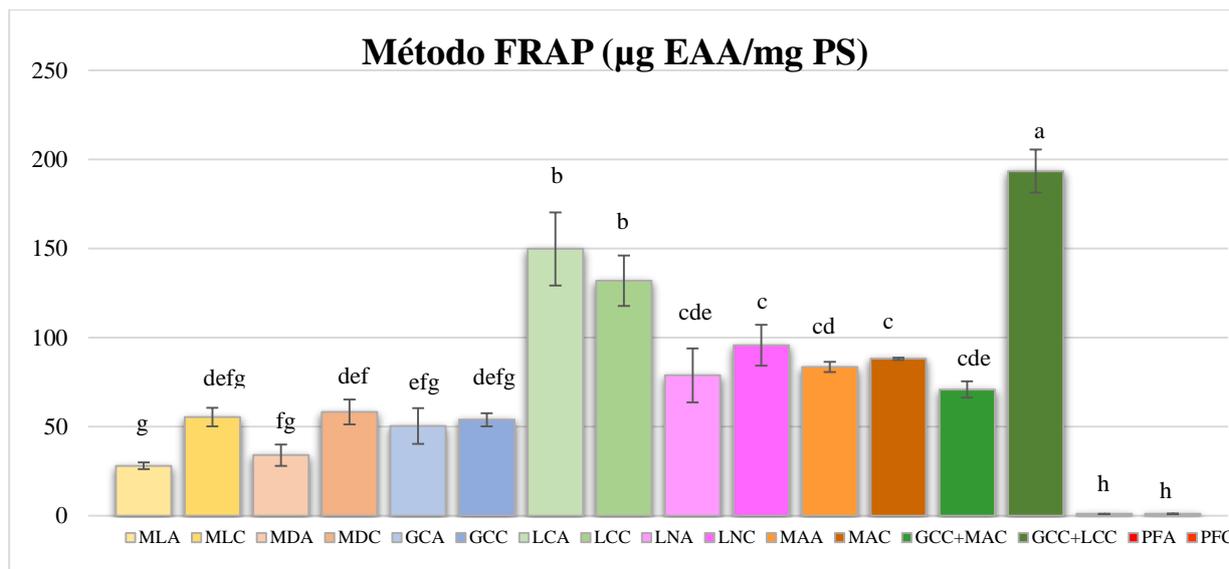


Figura 17: Poder antioxidante de especies vegetales con uso medicinal evaluado con la técnica de FRAP. Especies: *M. laxa* (ML), *P. dictyocarpa* (MD), *G. chiloensis* (GC), *L. cuneifolia* (LC), *L. nitida* (LN), *M. aphylla* (MA), piñones frescos de *A. araucana* (PF). Extractos obtenidos con agua a temperatura ambiente (terminación de sigla en A) y a 100°C (terminación de sigla en C). Los valores representan la media \pm DE de tres determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en $\mu\text{g EAA/mg PS}$: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Los extractos de las demás especies estudiadas como *M. laxa*, *P. dictyocarpa* y *G. chiloensis* presentaron valores de poder antioxidante significativamente menores y los valores más bajos fueron observados en los extractos obtenidos a TA de las primeras dos especies (MLA y MDA). Sin embargo, al consultar bibliografía sobre dichas especies, se encontró que la infusión de hojas de *P. dictyocarpa* mostró un valor de 12,27 $\mu\text{g EAA/mg PS}$ mediante la técnica de FRAP (Borneo *et al.* 2009), unas 5 veces menor que el valor obtenido en este estudio (58,19 $\mu\text{g EAA/mg PS}$). En cuanto a *G. chiloensis*, un trabajo reciente analizó la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos de infusiones de dicha especie (Gastaldi 2018). En éste, si bien no se analiza la actividad antioxidante mediante la técnica de FRAP, se identificaron mediante HPLC compuestos con alta actividad antioxidante como ácido clorogénico, cafeico y un flavonoide oligósido, que probablemente sean los responsables de la actividad antioxidante hallada en este trabajo de tesis. Por otra parte, el resultado obtenido en esta tesis sería el primer registro de medición de actividad antioxidante en la especie *M. laxa*. Como puede observarse en la Figura 17, los valores son similares a los hallados para las partes vegetales de las otras especies utilizadas también como antiinflamatorias en la medicina popular. Por otro lado, se analizó el poder antioxidante de todos los tejidos de los piñones. En esta sección se incluyen los resultados de la parte comestible (pulpa; PFA y PFC), por ser la utilizada con fines medicinales (Figura 17). Si bien este tejido no mostró un alto poder antioxidante, comparado con las otras plantas

medicinales estudiadas, su estudio es relevante a fin de conocer el aporte de antioxidantes de un alimento de uso frecuente en la dieta de la población regional y que además es usado como ingrediente principal de numerosas preparaciones. Por tratarse de un árbol icónico de la Patagonia, con numerosos usos desde tiempos ancestrales, las propiedades antioxidantes, nutricionales y posibles aplicaciones de todos los componentes de las semillas, tanto comestibles como cáscaras, serán detallados en secciones y capítulos específicos.

3.3.1.2. Poder antioxidante con técnica de DPPH

El índice de eficiencia anti-radical (EA) refleja la concentración del extracto y el tiempo necesarios para inhibir en un 40% la absorbancia del radical DPPH. En la mayoría de las especies, salvo para *L. nitida*, los extractos elaborados con agua caliente presentaron mayor EA, es decir, mayor poder antioxidante que el obtenido a TA de la misma especie (Figura 18). Los extractos con mayor poder antioxidante con la técnica del DPPH fueron: *L. nitida* en agua a TA y *L. cuneifolia* en agua a TA y caliente (0,417), los cuales también presentaron también alto poder antioxidante con la técnica de FRAP. Este valor de EA resulta alto comparado con frutos rojos tales como frutilla, frambuesa, mora y arándanos que muestran valores de 0,097, 0,06, 0,09 y 0,062, respectivamente (Gramza *et al.* 2019). En el caso de la mezcla GCC+LCC que mostró el valor más alto con la técnica de FRAP, con el método del radical DPPH no sucedió lo mismo ya que la EA mostró un valor muy bajo ($0,1 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Figura 18). En el caso del valor obtenido con FRAP, se puede notar que hay una acción aditiva de los compuestos antioxidantes polares de la mezcla; mientras que cuando se midió la actividad antioxidante en un medio menos polar (etanol) por la técnica de DPPH, la actividad antioxidante de la mezcla disminuye, no evidenciándose acción aditiva. Otros extractos como MAA, MAC y LNC también mostraron menor poder antioxidante que con la técnica de FRAP (Figura 18). Por su parte, los extractos de *P. dictyocarpa*, que presentaron valores medios de actividad antioxidante con la técnica de FRAP (respecto al mayor y menor valor observado en las muestras analizadas), mostraron un índice alto de EA lo que indica mayor concentración de antioxidantes de baja polaridad. Esta técnica indica un bajo poder antioxidante de la pulpa del piñón, puesto que produce un 20% de disminución de la absorbancia del radical DPPH. Sin embargo, luego se analizarán otras partes de la semilla con mayor capacidad antioxidante.

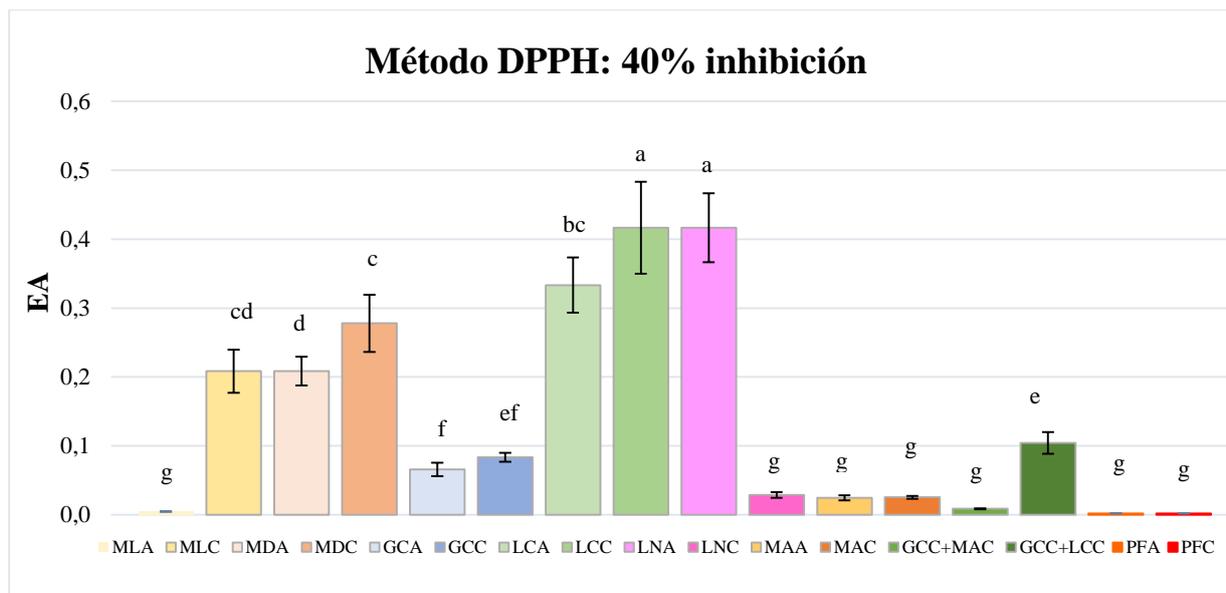


Figura 18: Eficiencia anti-radical de extractos de especies con uso medicinal obtenidos con agua a temperatura ambiente (A) y a 100°C (C). Especies: *M. laxa* (ML), *P. dictyocarpa* (MD), *G. chilensis* (GC), *L. cuneifolia* (LC), *L. nitida* (LN), *M. aphylla* (MA), piñones frescos de *A. araucana* (PF). Extractos obtenidos con agua a temperatura ambiente (terminación de la sigla en A) y a 100°C (terminación de la sigla en C). Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $n=3$, $p<0,05$). Valores expresados como $(\text{mg/ml})^{-1} \text{s}^{-1}$.

3.3.1.3. Contenido de fenoles y flavonoides

Se analizó el contenido de fenoles en aquellos extractos en los que ambos análisis de actividad antioxidante (FRAP y DPPH), arrojaron valores de actividad media a alta (mayor a 55 μg EAA mediante FRAP y una EA mayor a 0,2 $(\text{mg/ml})^{-1} \text{s}^{-1}$ mediante DPPH). Los extractos seleccionados según este criterio fueron LCA, LCC, LNC, LNA, MDC y MLC, y los resultados se muestran en la Figura 19. Los extractos de *L. cuneifolia* y *L. nitida* fueron los que presentaron mayor contenido de polifenoles y flavonoides. En este sentido, el análisis de la proporción flavonoides/fenoles de cada uno de los extractos de estas especies, muestra el mayor valor para el extracto LCC (1,93) (Figura 19), lo cual se puede relacionar también con el alto poder antioxidante hallado en ese extracto por los métodos utilizados. Así, la relación flavonoides/fenoles del extracto da cuenta de la importancia de los flavonoides en el contenido fenólico total y en su actividad antioxidante (Dias *et al.* 2021). El contenido de fenoles totales de las infusiones de *L. cuneifolia* y *L. nitida* concuerda con los valores mostrados en otro trabajo donde también se utilizó el agua a 100°C como solvente de extracción (Carabajal *et al.* 2017). Los autores encontraron además que el extracto de *L. cuneifolia* presentó un contenido significativamente mayor de fenoles que el de *L. nitida*. Los resultados presentados en la Figura 19 muestran diferencias entre *L. cuneifolia* y *L. nitida* pero no son estadísticamente significativas. Por otra parte, los valores de flavonoides reportados por Carabajal *et al.* (2017)

para especímenes colectados en la provincia de Tucumán a 2000 m.s.n.m., son 50 veces más bajos que los encontrados en este estudio. Esta diferencia podría ser atribuible a la menor proporción de material vegetal/solvente utilizada por dichos autores (2 g en 200 ml de agua) y/o a las condiciones edáficas, altitudinales y estacionales en las que fueron recolectados los especímenes y que pueden impactar en la concentración de flavonoides. Estudios recientes sobre extractos etanólicos de estas dos especies (Moreno *et al.* 2018, 2020; Lorenzo *et al.* 2019) mostraron valores superiores (2-4 veces más) en el contenido de fenoles y levemente superiores (1-2 veces más) en el contenido de flavonoides; sin embargo, la utilización de solventes orgánicos presenta muchas desventajas para la salud humana y el medioambiente. En este sentido, es importante destacar que la obtención de metabolitos de interés mediante solventes no tóxicos es una prioridad para alcanzar procesos de extracción sustentables (Pena-Pereira *et al.* 2015) y es el objetivo de esta tesis.

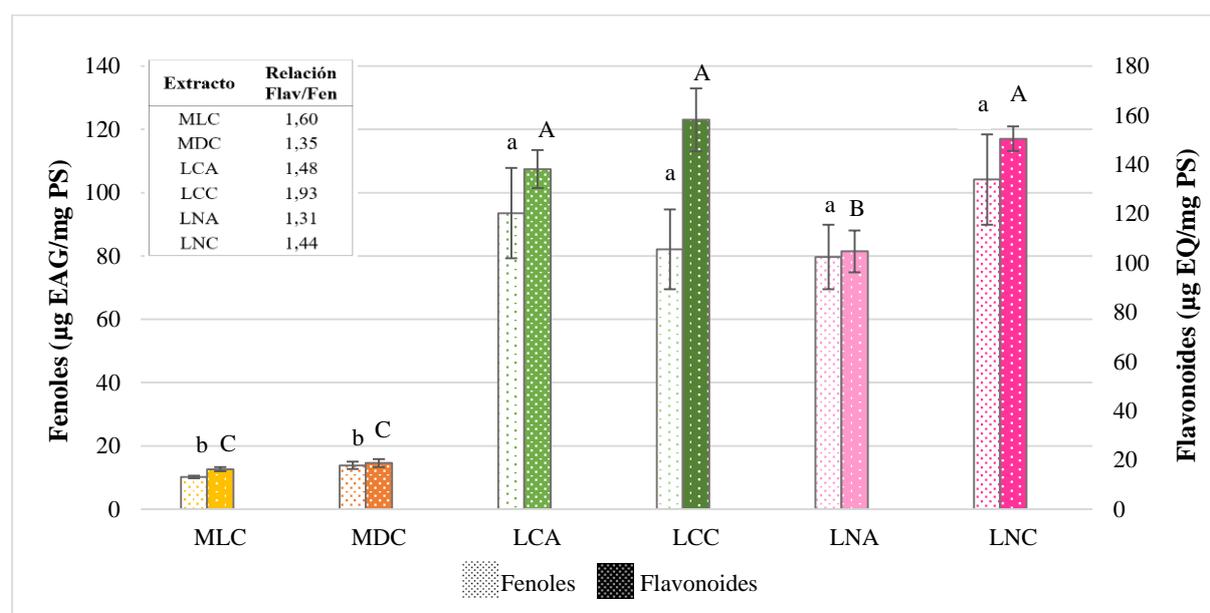


Figura 19: Contenido de fenoles y flavonoides de las especies con uso medicinal que mostraron mayor poder antioxidante. Especies: *M. laxa* (ML), *P. dictyocarpa* (MD), *L. cuneifolia* (LC), *L. nitida* (LN). Extractos obtenidos con agua a temperatura ambiente (terminación de la sigla en A) y a 100°C (terminación de la sigla en C). Letras distintas indican diferencias significativas entre especies (mayúsculas para fenoles y minúsculas para flavonoides) (Tukey, $n=3$, $p<0,05$). EAG: equivalentes de ácido gálico, EQ: equivalentes de quercetina, PS: peso seco. Valores en inserto representan Flav/Fen:: relación flavonoides/fenoles.

3.3.1.4. Toxicidad de extractos de plantas con uso medicinal

Debido a la compleja composición química de las plantas, y a que muchas veces son consumidas como infusiones en concordancia con tradiciones populares (etnomedicina), la falta

de estudios de los posibles efectos secundarios de los productos fitoterapéuticos puede suponer un riesgo importante para la salud y el bienestar. Como ejemplo puede citarse al ácido aristolóquico, que se encuentra en todas las plantas del género *Aristolochia* y otras plantas medicinales argentinas (Barboza *et al.* 2009) y numerosas investigaciones demostraron que es un potente cancerígeno y nefrotóxico (Li *et al.* 2021; Britza *et al.* 2022). Para conocer si los extractos elaborados a partir de plantas con uso medicinal mostraban toxicidad aguda, se realizaron pruebas *in vitro* con la línea celular VERO no tumoral y la línea tumoral MCF-7, ambas de mamífero. Para esto, cultivos de células VERO con aproximadamente un 80% de confluencia, se expusieron a distintas concentraciones de los extractos. Las concentraciones fueron seleccionadas de acuerdo con su capacidad antioxidante determinada por el método FRAP. De esta forma, se pudo comparar la toxicidad/inocuidad de extractos con capacidades antioxidantes similares. Para determinar si alguno de estos extractos presentaba actividad antitumoral, sin afectar células no tumorales, fue probada en células MCF-7 la concentración en la que ninguno de los extractos mostró toxicidad en las células VERO (50 µg EAA/mg PS). En las Figuras 20 y 21 se puede observar que los extractos obtenidos de la mayor parte de las especies estudiadas no disminuyen más del 20% la viabilidad celular con respecto al control. Los únicos extractos que mostraron toxicidad significativa fueron los de *G. chilensis*, tanto aquellos obtenidos con agua a TA como a 100°C (GCA y GCC, respectivamente). Los resultados mostraron una disminución del 50% y 70%, respectivamente, de la densidad de células VERO adheridas (viables) con respecto al control sin extracto. En el caso del ensayo con células tumorales, la toxicidad de estos extractos fue mayor, se alcanzó un valor superior al 80% de disminución de la viabilidad celular a la misma concentración que la empleada en el ensayo con células VERO. Por su parte, las mezclas GCC+MAC y GCC+LCC también generaron disminución en la viabilidad celular en células VERO, aunque no tan marcada (Figura 20). En estos casos, la toxicidad fue menor a la esperada a las concentraciones utilizadas y este resultado podría estar relacionado con un efecto protector de los extractos de *M. aphylla* o *L. cuneifolia*, aunque no sería suficiente para prevenir la muerte de las células VERO a las concentraciones ensayadas. A diferencia de lo que ocurrió en las células VERO, en las células MCF-7, la toxicidad de *G. chilensis* resultó totalmente inhibida por las otras especies de la mezcla, ya que no se encontraron diferencias significativas con el control; por ende, el efecto protector de los extractos de *M. aphylla* o *L. cuneifolia* sería más efectivo en estas células tumorales. La toxicidad de la infusión de esta especie fue informada por primera vez por Gastaldi (2018), quién encontró actividad citotóxica en células tumorales y no tumorales, a partir de una concentración 1,25 mg/ml de extracto; mientras que en este trabajo se encontró

alta toxicidad a partir de una concentración de 0,37 mg/ml. Hasta el momento no existe ningún estudio que informe cuál es el compuesto o la mezcla de compuestos que generan la toxicidad de *G. chilensis* sobre las células, ya que esta especie se ha investigado mayormente por su alto contenido en diterpenos y otros constituyentes de la resina de sus hojas (Zavala y Ravetta 2001) y no se encuentran otros estudios que indaguen en las causas de su citotoxicidad. *A priori*, estos resultados en su conjunto sugieren que los extractos de *G. chilensis* no serían buenos candidatos para la búsqueda de agentes antitumorales; principalmente por su alta toxicidad en células no tumorales.

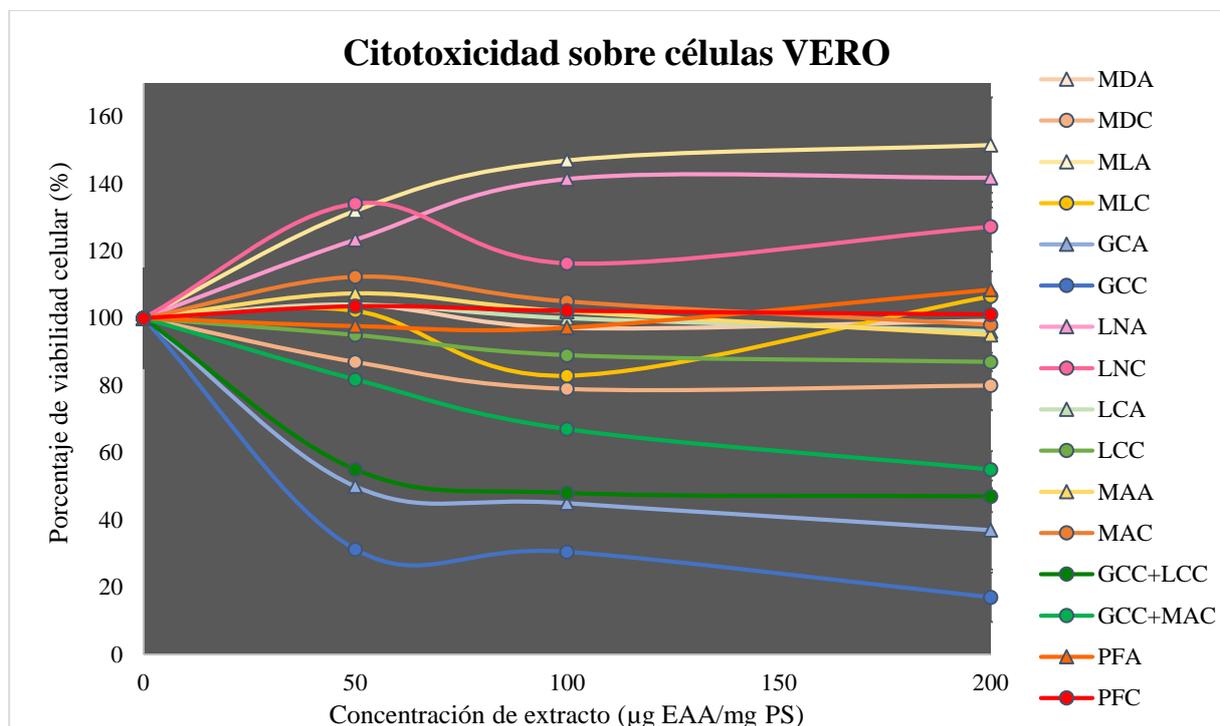


Figura 20: Porcentaje de viabilidad de células VERO a distintas concentraciones de extractos de especies con uso medicinal. Especies: *M. laxa* (ML), *P. dictyocarpa* (MD), *G. chilensis* (GC), *L. cuneifolia* (LC), *L. nitida* (LN), *M. aphylla* (MA), piñones frescos de *A. araucana* (PF). Extractos obtenidos con agua a temperatura ambiente (terminación de sigla en A) y a 100°C (terminación de sigla en C).

En cuanto a las especies estudiadas del género *Larrea*, cuyas infusiones son utilizadas por sus propiedades antiinflamatorias, antirreumáticas, balsámicas, entre otras, se ha informado que *L. cuneifolia* y *L. divaricata* muestran baja toxicidad y efecto protector frente a EROs en líneas celulares no tumorales y toxicidad en una línea celular cancerígena (Boris *et al.* 2015, Lorenzo *et al.* 2020; Bongiovanni *et al.* 2008). En este trabajo, los extractos de *L. cuneifolia* (recolectada en Neuquén) no mostraron toxicidad en ningún tipo celular a las concentraciones estudiadas (Figura 20 y 21). Por su parte, *L. nitida* es una especie que no ha sido muy estudiada. Un estudio reciente ha reportado una fuerte actividad antifúngica (Moreno *et al.* 2020). Este trabajo

constituiría el primer registro de la evaluación de toxicidad de dicha especie en células de mamíferos. En la Figura 20, se muestra que ambos extractos de *L. nitida*, principalmente el obtenido con agua a TA, aumentan significativamente la viabilidad celular de células VERO a partir de los 50 μg EAA/mg PS y este efecto se mantuvo a medida que aumentó la concentración. En células MCF-7 no se encontraron diferencias significativas con respecto al control en la concentración utilizada (Figura 21).

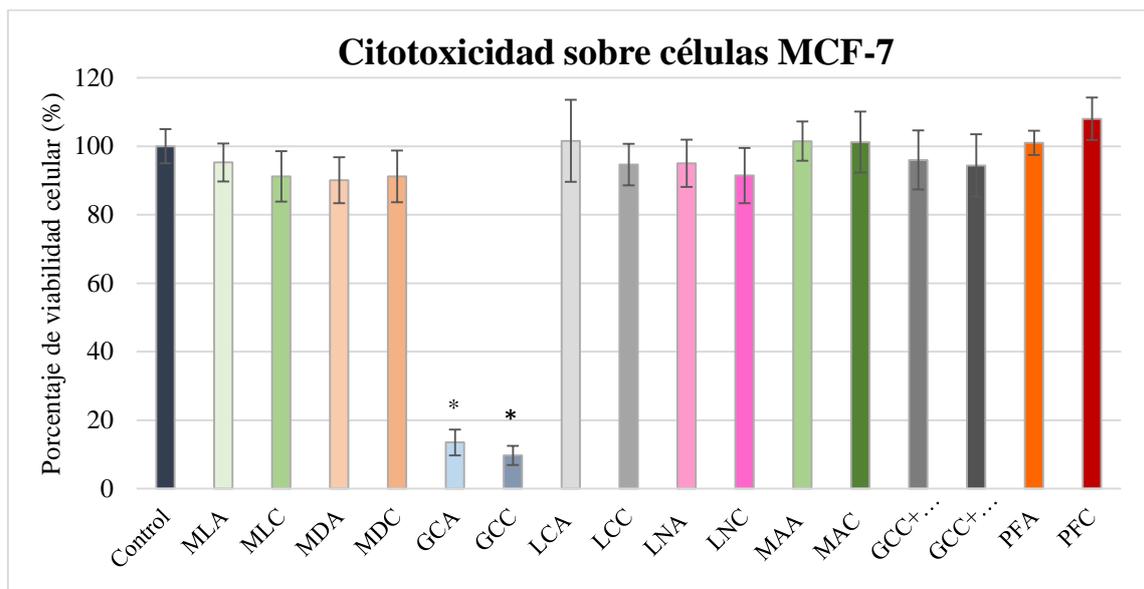


Figura 21: Porcentaje de viabilidad de células MCF-7 a 50 μg EAA/mg PS de extractos de especies con uso medicinal. Especies: *M. laxa* (ML), *P. dictyocarpa* (MD), *G. chilensis* (GC), *L. cuneifolia* (LC), *L. nitida* (LN), *M. aphylla* (MA), piñones frescos de *A. araucana* (PF). Extractos obtenidos con agua a temperatura ambiente (terminación en A) y a 100°C (terminación en C). Los valores representan el promedio \pm DE de tres experimentos realizados por duplicado. Asteriscos indican diferencias significativas con el control (Tukey, $p < 0,05$).

Al igual que con *L. nitida*, los resultados en células VERO (Figura 20) muestran que el extracto de *M. laxa* obtenido con agua a TA induciría proliferación celular, dado que aumenta significativamente la cantidad de células adheridas a partir de 50 μg EAA/mg PS y este efecto se mantiene a concentraciones mayores. Por otro parte, el extracto obtenido a 100°C de esta especie no muestra diferencias significativas con respecto al control. La especie *M. laxa* tampoco ha sido estudiada en cuanto a su actividad antioxidante y su citotoxicidad. Se ha descrito que extractos elaborados a partir de una especie del mismo género *M. velame* no mostraron efectos tóxicos *in vitro* e *in vivo* (Ribeiro *et al.* 2019). Estos resultados impulsan a profundizar las investigaciones relacionadas con las posibles aplicaciones de los principios activos presentes en los extractos acuosos de *L. nitida* y *M. laxa* en el campo de las patologías que inducen necrosis o neurodegeneración (Uddin *et al.* 2020).

En el caso de *P. dictyocarpa*, no se encontró citotoxicidad ni efecto proliferativo, tanto en células VERO como en las células tumorales MCF-7. No hay estudios *in vitro* sobre su actividad antioxidante o citotóxica, sin embargo, se ha estudiado su actividad antioxidante con efecto neuroprotector frente al As en ratas Wistar y se encontró que no tenía efecto tóxico y además, mostró actividad quimiopreventiva frente al daño por este metaloide (Cortez *et al.* 2012).

3.3.2. Productos y residuos derivados de la industria del piñón

3.3.2.1. Poder antioxidante con técnica de FRAP

El poder antioxidante medido con la técnica de FRAP en extractos a partir de tejidos de piñones frescos o con diferentes tratamientos como, hervidos a 100°C, hervidos a 120°C y tostados se muestran en las Tablas 6, 7, 8 y 9, respectivamente. Uno de los primeros descubrimientos fue que la cáscara total de piñones frescos mostró ser un tejido con alto poder antioxidante y que el extracto obtenido con agua a 100°C (residuo no comestible) presentó valores significativamente mayores a aquellos obtenidos con agua a TA (Tabla 6). Por este motivo, los extractos de cáscara elaborados con agua a 100°C fueron estudiados más exhaustivamente.

Tabla 6: Poder antioxidante evaluado con la técnica FRAP de extractos de piñones frescos elaborados con agua a TA y a 100°C

Extractos de piñones frescos	Referencia	Actividad antioxidante (µg EAA/mg peso seco)
Pulpa	PFA	1,01 ± 0,062 (d)
	PFC	1,41 ± 0,090 (d)
Embrión	EMFA	1,36 ± 0,038 (d)
	EMFC	1,60 ± 0,188 (d)
Endosperma	ENFA	0,93 ± 0,138 (d)
	ENFC	0,86 ± 0,096 (d)
Cáscara total	CTFA	36,80 ± 2,800 (b)
	CTFC	83,00 ± 7,800 (b)
Cáscara fina	CFFC	403,60 ± 32,000 (a)
Cáscara gruesa	CGFC	40,90 ± 4,100 (b)
Piñones defectuosos	PDC	27,93 ± 2,100 (c)
Piñones vacíos	PVC	1,66 ± 0,320 (d)

Los valores representan el promedio ± DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en µg EAA/mg PS: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05).

Tabla 7: Poder antioxidante evaluado con la técnica FRAP de extractos de piñones hervidos elaborados con agua a TA y a 100°C

Extractos de piñones hervidos 100°C	Referencia	Actividad antioxidante (µg EAA/mg peso seco o ml)
Pulpa	P100	0,58 ± 0,01 (e)
Embrión	EM100A	1,42 ± 0,04 (de)
	EM100C	1,52 ± 0,14 (de)
Endosperma	EN100A	0,72 ± 0,03 (de)
	EN100C	0,65 ± 0,03 (de)
Cáscara total	CT100C	64,00 ± 5,90 (c)
Cáscara fina	CF100C	284,42 ± 21,00 (a)
Cáscara gruesa	CG100C	25,58 ± 2,60 (cd)
Piñones defectuosos	PD100C	17,54 ± 4,78 (cde)
Agua piñones sanos	A100	122,00 ± 32,80 (b)
Agua piñones defectuosos	AD100	127,20 ± 1,62 (b)

Los valores representan el promedio ± DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en µg EAA/mg PS: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05).

Tabla 8: Poder antioxidante evaluado con la técnica FRAP de extractos de piñones hervidos a 120°C elaborados con agua a 100°C

Extractos de piñones hervidos 120°C	Referencia	Actividad antioxidante (µg EAA/mg peso seco o ml)
Pulpa	P120	0,82 ± 0,20 (c)
Cáscara total	CT120	15,40 ± 0,40 (b)
Agua piñones sanos	A120	218,40 ± 15,00 (a)

Los valores representan el promedio ± DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en µg EAA/mg PS: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05).

Tabla 9: Poder antioxidante evaluado con la técnica FRAP de extractos de piñones tostados elaborados con agua a TA y a 100°C

Extractos piñones tostados		Actividad antioxidante (µg EAA/mg peso seco)
Cáscara total	CTTC	69,70 ± 5,90 (b)
Cáscara fina	CFTC	322,20 ± 29,00 (a)
Cáscara gruesa	CGTC	36,30 ± 2,10 (c)
Harina	HC	2,43 ± 0,10 (e)
	HA	2,11 ± 0,03 (e)
Café	CC	3,78 ± 0,86 (d)

Los valores representan el promedio ± DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en µg EAA/mg PS: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05).

Tabla 10: Poder antioxidante evaluado con la técnica FRAP de extractos de piñones en almíbar elaborados con agua a TA y a 100°C

Extractos piñones en almíbar	Actividad antioxidante (EAA/mg peso fresco)
Piñones claros (agua TA)	0,460 ± 0,08 (a)
Piñones claros (agua 100°C)	0,366 ± 0,06 (a)
Piñones oscuros (agua TA)	0,358 ± 0,09 (a)
Piñones oscuros (agua 100°C)	0,390 ± 0,03 (a)

Los valores representan el promedio ± DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en µg EAA/mg PS: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco. TA: temperatura ambiente. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05).

Con respecto a los extractos de cáscaras obtenidos con agua a 100°C, se pudo observar que en todos los tratamientos la cáscara fina presentó mayor poder antioxidante por mg de tejido que la cáscara gruesa, con el valor más alto obtenido a partir de piñones frescos (403,6 ± 32,0 EAA/mg peso seco; Figura 22). Las tres cocciones de los piñones (tostados, hervidos a 100°C y a 120°C) disminuyeron el poder antioxidante de la cáscara fina y la gruesa alrededor de un 25%. En el caso de los piñones hervidos tanto a 100°C como a 120°C, la disminución del poder antioxidante de las cáscaras estuvo acompañada por la aparición del poder antioxidante del agua del hervor de los mismos (A100=122,0 ± 32,8 y A120=218,4 ± 15,0 EAA/ml, respectivamente) (Figura 23, Tablas 7 y 8). Este resultado sugiere que ocurre una migración de antioxidantes desde la cáscara al agua (más relevante en el tratamiento a 120°C), lo cual genera una reducción del poder antioxidante de la cáscara hervida. En concordancia con nuestros hallazgos,

Cordenunsi *et al.* (2004) encontraron que el contenido de catequina de la cáscara de piñones de *A. angustifolia* disminuyó y a su vez aumentó el mismo en el agua del hervor, lo que confirma la migración de estos compuestos. Una posible explicación de este hecho podría ser que el calentamiento genera la ruptura de la pared celular de las células que conforman la cáscara y la liberación hacia el agua de los compuestos antioxidantes retenidos en las células. Esto es coherente con los resultados que muestran mayor extracción de antioxidantes con agua a 100°C que a TA (Tablas 6 y 7). Por otro lado, los resultados también muestran que los antioxidantes del piñón son resistentes al calentamiento (100°C o mayor temperatura), ya que los tostados son horneados a 150°C durante 24 y 72 h para obtener harina y café, respectivamente. Esto ampliaría su rango de aplicaciones, lo que justifica el detallado estudio que se realizó en esta tesis.

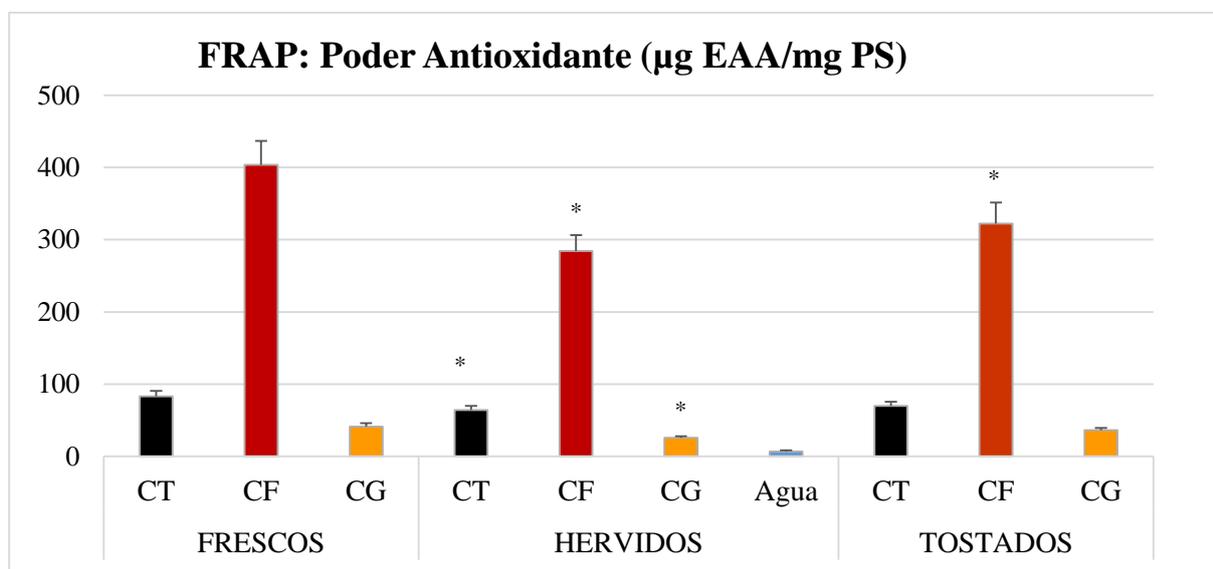


Figura 22: Poder antioxidante de extractos obtenidos con agua a 100°C a partir de cáscara total (CT), fina (CF) y gruesa (CG) de piñones frescos, hervidos y tostados; y del agua de hervor de los piñones hervidos. Los valores se expresan como media \pm DE de tres determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en $\mu\text{g EAA/mg PS}$: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco. Asteriscos indican diferencias significativas con el mismo tejido de piñones frescos (Tukey, $p < 0,05$).

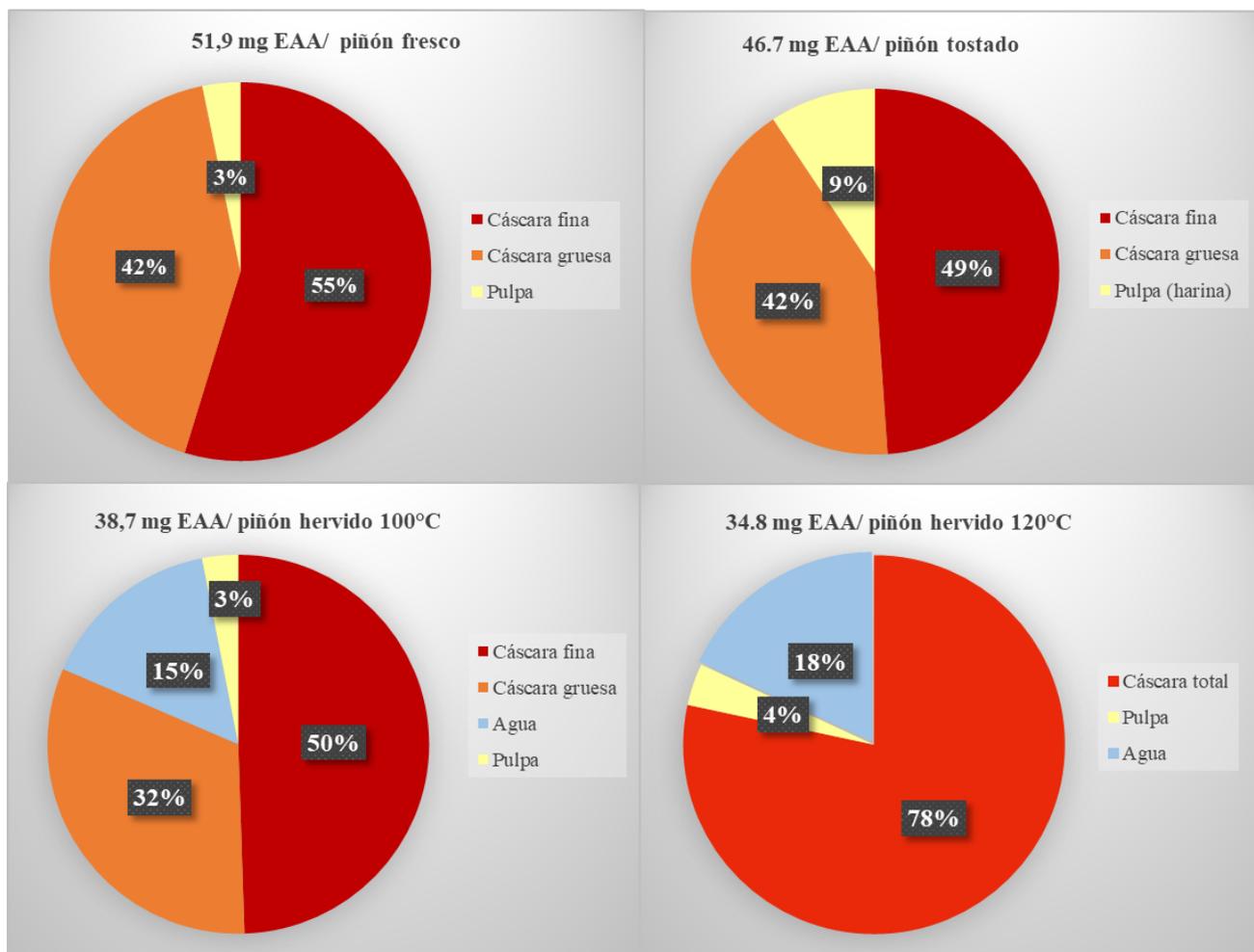


Figura 23: Porcentaje de poder antioxidante de cada tejido con respecto al poder antioxidante de un piñón fresco, tostado, hervido a 100°C y a 120°C completo. EAA/mg PS: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco de un piñón

Con respecto a la pulpa de los piñones, el mayor poder antioxidante fue hallado en los extractos de pulpa de piñones tostados, analizada como harina (HC y HA) y café (CC) (Figura 24). Sin embargo, se observó la presencia de residuos de cáscara fina en estas muestras, ya que ésta es difícil de remover después del horneado y podría aportar entonces antioxidantes. Al realizar el estudio comparativo de los demás extractos de pulpa se observó el mayor poder antioxidante en los extractos de pulpa de piñones frescos, obtenidos con agua a 100°C (PFC=1,41 ± 0,09 µg EAA/mg peso seco) (Figura 24); mientras que, el menor valor fue hallado en el extracto de la pulpa de piñones hervidos a 100°C, obtenido con agua a 100°C (P100), el cual presentó un valor de 0,58 ± 0,01 µg EAA/mg peso seco (Tabla 7, Figura 24). En este sentido, la pulpa de piñones hervidos no recibiría antioxidantes provenientes de la cáscara durante el hervor, a diferencia de lo que ha sido descrito en los piñones de la especie *A. angustifolia* de Brasil (Angélica Koehnlein *et al.* 2012). Por otro lado, el agua del hervor también podría tener la

capacidad de extraer parte de los antioxidantes presentes en la pulpa, como se describe anteriormente para la cáscara. Mientras que, a 120°C, aunque se pierda poder antioxidante ($0,82 \pm 0,20 \mu\text{g EAA/mg peso seco}$), la mayor ruptura de los tejidos de la cáscara generaría, por un lado mayor migración hacia el agua y por el otro, mayor migración hacia la pulpa que a 100°C (Tabla 7).

Cuando se analizó por separado a los componentes de la pulpa del piñón, se puede observar que no hay diferencias significativas entre los extractos de embrión de piñones frescos y hervidos, aunque sí las hay entre los extractos de endosperma (Figura 24). Ambos extractos de endosperma elaborados a partir de piñones frescos (en agua a TA: ENFA y en agua a 100°C: ENFC; Tabla 6) presentaron mayor poder antioxidante que aquellos obtenidos a partir de piñones hervidos (en agua a TA: EN100A y en agua a 100°C: EN100C; Tabla 7). Con este resultado, se puede decir que la disminución de la capacidad antioxidante de la pulpa luego del hervor ($1,41$ vs. $0,58 \mu\text{g EAA/mg PS}$; Figura 24), tendría una relación directa con la pérdida de la capacidad antioxidante del endosperma (sin afectar la del embrión) luego del hervor. Esto podría deberse en parte a que el endosperma es la porción más externa de la pulpa y sus antioxidantes podrían migrar más hacia el agua del hervor.

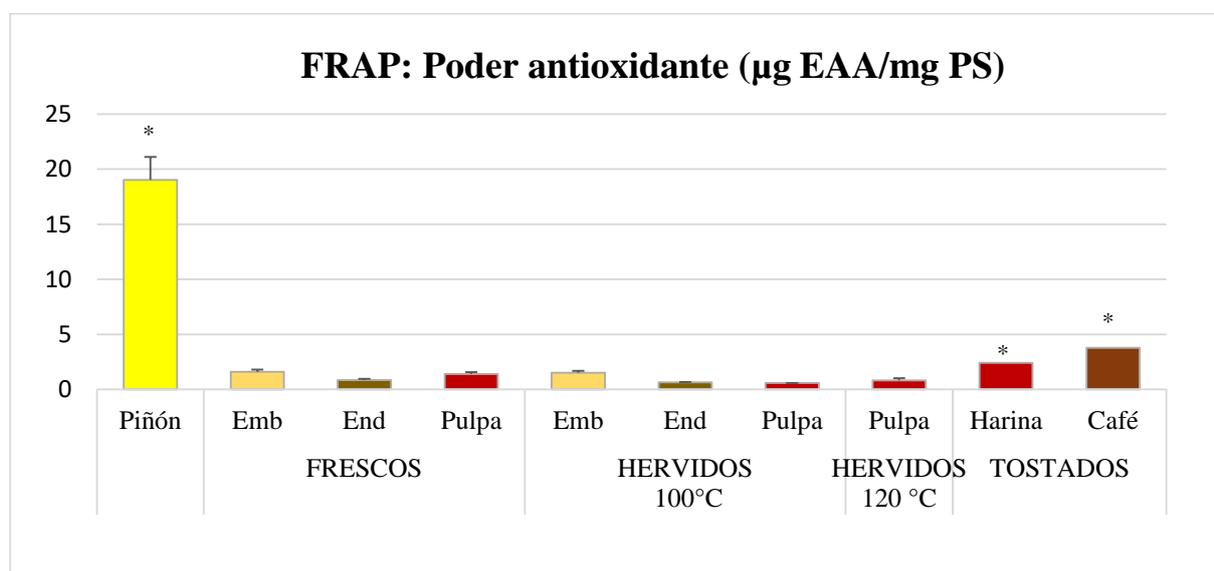


Figura 24: Poder antioxidante medido por FRAP de extractos obtenidos a partir de un piñón completo, de embrión (Emb), endosperma (End) y pulpa de piñones frescos y hervidos a 100°C, y de pulpa de piñones hervidos a 120°C y tostados (harina y café). Los valores se expresan como media \pm DE de tres determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en $\mu\text{g EAA/mg PS}$: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco. Asteriscos indican diferencias significativas con el mismo tejido de piñones frescos (Tukey, $p < 0,05$).

Durante la recolección a campo, se pudo observar que en ciertos años, como en el 2018, hubo una cantidad importante de piñones defectuosos y vacíos, así como un escaso número de

piñones “normales” o viables. En esta especie, la producción de semillas es irregular y varía de año a año, dado que está influenciada principalmente por las condiciones climáticas del fenómeno de la Niña (sequía), que favorecería la polinización durante la floración de los conos; y el fenómeno del Niño que perjudicaría este proceso por presentar una mayor cantidad de lluvias (Sanguinetti 2014).

Bajo este contexto, fue interesante evaluar el poder antioxidante de estas semillas no viables, que no son utilizadas por las industrias que elaboran productos con piñones, pero que son abundantes en los años de baja polinización. Los piñones defectuosos tienen menor longitud y peso que los viables, presentan un endosperma subdesarrollado y un embrión de pequeño tamaño, deshidratado y de color marrón (Figura 25). Por su parte, los piñones vacíos sólo contienen las cubiertas externas sin endosperma ni embrión desarrollado. Al comparar ambos materiales de descarte, se observa que los extractos elaborados a partir de piñones vacíos tuvieron un poder antioxidante bajo; mientras que los elaborados a partir de piñones defectuosos frescos (PD100) tuvieron mayor poder antioxidante, aproximadamente la mitad que los de cáscaras total hervida (CT100C) (27,93 vs. 64 μg EAA/mg PS) (Tabla 6 y 7). Sin embargo, no se observó diferencias significativas entre el contenido de antioxidantes en el agua del hervor a 100°C de los piñones defectuosos (AD100) o de piñones frescos (A100) (127 y 122 μg EAA/ml, respectivamente). Esto podría estar relacionado con un tejido de cubierta poco desarrollado, con mayor migración de antioxidantes al agua. Puesto que el agua del hervor contiene el 15% del poder antioxidante del piñón (Figura 23), el hervor a 100°C de piñones defectuosos podría ser una alternativa sustentable para el aprovechamiento de los antioxidantes del piñón, en los años que estos se producen en gran número.

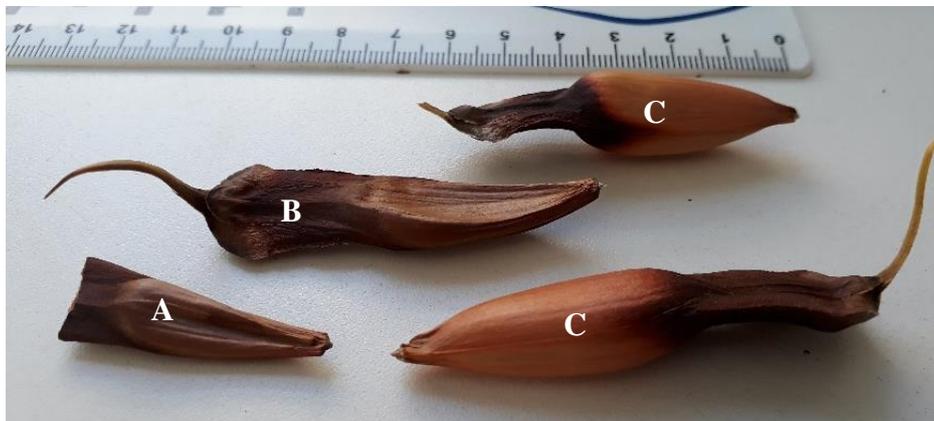


Figura 25: Fotografía de A) piñón vacío, B) piñón defectuoso y C) piñón viable.

También se analizó el poder antioxidante de pulpas de piñones en almíbar. De acuerdo con la hipótesis de que el color oscuro se debe a componentes transferidos desde la cáscara, los mismos fueron discriminados en oscuros y claros para conocer si su aspecto se debía a mayor y menor contenido de antioxidantes, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el poder antioxidante entre los distintos extractos de pulpas de piñones oscuros y claros, por lo que la coloración oscura no parece reflejar un mayor contenido de antioxidantes (Tabla 10). Por otra parte, cuando se compararon con pulpas de piñones hervidos, el poder antioxidante es menor (alrededor de 0,4 vs. $0,58 \pm 0,01$ μg EAA/mg PS), lo cual podría indicar que parte de los antioxidantes de las pulpas es extraída por el almíbar. Si bien se midió el poder antioxidante del almíbar para corroborar dicha hipótesis, al tratarse de un alimento preparado con otros ingredientes como ácido cítrico y jengibre, los valores obtenidos no resultaron ser concluyentes.

3.3.2.2. Poder antioxidante con técnica de DPPH

La actividad antioxidante del piñón fue medida también según la capacidad para reducir al radical DPPH. Los resultados hallados (Figura 26) demuestran que la cáscara fina en todos los tratamientos tuvo el mayor índice EA, lo que indica que a una baja concentración y tiempo, bajó 40% la absorbancia del radical DPPH. Los valores de EA de todos los extractos de cáscara fina fueron mayores a 0,83, valores significativamente mayores a los hallados para frutos rojos ($EA < 0,1$) y la granada ($EA = 0,63$) (Gramza *et al.* 2019). La actividad antioxidante medida con la técnica de DPPH, fue significativamente menor luego de los tratamientos de cocción, al igual que lo observado con la técnica de FRAP. La EA de los extractos obtenidos a partir de cáscara total, fina o gruesa de piñones frescos fue significativamente mayor a los obtenidos a partir de piñones hervidos a 100°C , 120°C y tostados. Esto fue más marcado para las cáscaras gruesas de piñones hervidos a 100°C ($EA = 0,04$ para CG100), aunque la gran disminución en los valores hallados respecto de la cáscaras gruesas de piñones frescos ($EA = 0,5$ para CGF) no es consistente con la baja actividad encontrada en el agua del hervor, la cual tendría antioxidantes que derivan de la cáscara gruesa. Esto podría estar relacionado al hecho de que esta técnica es más eficiente para antioxidantes de menor polaridad, por lo tanto, menos solubles en agua. Al igual que lo observado por FRAP, el hervor a 120°C extrajo mayor cantidad de antioxidantes ($EA = 0,1$ para A120) que a 100°C ($EA = 0,033$ para A100) (Figura 26). Como se menciona antes, el agua del hervor además de extraer antioxidantes, principalmente de la cáscara, rompe la estructura de los tejidos que la forman lo cual sería más eficiente a mayor temperatura. La disminución de la capacidad antioxidante de la cáscara tostada, determinada por DPPH, fue

más pronunciada que la observada por FRAP (60% vs. 26%). Todos estos datos sugieren una mayor termolabilidad de los antioxidantes solubles en etanol (solvente que utiliza la técnica con DPPH) que de los antioxidantes solubles en agua (solvente que utiliza la técnica con FRAP). Por otra parte, los extractos de pulpa no presentaron diferencias significativas según el tratamiento (Figura 27), lo cual también es consistente con los resultados hallados con el método de FRAP. También se observaron valores bajos, comparados con los de las cáscaras, por lo que la EA fue calculada para una inhibición del 20% de la absorbancia del DPPH (EA₂₀). Los valores de EA hallados en estos tejidos son similares a los de EA con 50% de inhibición de té verde (EA=0,0021) y té negro (EA=0,0028) (Gramza *et al.* 2005). El análisis por separado de los componentes de la pulpa de piñones frescos, demostró que el embrión presenta mayor EA que el endosperma, y que ésta se ve afectada significativamente cuando la extracción es en agua a 100°C (Figura 27). En este sentido, el mayor valor hallado corresponde al extracto de embrión de piñones frescos extraído con agua a TA (EA₂₀=0,0027).

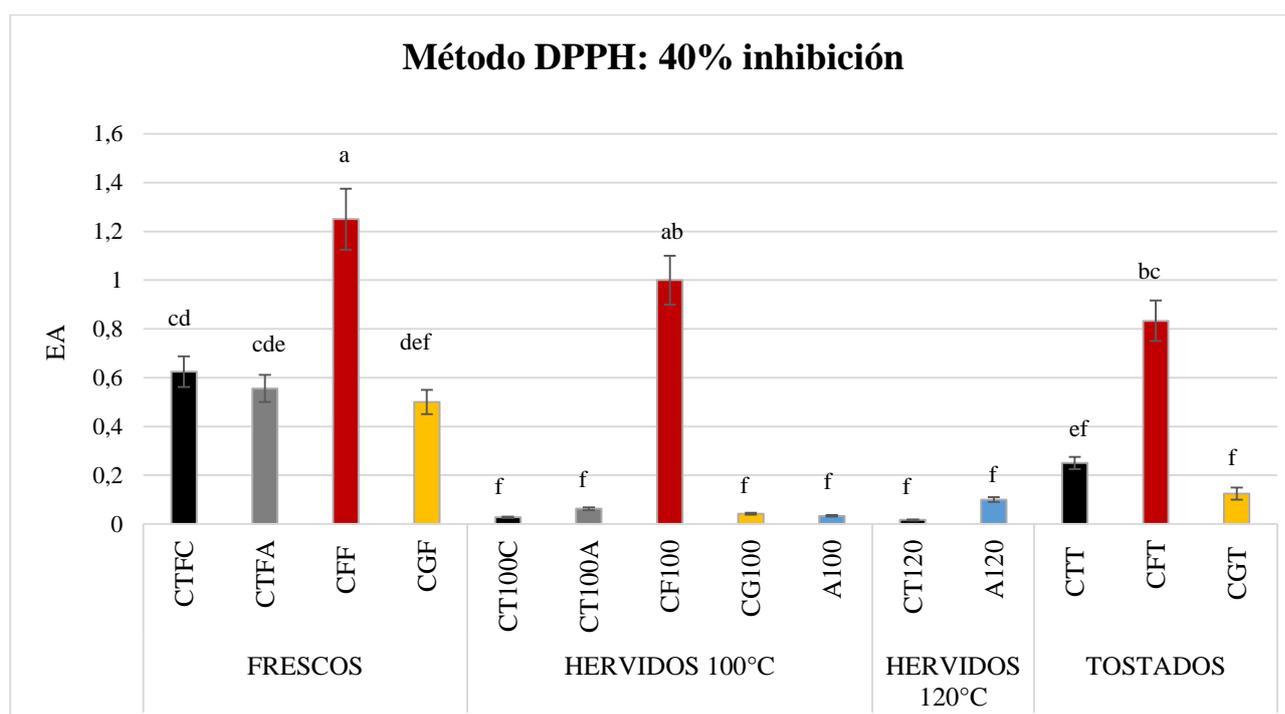


Figura 26: Eficiencia anti-radical de extractos de cáscara total de piñones frescos (CTFC y CTFA), hervidos a 100°C (CT100C y CT100A), hervidos a 120°C (CT120) y tostados (CTT), de cáscara fina y gruesa de piñones frescos (CFE y CGF), de cáscara fina y gruesa de piñones hervidos a 100°C (CF100 y CG100), de cáscara fina y gruesa de piñones tostados (CFT y CGT); y del agua de hervor a ambas temperaturas (A100 y A120). Todos los extractos fueron obtenidos a 100°C, excepto los denominados con siglas terminadas en A (obtenidos con agua a T° ambiente). Los valores se expresan como media ± DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

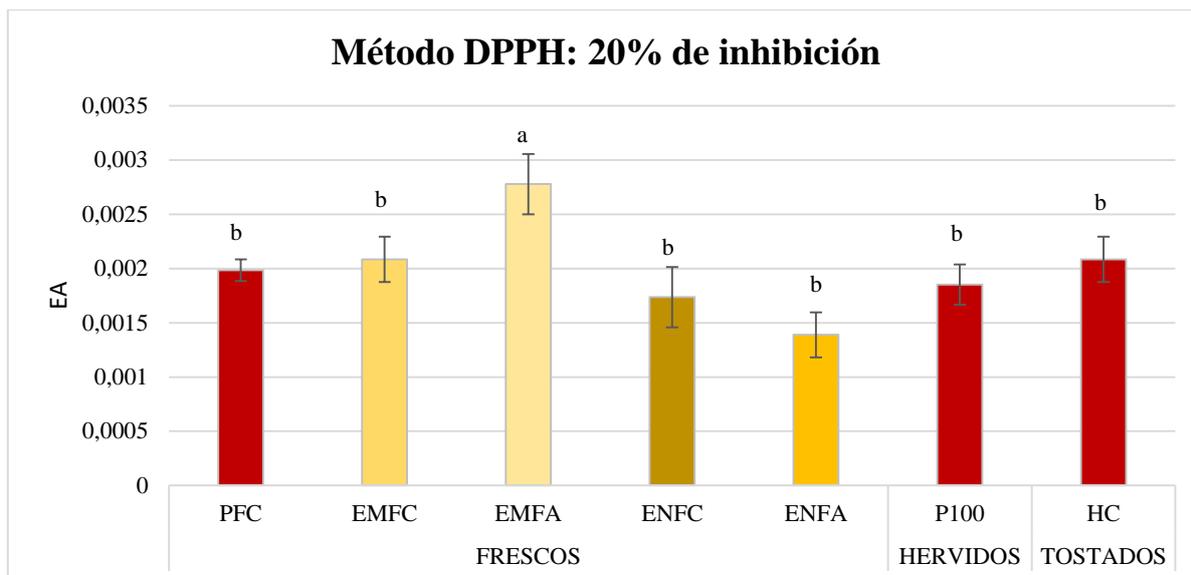


Figura 27: Eficiencia anti-radical de extractos obtenidos con agua a 100°C de pulpa de piñones frescos (PFC), hervidos a 100°C (P100) y tostados (harina, HC); y de extractos obtenidos con agua a 100°C y a temperatura ambiente a partir de embrión (EMFC y EMFA) y endosperma (ENFC y ENFA) de piñones frescos. Los valores se expresan como media \pm DE; de dos determinaciones realizadas por duplicado. Diferentes letras indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

3.3.2.3. Contenido de fenoles y flavonoides

Como ocurre en muchos extractos vegetales, el contenido de fenoles está altamente relacionado con la actividad antioxidante. En este sentido, la cáscara de los piñones frescos o bajo cualquier tratamiento térmico provee mayor cantidad de compuestos fenólicos que la pulpa. Dentro de los tejidos de cáscara analizados, se observa que en todos los casos la cáscara fina presenta un contenido significativamente mayor de polifenoles que la cáscara gruesa (Figura 28) y aunque sea un tejido minoritario en la cubierta del piñón, aporta el 26% de los fenoles de la cáscara. En relación con esto, se halló un leve aumento, no significativo, en el contenido fenólico de la pulpa hervida con respecto al control (1,14 vs. 0,81 μg EAG/mg PS), lo cual sugiere que podría haber una mínima migración de fenoles desde la cáscara fina a la pulpa (Figura 28). Sin embargo, en el caso de los piñones hervidos, los resultados indican que parte de los fenoles de la cáscara gruesa migrarían al agua del hervor. Puesto que una gran proporción de taninos son compuestos termolábiles (taninos hidrolizables) y que pequeños compuestos fenólicos pueden producirse por su degradación/hidrólisis, la migración de estos compuestos podría explicar en parte la disminución del contenido fenólico en la cáscara gruesa y su aparición en el agua. Así, la disminución del contenido de fenoles en la cáscara gruesa, después del hervor, es parcialmente recuperada en el agua del hervor, lo cual sugiere nuevamente, migración de antioxidantes desde la cubierta exterior (cáscara gruesa) hacia el agua. En relación con la termolabilidad de estos compuestos, se observó que el contenido de fenoles de cáscara total

(expresado como $\mu\text{g EAG/mg}$) disminuyó un 16% y 36% después del hervor y también del horneado, respectivamente, con respecto al control (Figura 28). Estos resultados concuerdan con la disminución en el contenido de fenoles hallada en otros vegetales después de cocinarlos (Zhao *et al.* 2019, Rashmi *et al.* 2020). A pesar de este hecho, los residuos de piñones frescos (28,7 $\mu\text{g EAG/mg PS}$ de cáscara total) y los de piñones cocidos (23,8 μg y 17,9 $\mu\text{g EAG/mg PS}$ de cáscara total hervida y tostada, respectivamente) se pueden considerar como una fuente relevante para la obtención de fenoles. Incluso, su contenido es mayor que el de algunos frutos rojos argentinos, considerados ricos en antioxidantes como: *Luma chequen* o chequén, *Ugni molinae* o murta, *Amomyrtus meli* o meli y *Luma apiculata* o arrayán (5,11; 9,24; 17,52 y 27,61 $\mu\text{g EAG/mg PS}$, respectivamente) (Brito *et al.* 2014).

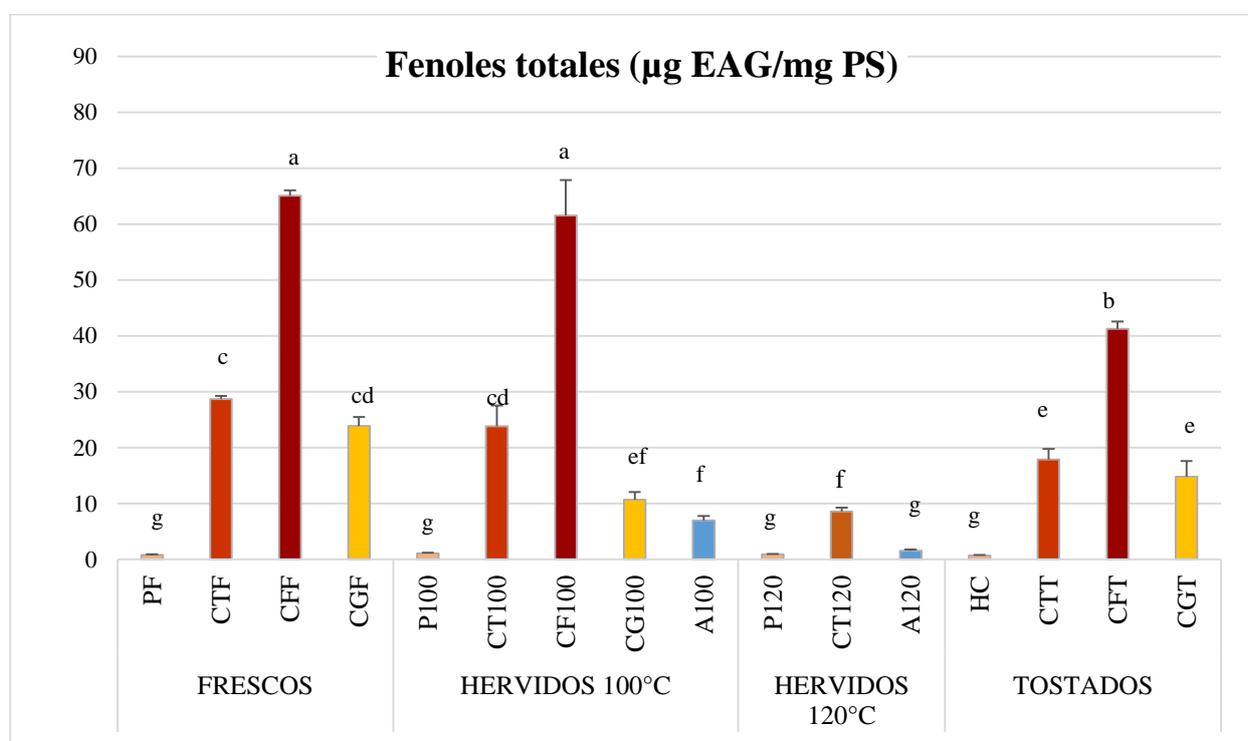


Figura 28: Contenido de fenoles totales de extractos de pulpa (P), cáscara total (CT), cáscara fina (CF) y cáscara gruesa (CG) de piñones frescos, hervidos a 100°C, hervidos a 120°C y tostados; y de agua de piñones hervidos a ambas temperaturas. Todos los extractos fueron obtenidos con agua a 100°C. Los valores se expresan como media \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en $\mu\text{g EAG/mg PS}$: equivalentes ácido gálico por mg de peso seco. Asteriscos indican diferencias significativas por el test de Tukey respecto al mismo tejido de piñones frescos ($p < 0,05$).

Por otro lado, se observó que la proporción del aporte fenólico de la cáscara gruesa respecto del aporte de la cáscara fina al contenido fenólico total de las semillas frescas es de 2,6:1 (Figura 29). Esta proporción parece no estar directamente relacionada con el poder antioxidante. En la Figura 23, en piñones frescos, se muestra que el aporte relativo de la cáscara gruesa y cáscara

fina al poder antioxidante de la semilla es 1:1,3, respectivamente. Esta discordancia en las proporciones sugiere la presencia de otros compuestos antioxidantes, no fenólicos, presentes en la cáscara de piñón, que contribuyen a su alta capacidad antioxidante.

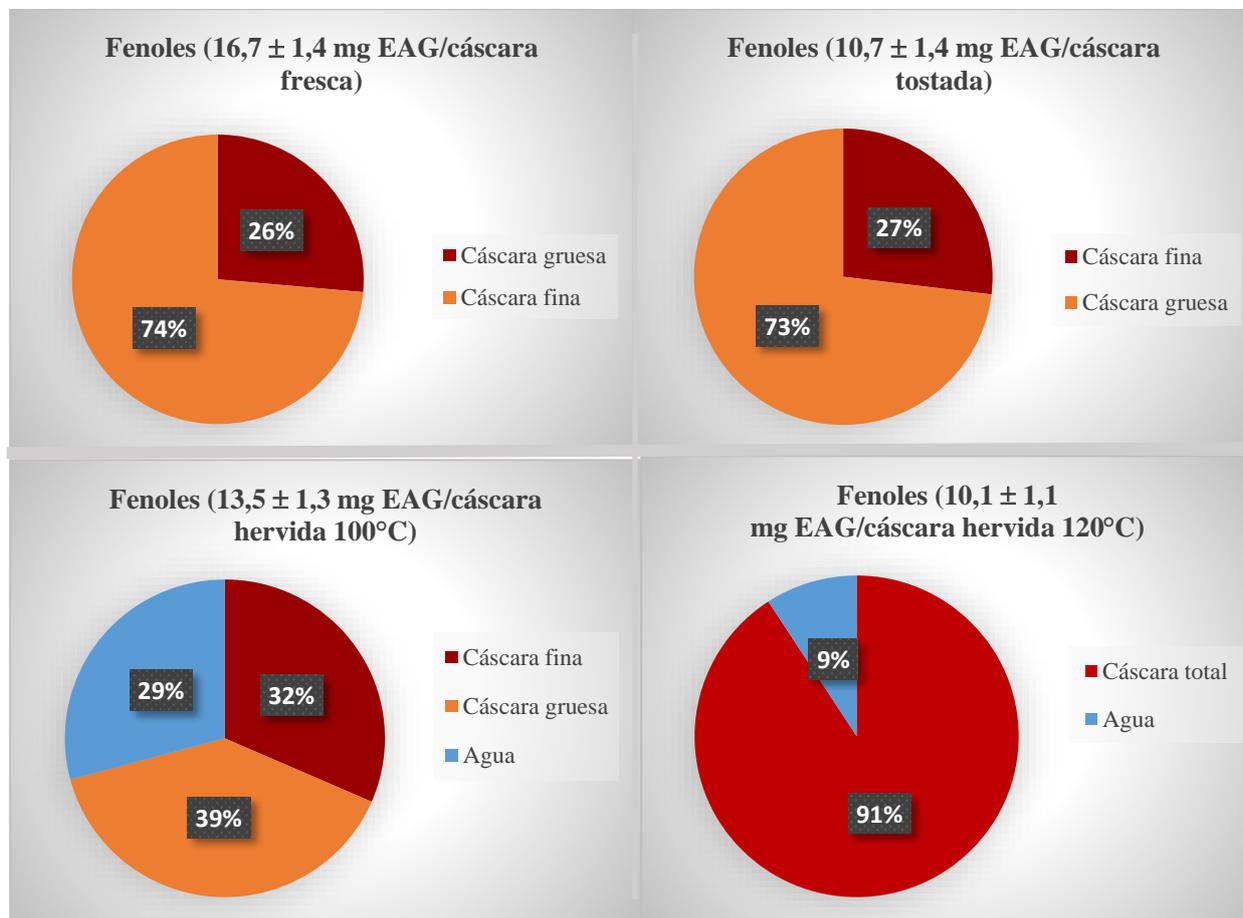


Figura 29: Proporción de fenoles hallados en cáscaras de piñones frescos, tostados y hervidos, y en agua de piñones hervidos. EAG: equivalentes de ácido gálico por mg de peso seco de cáscara.

En concordancia con los resultados anteriores, la cáscara presentó la mayor proporción de flavonoides de la semilla; y dentro de ella, la cáscara fina tuvo mayor contenido de flavonoides que la cáscara gruesa (Figura 30). Así mismo, ambas cáscaras perdieron flavonoides en una proporción similar después de la cocción (cerca del 40%; Figura 30); excepto para las cáscaras de los piñones hervidos en los que adicionalmente se perdió un 9% más, probablemente debido a la migración de los mismos desde este tejido hacia el agua, lo cual sugiere que la pérdida del contenido de flavonoides de las cáscaras estaría más relacionada a su termolabilidad que a la migración.

Al igual que con el contenido de fenoles, la parte no comestible (descartada como residuo) de piñones frescos, hervidos y tostados presentó mayor contenido de flavonoides (123,8; 79,5 y 70,1 μg EQ/mg PS, respectivamente) que los frutos de las especies argentinas mencionadas

anteriormente *Luma chequen* o chequén, *Ugni molinae* o murta, *Amomyrtus meli* o meli y *Luma apiculata* o arrayán (2,57; 5,54; 11,76 y 12,8 µg EQ/mg PS, respectivamente)(Brito *et al.* 2014).

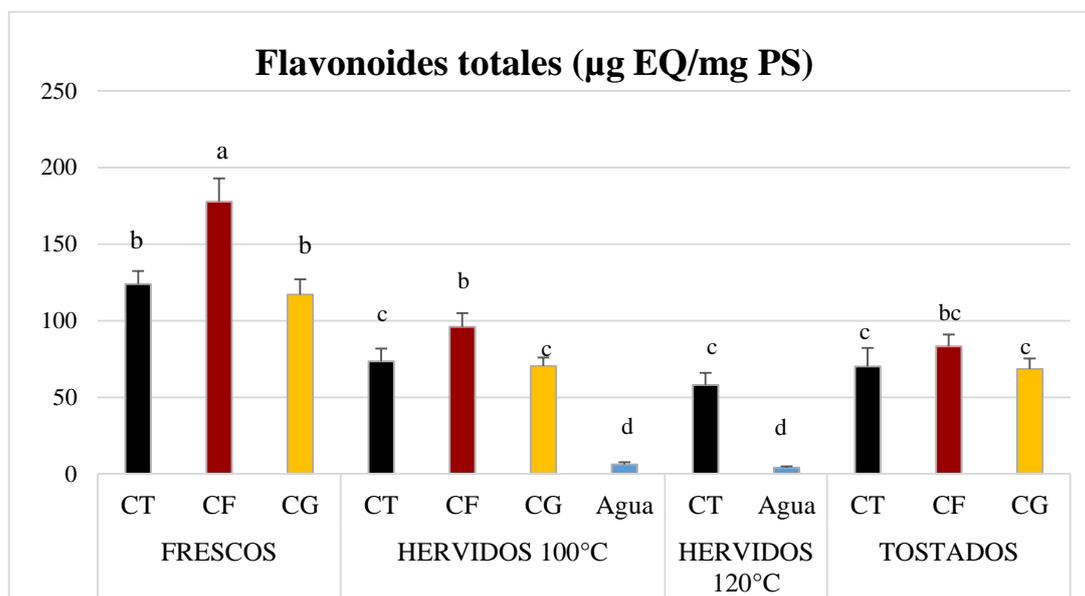


Figura 30: Contenido de flavonoides de extractos de cáscara total (CT), cáscara gruesa (CG), cáscara fina (CF) de piñones frescos, hervidos a 100°C y 120°C y tostados, y de agua de piñones hervidos. Todos los extractos fueron obtenidos con agua a 100°C. Los valores se expresan como media \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en µg EQ/mg PS: equivalentes quercetina por mg de peso seco. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

3.3.2.4. Análisis de toxicidad de extractos de piñón

Con el objetivo de conocer si existe un efecto citotóxico de los extractos de tejidos comestibles y no comestibles de piñones frescos, se realizó un test de citotoxicidad aguda que consistió en la medición de la viabilidad celular en células VERO y MCF-7 expuestas durante 2 horas a extractos de embrión, endosperma, cáscara fina, cáscara gruesa y cáscara total. Se encontró que los extractos acuosos de embrión y endosperma no afectaron la viabilidad celular tanto en VERO como en MCF-7 (Figuras 31 y 32). Estos resultados concuerdan con los usos medicinales y nutricionales históricos de dichos tejidos por las comunidades regionales; principalmente porque toda la semilla es procesada para obtener alimentos y medicinas. Por otra parte, la cáscara que usualmente es descartada después del procesado del piñón, es la primera vez que es evaluada en cuanto a su efecto sobre la viabilidad celular. Tampoco se observaron efectos citotóxicos de los extractos de la cáscara, tanto en VERO como en MCF-7. Estos resultados sugieren que los residuos de la industria del piñón podrían ser una fuente de antioxidantes apropiados para su uso como nutraceuticos. Aunque esta hipótesis debería ser confirmada con estudios toxicológicos más completos.

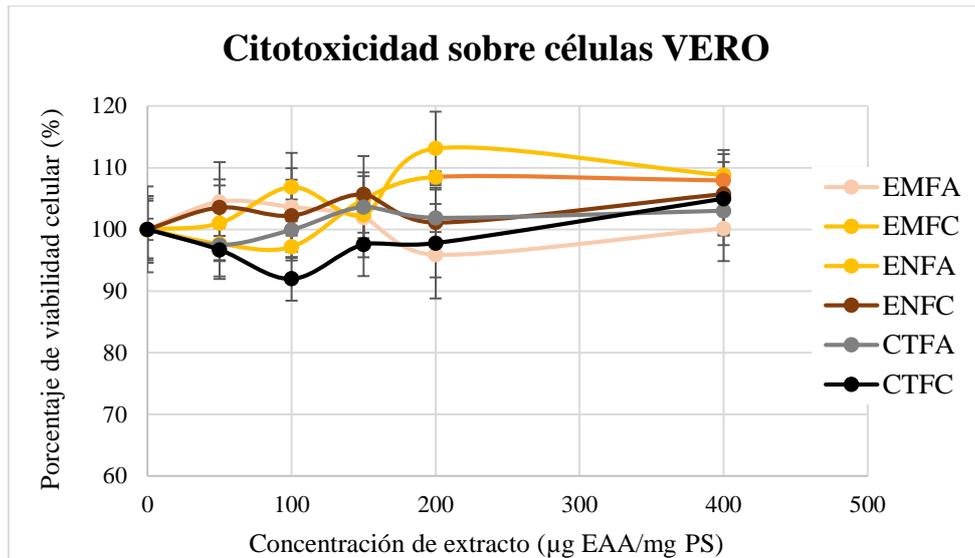


Figura 31: Porcentaje de viabilidad de células VERO a distintas concentraciones de extractos de embrión (EMF), endosperma (ENF) y cáscara total (CTF) de piñones frescos. Extractos obtenidos con agua a temperatura ambiente (terminación de la sigla en A) y a 100°C (terminación de la sigla en C). EAA: equivalentes de ácido ascórbico por mg de peso seco.

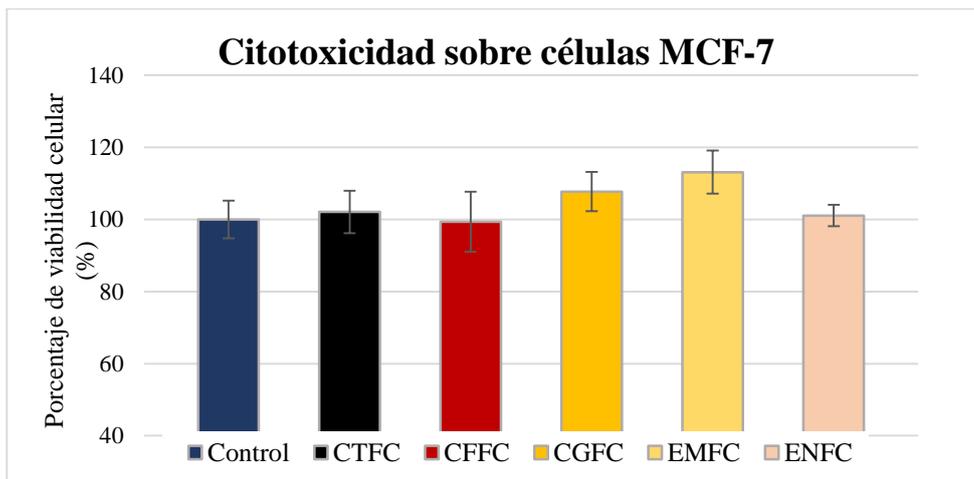


Figura 32: Porcentaje de viabilidad de células MCF-7 expuestas a 200 µg EAA/mg PS de extractos obtenidos a 100°C de cáscara total (CTFC), cáscara fina (CFFC), cáscara gruesa (CGFC), embrión (EMFC) y endosperma (ENFC) de piñones frescos.

3.3.3. Callos de células de piñón obtenidos *in vitro*

3.3.3.1. Selección de callos

El crecimiento de callos de *A. araucana* se observó en la zona del eje embrionario del embrión, tanto en las rodajas de piñones (Figura 33 A) como en los embriones enteros cultivados (Figura 33 B). No se observó formación de callos en los cotiledones ni en el endosperma. Las mejores condiciones en las que se indujeron callos en los piñones fueron en medio MS suplementado con 1 mg/l de ácido naftalenacético (NAA) y 1,5 mg/l bencilaminopurina (BAP) y cultivados

en luz, con un 57,1% de formación de callos; mientras que en oscuridad el porcentaje de formación fue significativamente menor (38%) (Tabla 11). Por otra parte, se detectó una disminución significativa en formación de callos cuando se añadió ácido giberélico (AG) a la mejor condición de inducción, tanto con luz como en oscuridad (44 y 33%, respectivamente). Por su parte, el medio suplementado con 1 mg/l de NAA y 2 mg/l BAP en condiciones de oscuridad mostró un porcentaje de formación del 25% (Tabla 11). Los callos con mayor biomasa (callos ≥ 1 cm de diámetro luego de 70 días post-inducción) fueron seleccionados para proseguir con la extracción y análisis de antioxidantes. Los medios suplementados con 2 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1 mg/l de BAP, y 1 mg/l de NAA y 2 mg/l BAP en condiciones de luz mostraron muy bajo porcentaje de inducción de callo, por lo que no se tomaron en cuenta para las determinaciones de antioxidantes.

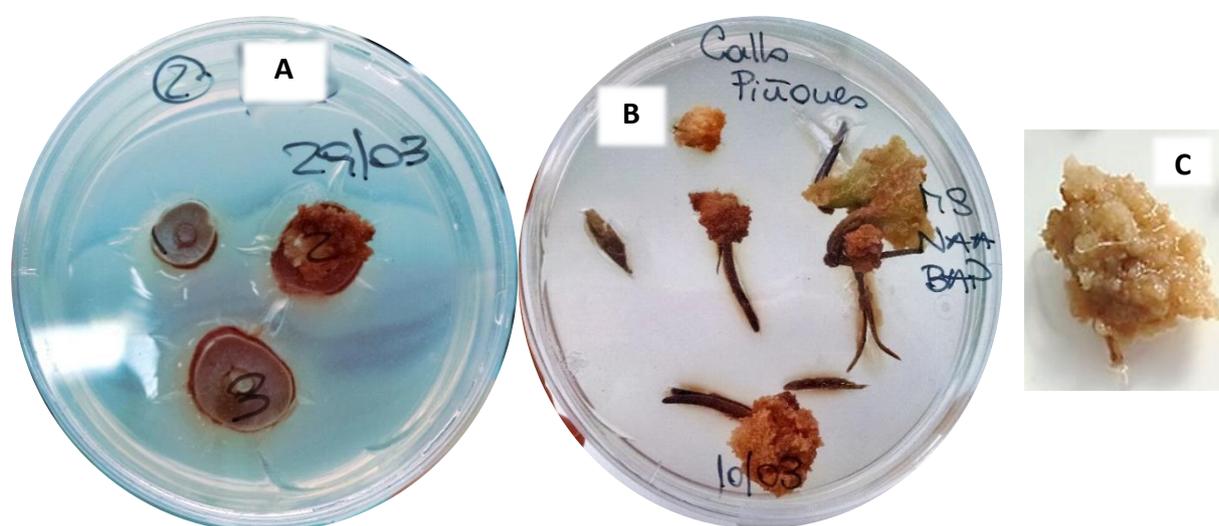


Figura 33: Callos obtenidos a partir de piñones frescos: A) rodajas de piñón con formación de callo en la zona del eje embrionario, B) embriones completos con callos formados en el eje embrionario y C) detalle de un callo de 45 días.

Tabla 11: Porcentaje de formación de callos de embrión de piñón en aquellos medios en los que se obtuvo un mínimo de 25% de formación

Condiciones de cultivo	% de formación
L; BAP 1,5mg/l; NAA 1mg/l	57 ± 6,0 (a)
L; BAP 1,5mg/l; NAA 1mg/l; AG 0,5mg/l	44 ± 3,0 (b)
L; BAP 2mg/l; NAA 1mg/l	15 ± 1,5 (d)
O; BAP 1mg/l	33 ± 3,1 (c)
O; BAP 1,5mg/l; NAA 1mg/l	38 ± 5,2 (b,c)
O; BAP 1,5mg/l; NAA 1mg/l; AG 0,5mg/l	33 ± 4,0 (c)
O; BAP 2mg/l; NAA 1mg/l	25 ± 3,1 (c,d)

Los valores representan la media \pm DE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. L: luz, O: oscuridad. NAA: ácido naftalenacético, BAP: bencilaminopurina, AG: ácido giberélico, 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

3.3.3.2. Poder antioxidante con técnicas de FRAP y DPPH

Se analizó el poder antioxidante de los callos obtenidos en medios seleccionados por su mayor producción de biomasa. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre extractos de los callos obtenidos con iluminación, con 1,5 mg/l BAP y 1 mg/l NAA con y sin 0,5 mg/l AG (Tabla 12). Los callos obtenidos con estos tratamientos tuvieron aproximadamente 10 μg EAA/mg PS, al igual que aquellos obtenidos en oscuridad con 1 mg/l BAP o con 1,5 mg/l BAP y 1 mg/l NAA (Tabla 12). Mientras que los callos obtenidos en el medio con 1,5 mg/l BAP, 1 mg/l NAA y 0,5 mg/l AG tuvieron un poder antioxidante significativamente menor (3,33 μg EAA/mg PS). En comparación con la actividad antioxidante hallada en el embrión de piñones frescos (1,80 μg EAA/mg PS), los callos tuvieron un valor de poder antioxidante cinco veces mayor. Incluso la condición menos favorable de crecimiento (L; BAP 1,5 mg/l; NAA 1 mg/l, AG 0,5 mg/l), resultó en un valor de poder antioxidante significativamente superior al obtenido del embrión fresco. Estos resultados concuerdan con la afirmación de que el cultivo de células vegetales es una metodología que puede ser muy eficiente para la obtención de antioxidantes comparada con la recolección de material vegetal de la naturaleza (Efferth 2019).

En cuanto al índice de EA calculado a partir de los extractos de callos de piñón, éste concuerda con la actividad antioxidante medida con la técnica de FRAP. Los extractos obtenidos de callos cultivados en medio MS con 1,5 mg BAP y 1 mg/l NAA con iluminación tuvieron una significativamente mayor EA (Tabla 12). Aquellos callos cultivados con medio con AG tanto con luz como en oscuridad mostraron una alta EA sin diferencias significativas entre sí. La menor EA fue hallada en aquellos extractos de callos que crecieron en un medio suplementado con 2 mg/l BAP y 1 mg/l NAA. Es importante destacar que, en concordancia con los valores determinados por la técnica FRAP, los callos presentaron valores del índice muy superiores ($EA > 0,066$; EC40%) a los hallados en los extractos de embriones de piñones frescos ($EA = 0,002$; EC20%). Por lo cual se reafirma la utilidad del cultivo *in vitro* a partir de células de piñones como una valiosa fuente de antioxidantes naturales.

Tabla 12: Poder antioxidante medido por la técnica de FRAP y Eficiencia anti-radical de extractos obtenidos a partir de callos de piñón

	FRAP (μg EAA/mg PS)	EA (40% inhibición)
L; BAP 1,5 mg/l; NAA 1 mg/l	10,50 \pm 2,10 (a)	0,133 \pm 0,001 (a)
L; BAP 1,5 mg/l; NAA 1 mg/l; AG 0,5 mg/l	10,17 \pm 1,80 (a)	0,110 \pm 0,012 (ab)
L; BAP 2 mg/l; NAA 1 mg/l	sd	sd
O; BAP 1 mg/l	9,50 \pm 1,20 (a)	0,092 \pm 0,008 (b)
O; BAP 1,5 mg/l; NAA 1 mg/l	8,50 \pm 0,90 (a)	0,083 \pm 0,009 (b)
O; BAP 1,5 mg/l; NAA 1 mg/l; AG 0,5 mg/l	3,33 \pm 1,30 (b)	0,119 \pm 0,011 (a)
O; BAP 2 mg/l; NAA 1 mg/l	5,50 \pm 1,10 (b)	0,066 \pm 0,007 (c)

Los valores representan el promedio \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en μg EAA/mg PS: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco y EA: eficiencia anti-radical. L: luz, O: oscuridad. NAA: ácido naftalenacético, BAP: bencilaminopurina, AG: ácido giberélico, 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

3.3.3.3. Contenido de fenoles y flavonoides

Los extractos de callos formados en el eje embrionario presentaron valores significativamente mayores de contenido de fenoles que los extractos de embrión de piñones frescos. El extracto de embrión de piñones frescos en agua a TA presentó un valor de 0,67 μg EAG/mg PS, mientras que los extractos de los callos mostraron entre 5,83 y 14,33 μg EAG/mg PS, con el mayor valor obtenido en los extractos de callos cultivados en el medio O; BAP2; NAA1 (Tabla 13). Estos resultados pueden deberse a la existencia de mayor contenido de fenoles en el eje embrionario (a partir del cual se formaron los callos) comparado con los cotiledones; como se ha reportado en otras semillas (Pukacka y Ratajczak 2007; Sreerama *et al.* 2010). La presencia de fenoles en el eje embrionario ha sido relacionada estrechamente con la viabilidad de la semilla, por su papel como agentes antioxidantes y anti-radicales que previenen el envejecimiento seminal (Corso *et al.* 2020). Por otra parte, es conocido que la luz es un factor físico que estimula la biosíntesis *in vivo* e *in vitro* de metabolitos secundarios, que incluyen los compuestos fenólicos. Sin embargo, el contenido de fenoles y la actividad antioxidante de los cultivos celulares varía ampliamente según la especie, la longitud de onda de la luz y el tipo de cultivo (Khurshid *et al.* 2020). En concordancia con Arias *et al.* (2016), los cultivos de embriones de piñón que crecieron en ausencia de luz presentaron mayor contenido de fenoles y actividad antioxidante comparados con aquellos que crecieron en presencia de luz (Tabla 13). Por otro lado, en algunos casos, estos callos también mostraron un contenido significativamente mayor de flavonoides, que aquellos expuestos a la luz. Aunque, a diferencia de lo observado para fenoles, el contenido de flavonoides de la mayoría de los extractos de callos fue menor que el del embrión (11,47 vs. 16,23 μg EQ/mg PS), excepto en el caso del extracto del tratamiento O; BAP 1,5 mg/l; NAA 1 mg/l (23,17 μg EQ/mg PS).

Tabla 13: Contenido de fenoles y flavonoides de callos de piñón

	Fenoles (μg EAG/mg PS)	Flavonoides (μg EQ/mg PS)
L; BAP 1,5 mg/l; NAA 1 mg/l	9,67 \pm 1,44 (b)	12,00 \pm 1,85 (b)
L; BAP 1,5 mg/l; NAA 1 mg/l; AG 0,5 mg/l	9,33 \pm 1,15 (b)	12,17 \pm 2,10 (b)
L; BAP 2 mg/l; NAA 1 mg/l	sd	sd
O; BAP 1 mg/l	6,50 \pm 0,76 (c)	6,50 \pm 0,90 (c)
O; BAP 1,5 mg/l; NAA 1 mg/l	9,00 \pm 1,12 (b)	23,17 \pm 3,15 (a)
O; BAP 1,5 mg/l; NAA 1 mg/l; AG 0,5 mg/l	5,83 \pm 0,65 (c)	15,50 \pm 1,64 (b)
O; BAP 2 mg/l; NAA 1 mg/l	14,33 \pm 2,15 (a)	8,50 \pm 1,10 (c)

Los valores representan el promedio \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en μg EAG/mg PS: equivalentes ácido gálico y EQ/mg PS: equivalentes quercetina, por mg de peso seco. sd: sin datos. L: luz, O: oscuridad. NAA: ácido naftalenacético, BAP: bencilaminopurina, AG: ácido giberélico, 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Todos estos resultados sugieren que el gran poder antioxidante de los callos, comparado con el de embriones, podría estar relacionado con una alta síntesis de compuestos fenólicos en condiciones *in vitro*. lo cual sugiere que la combinación de 1,5 mg/l de la citoquinina BAP y 1 mg/l de la auxina NAA promovió la proliferación *in vitro* de células embrionarias de piñón y estimuló fuertemente la vía fenilpropanoide, responsable de la síntesis de los compuestos fenólicos (Dong y Lin 2021). Sin embargo, el contenido de flavonoides disminuyó significativamente con respecto al valor hallado en embrión, principalmente en condiciones de crecimiento en presencia de luz. Por tanto, la vía de síntesis de los flavonoides, que deriva de la vía fenilpropanoide, estaría disminuida, tal como se observa en otros cultivos (Ibrahim *et al.* 2018).

3.3.3.4. Análisis de toxicidad de extractos de callo de piñón

En estos ensayos, se encontró que los callos crecidos en el medio elegido como óptimo, de acuerdo con la producción de biomasa y capacidad antioxidante (Medio MS con 1,5 mg/l BAP y 1 mg/l NAA en oscuridad), no disminuyó la viabilidad celular de células VERO y MCF-7 con respecto al control en ninguna de las concentraciones evaluadas luego de 2 h de incubación (Figura 34). Los resultados concuerdan con la nula toxicidad de los extractos de embrión en ambos tipos celulares, por lo que el cultivo *in vitro* de células embrionarias de piñón no induciría la síntesis de compuestos tóxicos. Estas observaciones son coherentes con el uso nutricional y medicinal que históricamente han hecho las comunidades regionales del piñón (Ladio y Lozada 2009) y con otros trabajos sobre efectos citoprotectores de extractos ricos en polifenoles de especies del género *Araucaria* (Aslam *et al.* 2013; Souza *et al.* 2014; Branco *et al.* 2015; Devi *et al.* 2015).

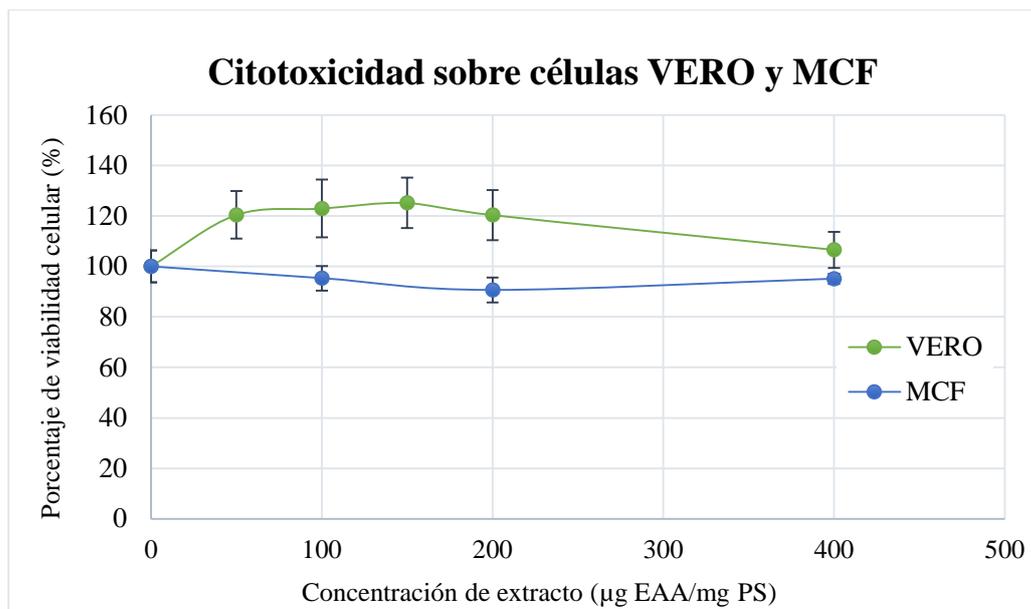


Figura 34: Porcentaje de viabilidad de células VERO y MCF-7 a distintas concentraciones de extracto de callo de piñón. EAA/mg PS: equivalentes de ácido ascórbico por mg de peso seco.

3.4. Conclusiones

Este trabajo aporta nuevos conocimientos sobre especies nativas de la Provincia Fitogeográfica del Monte utilizadas con fines medicinales. Los estudios realizados para determinar la actividad antioxidante, el contenido de fenoles y flavonoides y la citotoxicidad de extractos obtenidos a partir de tejidos de especies vegetales autóctonas cosechados en la época primavera-estival, contribuyen al conocimiento de las propiedades y potencial uso nutracéutico de la flora norpatagónica. En comparación con otros macerados e infusiones de uso regional, algunos de los extractos analizados presentaron valores mayores en el contenido de antioxidantes y no presentaron citotoxicidad en las concentraciones evaluadas. Por otro lado, aunque se encontró actividad antioxidante en los extractos obtenidos de la especie *G. chilensis*, estos extractos tuvieron un marcado efecto citotóxico. Estas observaciones confirman la necesidad de realizar estudios científicos que revelen la composición de los fitopreparados y descarten posibles efectos tóxicos de los mismos, aunque se trate de una planta con una larga historia de uso etnomedicinal.

Entre los materiales estudiados, los piñones, semillas comestibles del Pehuén (*A. araucana*), son uno de los alimentos con usos curativos (medicinal y religioso) más emblemáticos de la Patagonia Norte. Sin embargo, prácticamente no existen estudios que fundamenten estos usos. Este es el primer estudio que determina el nivel de antioxidantes y compuestos fenólicos derivados de distintos tejidos del piñón. Al realizar el estudio exhaustivo de la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles de piñones, tanto de su porción comestible, como de

las cáscaras que normalmente son descartadas por pobladores o por la industria de alimentos de piñón, se encontró actividad antioxidante en todos los tejidos analizados y se comprobó que los mismos no presentan citotoxicidad. Además, por tratarse de una especie protegida, con baja capacidad de regeneración poblacional, se consideró que el uso de esta semilla para la obtención de antioxidantes podría aumentar su vulnerabilidad. Para asegurar la producción de antioxidantes propios de la fracción comestible del piñón, sin comprometer a las poblaciones naturales, se optimizaron las condiciones de cultivo *in vitro* de sus células. La producción *in vitro* es una herramienta biotecnológica que podría prevenir la sobreexplotación, permitiendo obtener los antioxidantes de la fracción comestible de una manera amigable tanto con el medio ambiente como con las actividades industriales, turísticas y ancestrales de la región. El análisis de los callos de células cultivados a partir de embriones de piñón demuestra que es posible obtener metabolitos secundarios antioxidantes *in vitro* a partir de células desdiferenciadas y que dicho método mejora la actividad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos en comparación con el tejido extraído directamente a partir de la semilla. Es interesante señalar que los extractos a partir de residuos de la industria del piñón resultan ser una fuente muy importante de antioxidantes, principalmente el extracto de cáscara fina que presenta los mayores niveles de fenoles y flavonoides. Asimismo, resulta relevante que ningún tejido de piñón presenta toxicidad *in vitro* en las líneas celulares evaluadas.

Dados los cuatro recursos utilizados, hojas y tallos de especies nativas recolectadas a campo, piñones o las células obtenidas *in vitro* a partir de sus embriones, así como los residuos de la industria del piñón, y de acuerdo a los valores de poder antioxidante hallados, el contenido de fenoles, la falta de toxicidad observada, el potencial de estos recursos como fuente novedosa de antioxidantes naturales, la demanda industrial (alimenticia y farmacológica principalmente) de los mismos y la tendencia mundial de disponer de métodos de producción sustentables, se concluye que la cáscara del piñón, un tejido descartado como residuo, sería un recurso regional desaprovechado que por su alta disponibilidad y bajo costo sería una importante fuente de metabolitos de alto valor antioxidante.

Por estos motivos, se decidió profundizar en el estudio de la cáscara de piñón para avanzar en el conocimiento de su actividad biológica y química, en miras de un uso potencial como fuente de antioxidantes naturales.

CAPITULO 4

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO DE CÁSCARA DE PIÑÓN Y PURIFICACIÓN DE FRACCIONES BIOACTIVAS

4.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las semillas de Pehuén se han utilizado para la alimentación y con fines medicinales y religiosos desde la antigüedad. Hoy en día los piñones también tienen un gran valor para el turismo gastronómico en algunas localidades patagónicas. En Villa Pehuenia en la Provincia de Neuquén, por ejemplo, la incorporación del piñón como recurso turístico comenzó a utilizarse como valor añadido para el destino a través de la “costanera gastronómica”. De esta forma, durante todo el año, el turista puede degustar el piñón en las comidas como un complemento de la visita a la localidad. A su vez, se puede distinguir la gastronomía a base de piñón como producto *per se*, en el caso del Festival del Chef (Cassani 2013). Los piñones se utilizan para la producción de productos como harina, pan, bebidas, conservas, platos gourmet entre otros (Sedrez dos Reis *et al.* 2014). Como subproducto de la preparación de alimentos, la cáscara del piñón (que constituye el 30 % del peso de la semilla) es desechada y tarda un tiempo considerable en descomponerse. Según datos publicados, en Argentina y Chile se cosechan anualmente aproximadamente 90 kg/ha y 273 kg/ha de piñones, respectivamente (Taha *et al.* 2010; Sanguinetti 2014), por lo que se pueden generar más de 25 kg/ha de desecho. La cáscara de estos piñones se caracteriza por tener dos capas: una interna, color rojiza, adherida a la parte comestible (cáscara fina) y una externa, marrón-rojiza muy resistente (cáscara gruesa); que por su coloración y sabor astringente dan cuenta de la presencia de compuestos fenólicos como taninos, por ejemplo. Los resultados mostrados en el Capítulo 3 confirman esta apreciación, así como su alto poder antioxidante. Este constituye el primer estudio de la cáscara del piñón de *A. araucana*, ya que, hasta la fecha, solo existen estudios de las características, propiedades y usos de los piñones de *A. angustifolia*, una especie similar distribuida en el sur de Brasil y norte de Argentina, que ha sido descrita como un recurso rico en compuestos fenólicos y con capacidad antioxidante (Angélica Koehnlein *et al.* 2012; Souza *et al.* 2014). Cordenunsi *et al.* (2004) compararon el contenido de polifenoles y flavonoides en la cáscara interna y externa de piñones de *A. angustifolia* frescos y cocidos. Da Silva *et al.* (2019) identificaron 8 compuestos en el extracto elaborado a partir del agua del hervor de semillas de *A. angustifolia*: 3 ácidos fenólicos (ácido protocatéquico, ácido ferúlico hexósido, y ácido 3,5-O-dicafeilquínico), 4 flavonoides (catequina, epicatequina, dímero epicatequina tipo B y hexóxido eriodictiol), y un ácido orgánico (ácido quínico). El ácido quínico también fue identificado en extractos etanólicos de hojas y tallos de *A. cunninghami*, otra especie del mismo género (Chen *et al.* 2011). Por su parte, De Freitas *et al.* (2018) identificaron trece compuestos fenólicos en el agua de cocción

de piñones de *A. angustifolia*, dentro de los cuales diez de ellos corresponden a proantocianidinas (derivados de catequina y epicatequina), dos ácidos fenólicos (derivados de ácido ferúlico y procatéquico), un flavonol (quercetina 3-O-glucósido) y una flavanona (hexóxido eriodictiol).

Los taninos pertenecen a la familia de los flavonoides y son polímeros polifenólicos solubles en agua, de alto peso molecular. La presencia de un gran número de grupos hidroxilo fenólicos les brinda la capacidad de formar complejos principalmente con las proteínas. Los taninos se dividen en dos grupos: hidrolizables y condensados (también conocidos como proantocianidinas). En particular, la presencia de los taninos condensados ha comenzado a ser investigada en diversas especies vegetales debido a la amplia evidencia que asocia dichos compuestos con beneficios potenciales en salud y también en otras áreas como la vitivinicultura o el tratamiento de efluentes (Rajasekaran *et al.* 2021; Paisonni *et al.* 2022; Tomasi *et al.* 2022). La composición de taninos en la cáscara del piñón de *A. araucana* no ha sido investigada hasta la actualidad a pesar de que ha sido descrita en otras especies del mismo género, en las cuales estos compuestos constituyen un porcentaje alto dentro de la composición de fenoles en los tejidos de la cáscara y presentan numerosas actividades biológicas. Por ejemplo, los taninos extraídos de cáscara de piñones de *A. angustifolia*, formados principalmente por procianidinas, son inhibidores efectivos de la enzima α -amilasa salival humana y porcina pancreática, como así también efectivos para disminuir la glucemia durante el período postprandial en ratas (da Silva *et al.* 2014). Por otro lado, se ha explorado la utilización de extractos de estas cáscaras ricos en taninos en formulaciones cosméticas, especialmente, productos “antiage” con alto contenido de antioxidantes (Mota *et al.* 2014).

La misma situación se da con respecto a la composición elemental del piñón de *A. araucana*, que no ha sido estudiada; si bien sí lo ha sido en piñones de la especie *A. angustifolia*. En pulpa de piñones de diferentes poblaciones de *A. angustifolia* se ha encontrado que los elementos C, K, N y P son los cuatro principales nutrientes, mientras que los micronutrientes que se encontraron en mayor concentración fueron Fe y Zn, y en menor concentración Mo y Ni (Barbosa *et al.* 2019). Por otra parte, otros autores mediante análisis con espectrometría de rayos X hallaron K, Fe, Cu, Zn, Rb, Ca y P en pulpa y cáscara, mientras que Sr y Mg sólo en la cáscara de piñones de esta misma especie (Zacarías Herrera *et al.* 2019).

Ha quedado demostrado a partir de los resultados obtenidos en esta tesis y descriptos en el capítulo anterior que los extractos de la cáscara de piñones de *A. araucana* presentan un gran poder antioxidante y elevado contenido de fenoles. Por lo tanto, se analizaron los principales componentes potencialmente responsables de sus propiedades antioxidantes y nutritivas.

4.1.1. Hipótesis

Los extractos de cáscara de piñón representan una fuente de alto valor nutricional, con una gran proporción de taninos y compuestos fenólicos con actividad antioxidante que pueden ser obtenidos en fracciones enriquecidas mediante procesos amigables con el medioambiente.

4.1.2. Objetivo

Caracterizar químicamente el extracto de cáscara de piñón en cuanto a su composición nutricional, el contenido de taninos y la composición de compuestos fenólicos; y purificar fracciones con alto poder antioxidante.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Reactivos químicos

Los estándares utilizados de ácido gálico, catequina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, rutina, ácido tánico y quercetina se adquirieron de Sigma-Aldrich, Chemical Co, St. Saint Louis, MO, EEUU. El ácido fosfórico 85% (grado HPLC) y el metanol fueron adquiridos de Sintorgan, Buenos Aires, Argentina. Los estándares kuromanina ($\geq 95\%$), delphinidina, (-)-epicatequina ($\geq 99\%$) y resveratrol ($\geq 98\%$) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (California, EUA), mientras que el ácido elágico de LGC Standards, (Teddington, Reino Unido). Los solventes de calidad analítica y el carbón activado fueron obtenidos de Sintorgan. La albúmina sérica bovina (ASB) fue adquirida de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU.

4.2.2. Cuantificación de taninos

El método para cuantificar el contenido de taninos del extracto de cáscara total de piñón (CTFC, ver obtención del extracto en sección 3.2.3.2.1. Piñones frescos) se basó en la propiedad de los taninos de interaccionar y precipitar proteínas (Ricco *et al.* 2015). El ensayo consta de tres etapas y utiliza el procedimiento de Folin-Ciocalteu para determinar el contenido de fenoles (descrito en la sección 3.2.5. *Determinación de fenoles totales*): en la primera etapa, se realizó la determinación del contenido de fenoles totales (CFT) del extracto; en la segunda, se removieron los taninos mediante su precipitación con una solución de albúmina sérica bovina (ASB) y se determinó el contenido de fenoles residuales (CFR); y en el tercer paso, se calculó por diferencia el contenido de taninos (CT). Para la remoción de los taninos, se mezclaron 0,5 ml de extracto con 0,5 ml de solución ASB en buffer acetato (acetato de sodio 0,2 M, pH 5; cloruro de sodio 0,17 M y 1,0 mg/ml de ASB) y se dejó descansar la mezcla durante 15 minutos a TA. Luego se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm y se separó el sobrenadante. El último paso

consistió en determinar el contenido de fenoles en ese sobrenadante (CFR).

Para obtener el valor de contenido de taninos totales se realizó la diferencia entre el valor de polifenoles obtenido antes y después de la precipitación con ASB.

$$CT = CFT - CFR$$

El contenido de taninos se expresó como equivalentes de ácido gálico (EAG, μg ácido gálico / mg material seco).

4.2.3. Análisis multielemental por fluorescencia de rayos X de dispersión de energía (EDXRF)

El análisis de la composición elemental mediante EDXRF, por ser no destructiva (permite análisis posteriores y la obtención de los extractos) y multielemental (numerosos elementos determinados en un solo análisis), esta técnica fue ensayada a fin de determinar la composición elemental de todos los tejidos del piñón. Para estas determinaciones se utilizó un sistema de mesada con control táctil S2 Ranger (Bruker AXS GmbH, Alemania) con un tubo de rayos X Pd y un detector de desviación XFlash® Silicon (SDD) disponible en el Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua – IDAEA-CSIC, Barcelona, España, mediante convenio de colaboración científica con el Dr. Ignasi Queralt. Para la preparación de las muestras, se siguió el protocolo utilizado por Gallardo *et al.* (2016). El material vegetal fue lavado con agua destilada y secado a 40°C hasta que alcanzó un peso constante. Luego, fue molido con un molinillo hasta llegar a un polvo fino. Para la preparación de las pastillas, se pesaron 5 g de polvo en un molde de 13,5 mm de diámetro y se comprimieron en una prensa neumática durante 60 segundos con una presión de 5 Torr hasta obtener una pastilla compacta.

Los datos del espectro de emisión fueron obtenidos a 4 voltajes diferentes (10, 20, 40 y 50 KV) para excitar apropiadamente diferentes elementos y determinar la composición elemental desde el elemento sodio (n=11) hasta el plomo (n=82). La evaluación del espectro de EDXRF y el cálculo de las concentraciones de los elementos fueron efectuados con el software suministrado por el equipo. La configuración del equipo y las curvas de calibración fueron establecidas con un conjunto de 14 materiales vegetales certificados de referencia, de acuerdo a Gallardo *et al.* (2016). Cada muestra fue medida tres veces, y se calculó el promedio y el desvío estándar para cada elemento.

4.2.4. Protocolo de purificación de las fracciones activas

A partir del análisis realizado y sobre la base del poder antioxidante, contenido de polifenoles y flavonoides, el perfil multielemental y la citotoxicidad se obtuvieron nuevamente extractos provenientes de la cáscara de piñón: cáscara total de piñones hervidos (CHT) y cáscara total de piñones tostados (CTT), ambos materiales aportados por la empresa Nous. El material fue

secado a TA, molido con molinillo a martillo y conservado en frascos herméticos. Se realizaron distintos tipos de extracciones a partir de este material vegetal en el que se incluyó tratamientos térmicos, de ultrasonido, con microondas y con solventes orgánicos; como así también pre y postratamientos. En todas las determinaciones, los extractos acuosos obtenidos a 100°C (CHT y CTT) fueron considerados controles.

Los extractos se realizaron a partir de 1 g de material vegetal y 12,5 ml de solvente. El extracto control fue obtenido con agua caliente a 100°C y macerado toda la noche (de acuerdo con los resultados mostrados previamente). Por otra parte, se realizó una extracción acuosa en un baño con ultrasonido (42kHz de frecuencia) durante dos períodos de tiempo (25 y 50 minutos) bajo dos tratamientos térmicos (TA y 60°C). También se elaboró un extracto metanólico (metanol 100%) que fue macerado toda la noche y otro extracto metanólico (metanol 100%) con ultrasonido durante dos períodos de tiempo (25 y 50 minutos) Estos extractos metanólicos fueron realizados a TA para evitar la evaporación del solvente. Se ensayó además otro de tipo de extracción mediante el uso de un microondas doméstico, con dos condiciones diferentes de tiempo y potencia: 1 minuto 30 segundos a 160 W y 50 segundos a 320 W.

Cada uno de los extractos fue colocado en un cartucho de filtración con tela de nylon con poro de 20 µm de diámetro y centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos. El filtrado fue separado y almacenado a -20°C. A continuación, se midió el poder antioxidante de cada uno de los extractos mediante las técnicas FRAP y DPPH. En estos estudios no se calculó la eficiencia anti-radical, sino que se comparó el porcentaje de inhibición de la absorbancia del radical DPPH porque se usaron iguales concentraciones y tiempos de lectura para todos los extractos (extractos diluidos 1:100 y lecturas a 30 s). Sobre la base de los resultados obtenidos, se seleccionaron tres extractos: CHT Ultrasonido 60°C 25 min, CTT Ultrasonido 60°C 50 min y CTT MeOH.

A continuación, se ensayaron dos tratamientos que podrían enriquecer el poder antioxidante de los extractos por la eliminación de compuestos orgánicos. Uno de ellos consistió en un prelavado del material vegetal (1 g) con hexano puro (5 ml) durante 60 minutos en ultrasonido y luego se evaporó el solvente residual en una campana de extracción. Posteriormente, se elaboraron los extractos seleccionados anteriormente a partir de 1 g de material seco en 12,5 ml de solvente. El otro tratamiento consistió en obtener los extractos seleccionados (a partir del material vegetal sin pretratamiento con hexano) y agregar posteriormente carbón activado (2% p/v). En todos los casos, se determinó el poder antioxidante de cada extracto mediante las técnicas FRAP y DPPH.

Debido a que el postratamiento con carbón activado eliminó gran parte del poder antioxidante

comparado con el de los controles, se realizaron otros dos procedimientos para tratar de mejorar la purificación de los antioxidantes. Uno consistió en modificar la concentración de carbón activado, ya que se encontró evidencia de que el uso de 1% p/v de carbón activado no causaba pérdida significativa de antioxidantes en otras especies vegetales (Arguello 2017). El otro procedimiento consistió en extraer los antioxidantes adsorbidos por el carbón activado de uno de los extractos seleccionados (CHT Ultrasonido 60°C 25 min). Para ello, luego del agregado de carbón activado 2% p/v, centrifugado de los extractos y descarte de los sobrenadantes, la fracción retenida por el carbón fue dividida en dos partes y se agregó en uno de los casos NaOH al 4% y en el otro buffer cítrico-citrato pH 5. A continuación se agitaron con vórtex, se dejaron descansar 30 minutos, fueron filtrados con tela de nylon de 20 μm de poro y guardados en freezer a -20°C. Los resultados de las pruebas con carbón activado al 1% p/v (no mostrados) no presentaron diferencias significativas con los tratamientos con 2% p/v, por lo cual los resultados que se muestran en la siguiente sección corresponden a estos últimos.

Por último, los extractos CHT Ultrasonido 60°C 25 min y CTT Ultrasonido 60°C 50 min fueron particionados con acetato de etilo para obtener dos fases: hidrofílica y lipofílica. El extracto metanólico no fue subfraccionado porque se obtuvo un poder antioxidante similar a los acuosos y es un solvente de alta toxicidad. El procedimiento consistió en colocar y agitar en ampolla de decantación 50 ml de cada extracto y 50 ml de acetato de etilo puro (Figura 35). La mezcla fue dejada en reposo durante 24 h para lograr una adecuada separación de las fases superior e inferior de cada extracto (CHT-Usup, CHT-Uinf, CTT-Usup y CTT-Uinf). Las fases inferiores (acuosas) fueron secadas en rotavapor a 80°C durante 2 h y las superiores (orgánicas) a 60°C durante 20 minutos. Los cuatro residuos secos obtenidos fueron resuspendidos en metanol ultrapuro y centrifugados hasta obtener un sobrenadante traslúcido con el fin de analizarlos posteriormente por HPLC.



Figura 35: Mezcla de extractos acuosos con acetato de etilo (izquierda), separación de fases en campana de decantación (medio) y secado de extracto en rotavapor (derecha).

4.2.5. Análisis de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Se analizó el perfil de fenoles del extracto de cáscara total fresca de piñón (CTFC) obtenido a partir de 2 g en 100 ml de agua a 100°C y el de los extractos obtenidos luego del fraccionamiento con acetato de etilo (CHT-Uinf, CHT-Usup, CTT-Uinf y CTT-Usup). Los extractos secados en un rotavapor y resuspendidos en metanol ultrapuro fueron filtrados a través de filtros de 0,22 µm antes de la inyección. El perfil fenólico fue determinado mediante un equipo HPLC (Agilent 1260, Quat Pump VL, ALS, TCC, DAD y RID). Se utilizó una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 X 100 mm; 3.5 µ, Agilent), con un flujo de 0,5 ml/min y volumen de inyección de 5 µl. La fase móvil estuvo compuesta de agua Milli-Q; ácido fosfórico al 85% y metanol, en gradiente. El detector de Arreglo de Diodos midió en cuatro señales, configuradas a 280 nm; 323 nm; 365 nm y 520 nm. Además, el espectro de absorción fue medido entre los 200 y 600 nm. El tiempo de corrida fue de 40 minutos, más 6 minutos de reequilibrio. Dos temperaturas diferentes de columna (25°C y 40°C) fueron utilizadas para alcanzar la separación cromatográfica.

Se emplearon los siguientes estándares para determinar el perfil químico de los extractos de cáscara de piñón: kuromanina, delfinidina, (-)-epicatequina, resveratrol, ácido elágico, ácido gálico, catequina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, rutina, ácido tánico y quercetina.

La identificación de los analitos estudiados fue realizada a través de la comparación de tiempos de retención y espectros de absorción a diferentes longitudes de onda con los estándares. Se empleó el método del estándar externo para la determinación cuantitativa. Para ello se prepararon las curvas de calibración en tres mezclas, en un rango de 0,05 a 200 mg/l. Se utilizó el rango de la curva superior o inferior según las áreas visualizadas en las muestras para cada compuesto. El software utilizado para el procesamiento de los datos fue openLAB Chem Station, de Agilent.

Para las curvas de calibración, cada estándar fue pesado y transvasado a frasco de vidrio ámbar de 50 ml y llevado a una concentración de 1 con metanol, excepto el ácido elágico en la que el polvo pesado fue disuelto con dimetilsulfóxido a una concentración de 5 g/l, y luego llevado a 1 g/l con metanol, para una mejor disolución.

Se prepararon tres mezclas de estándares, a una concentración de 0,2 g/l cada estándar, con la siguiente formación:

Mezcla 1: ácido gálico; ácido clorogénico; ácido ferúlico y ácido elágico

Mezcla 2: catequina; ácido cafeico; ácido p-cumárico; rutina y quercetina

Mezcla 3: delfinidina; epicatequina; kuromanina y resveratrol

Se realizaron diluciones sucesivas, las concentraciones de los puntos de la curva de calibración fueron: 200 mg/l; 100 mg/l; 50 mg/l; 25 mg/l; 10 mg/l; 5 mg/l; 1 mg/l; 0,1 mg/l y 0,05 mg/l. En el análisis se utilizó el rango de respuesta lineal de la curva de calibración, según las áreas visualizadas en las muestras para cada compuesto (Figuras 36, 37 y 38).

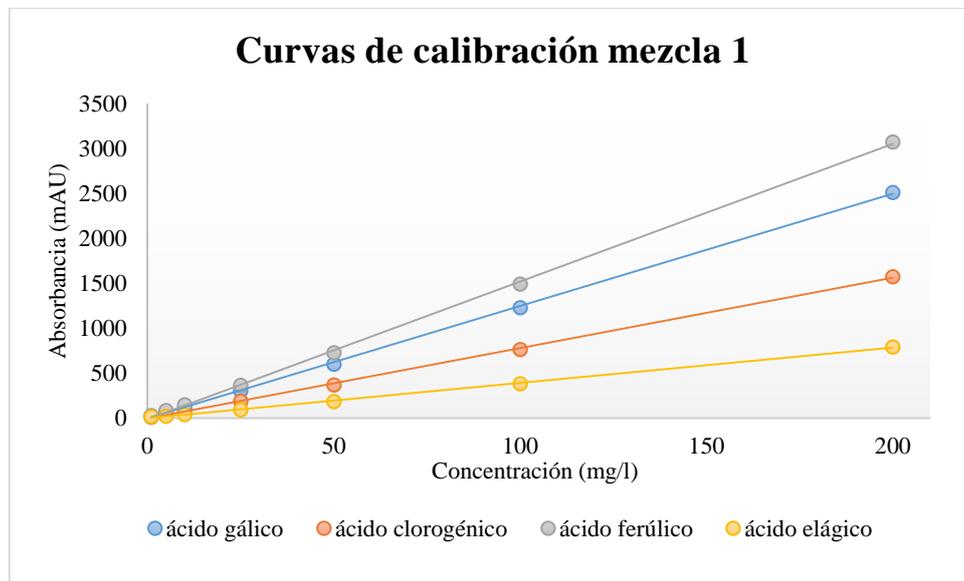


Figura 36: Curvas de calibración de la mezcla 1: ácido gálico; ácido clorogénico; ácido ferúlico y ácido elágico.

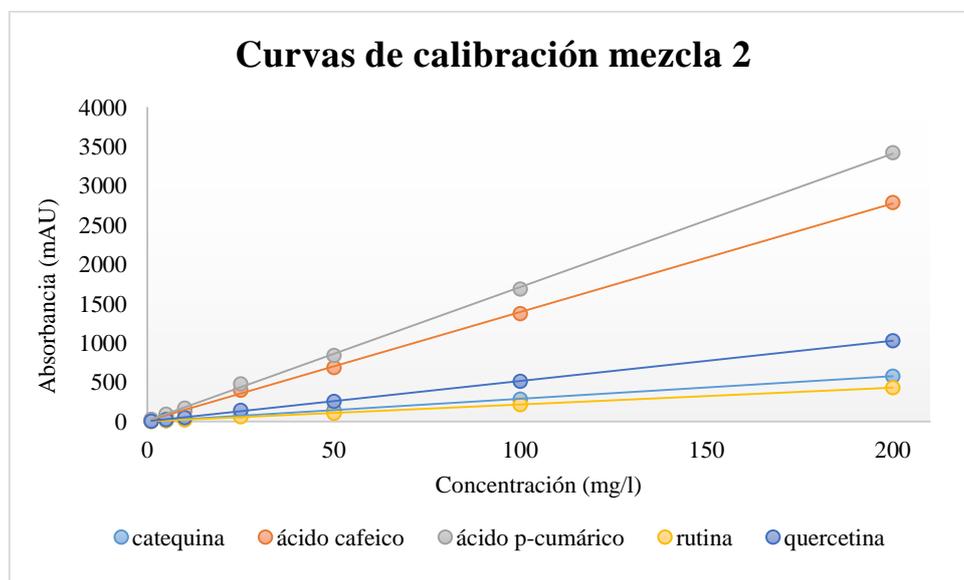


Figura 37: Curvas de calibración de la mezcla 2: catequina; ácido cafeico; ácido p-cumárico; rutina y quercetina.

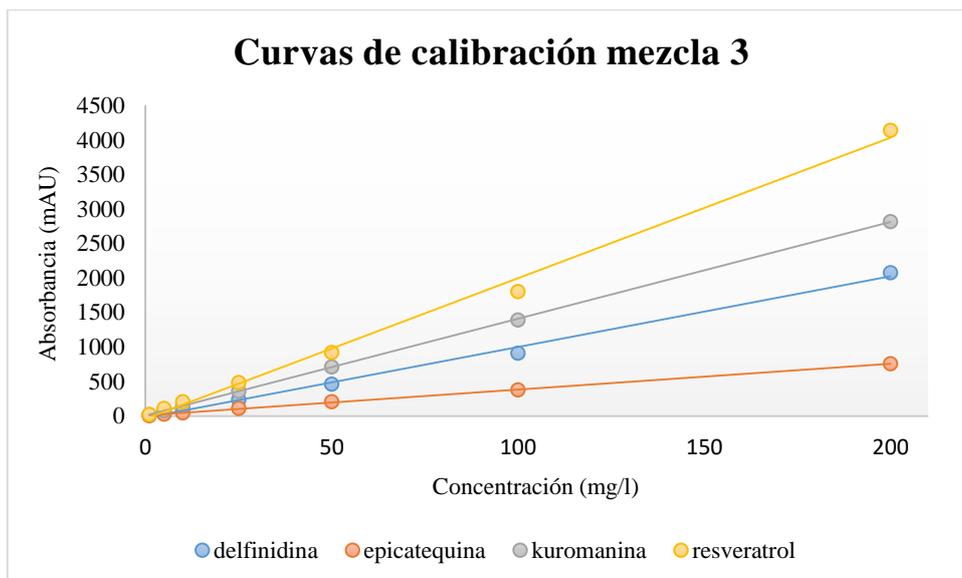


Figura 38: Curvas de calibración de la mezcla 3: delfinidina; epicatequina; kuromanina y resveratrol.

Además, cada compuesto fue analizado por separado, a una concentración de 0,5 g/l, para la determinación del tiempo de retención, visualización del espectro de absorción y el análisis de la respuesta cromatográfica a cada señal.

Para la detección de los analitos se definieron cuatro longitudes de onda, según las máximas absorbancias visualizadas en los espectros de absorción de cada uno y bibliografía consultada. El ácido gálico; catequina y epicatequina se determinaron a 280 nm (señal A), el ácido clorogénico; ácido ferúlico; ácido cafeico; ácido p-cumárico y resveratrol a 323 nm (señal B), ácido elágico; rutina y quercetina a 365 nm (señal C), delfinidina y kuromanina a 520 (señal D) (Figura 39).

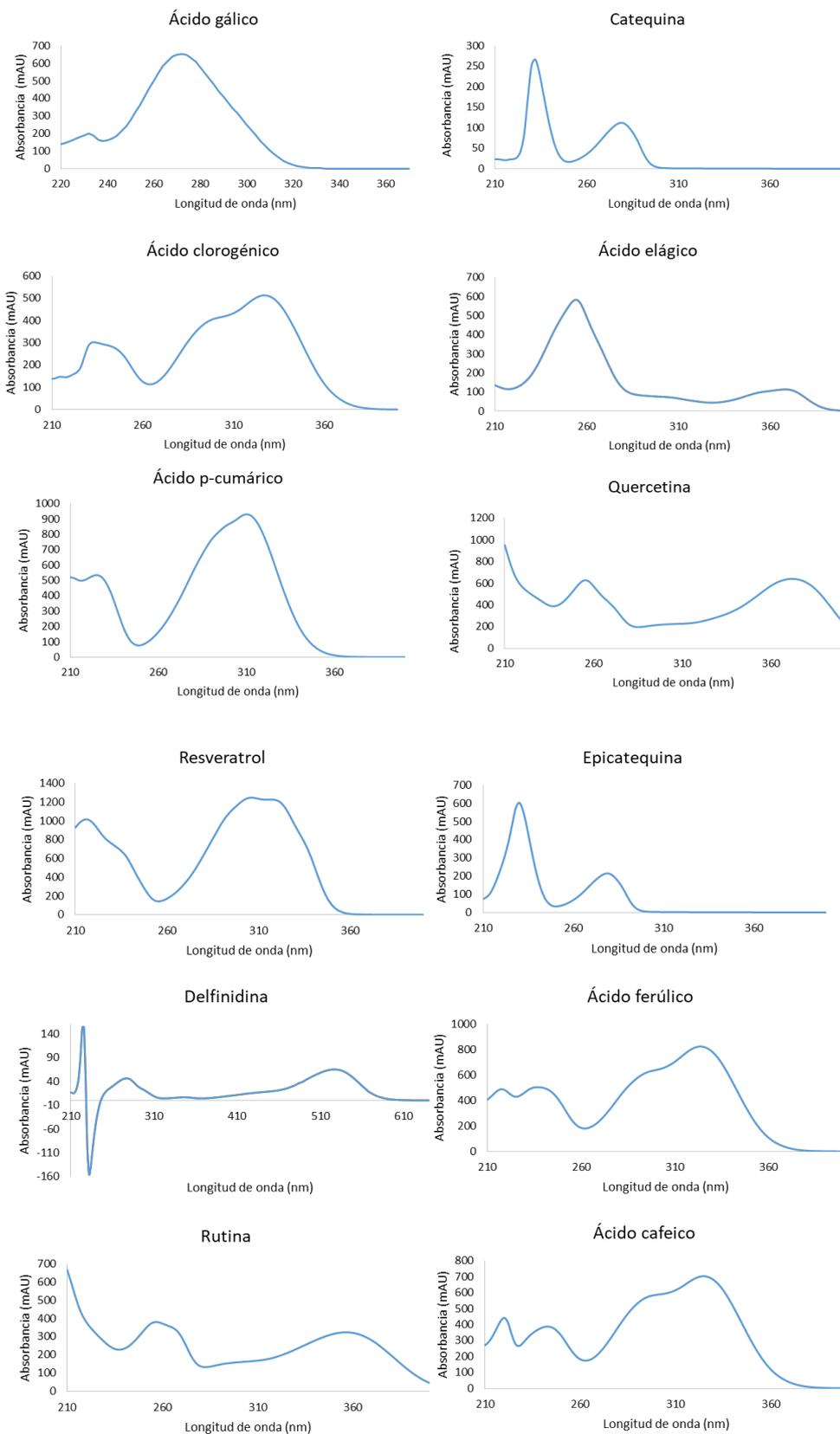


Figura 39: Curvas de absorción de los estándares utilizados.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Análisis de taninos totales

A partir de la curva de calibración con ácido gálico en el ensayo de Folin-Ciocalteu, se determinaron las concentraciones de los fenoles totales (CFT) y fenoles residuales (CFR), luego de la precipitación con ASB. De la diferencia de las CFT y CFR, se obtuvo la concentración de taninos (CT) del extracto de cáscara de piñón (CTFC). Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 14 y muestran que el contenido de taninos es alto, ya que representa más del 70% del contenido de fenoles de la cáscara. Resultados similares fueron encontrados en la cáscara de otras especies del género *Araucaria* (Koehnlein *et al.* 2012; da Silva *et al.* 2014). El contenido de taninos en esas especies ha demostrado ser el responsable de distintas propiedades, tales como la adsorción de metales pesados, la inhibición de la enzima α -amilasa salival y pancreática humana, y la inhibición de la absorción de triglicéridos a través de la inhibición de la lipasa pancreática (Lima *et al.* 2007; da Silva *et al.* 2014; Mota *et al.* 2014; Peralta *et al.* 2016). En este sentido, el estudio de los taninos, principalmente condensados, ha ganado gran interés debido al amplio crecimiento de la evidencia que asocia dichos compuestos con un amplio rango de beneficios potenciales para la salud y el medioambiente.

Tabla 14: Contenido de fenoles totales (CFT), fenoles residuales (CFR) y taninos totales (CT), y porcentaje de taninos de extracto obtenido con agua a 100°C a partir de cáscara total de piñón fresco (CTFC), expresados en μg equivalentes de ácido gálico (EAG).

Extracto	CFT (μg EAG/mg PS)	CFR (μg EAG/mg PS)	CT (μg EAG/mg PS)	Porcentaje de taninos (%)
CTFC	643,65 \pm 18	151,31 \pm 12	492,33 \pm 14	76,49

Cada valor corresponde a un promedio de tres mediciones \pm DE.

4.3.2. Composición elemental por EDXRF

Para ampliar la caracterización de los tejidos de piñón, incluido su valor nutricional, su composición elemental fue determinada por EDXRF (Tabla 15). La composición del endosperma (97% p/p de la pulpa comestible) fue similar a la descrita en los piñones brasileiros (Barbosa *et al.* 2019). En este sentido, una porción comestible de piñones (14 pulpas de piñones frescos) contienen elementos esenciales, como P, K, Mn, Fe, Cu y Zn, en concentraciones nutricionales superiores a la ración diaria recomendada, así como Rb. Por otro lado, la cáscara total del piñón fresco contiene concentraciones significativamente mayores de Ca y Fe comparada con la pulpa; y una concentración significativa de elementos como Cu, Zn, Mn y P

los cuales participan en los sistemas antioxidantes endógenos que han sido descritos en todos los organismos vivos (Sheng *et al.* 2014). Con respecto al Cr, la especiación no fue realizada para descartar la presencia de cromo hexavalente, considerado de alta toxicidad. Sin embargo, los estudios de citotoxicidad no la sugieren. Por otro lado, sólo el Cl y K disminuyeron significativamente después de la cocción. Por su parte, la composición elemental de la cáscara fina no presentó cambios significativos con los tratamientos, a excepción de la de piñones frescos que presenta valores significativos menores de Fe que la de los hervidos y tostados, y de la de los piñones tostados que presenta valores significativos mayores de Rb que la de los demás.

Estos resultados sugieren que los piñones aportan oligoelementos de valor nutricional y que la cáscara de piñón (fresca o cocida), además de su alto contenido de fenoles, también podría ser usada para la nutrición de animales ya que cubre los requerimientos minerales para el ganado vacuno (National Research Council 2000).

Tabla 15: Composición elemental de los tejidos de piñones frescos, hervidos o tostados analizados por EDXRF ($\mu\text{g/g}$)

	LD	RDR (%)	FRESCOS				HERVIDOS			TOSTADOS	
			EMB	END	CT	CF	CF	CG	CF	CG	
Na	152	2,7	4600 \pm 300	4100 \pm 300	4033 \pm 337	4800 \pm 600	4500 \pm 100	4000 \pm 300	6100 \pm 600	5000 \pm 400	
Mg	38	1,8	555 \pm 40	490 \pm 33	540 \pm 200	4000 \pm 300	3500 \pm 100	3300 \pm 300	4000 \pm 200	4200 \pm 100	
P	9	6,7	4000 \pm 100	2100 \pm 200	3000 \pm 200	4000 \pm 100	4500 \pm 100	3600 \pm 400	5100 \pm 200	3600 \pm 25	
S	1,3		1415 \pm 60	895 \pm 55	820 \pm 96	700 \pm 100	600 \pm 100	1700 \pm 100	700 \pm 100	1400 \pm 25	
Cl	8,6	1,6	3100 \pm 200	2800 \pm 200	2345 \pm 138	208 \pm 14	165 \pm 8	331 \pm 12	195 \pm 22	230 \pm 13	
K	61	4,6	13600 \pm 100	10700 \pm 1100	3680 \pm 218	235 \pm 16	265 \pm 30	265 \pm 24	260 \pm 25	145 \pm 18	
Ca	45	0,4	305 \pm 24	206 \pm 25	951 \pm 195	860 \pm 24	870 \pm 35	750 \pm 35	860 \pm 25	710 \pm 30	
Cr	1,7	0,0	ND	ND	15 \pm 3	12 \pm 5	15 \pm 3	14 \pm 5	11 \pm 4	8 \pm 2	
Mn	1,1	15,3	26 \pm 3	11 \pm 4	18 \pm 4	11 \pm 3	9 \pm 2	15 \pm 3	16 \pm 3	20 \pm 3	
Fe	0,3	8,3	99 \pm 2	22 \pm 4	67 \pm 6	37 \pm 3	42 \pm 3	47 \pm 8	45 \pm 4	45 \pm 6	
Cu	0,4	19,6	15 \pm 2	12 \pm 4	18 \pm 2	13 \pm 2	12 \pm 2	10 \pm 3	13 \pm 2	9 \pm 2	
Zn	0,2	7,1	54 \pm 4	14 \pm 2	16 \pm 3	8 \pm 1	8 \pm 1	16 \pm 1	8 \pm 2	9 \pm 2	
Br	0,3		6 \pm 1	4 \pm 1	4 \pm 1	ND	ND	ND	3 \pm 1	3 \pm 1	
Rb	0,2	138	47 \pm 3	35 \pm 4	19 \pm 2	4 \pm 2	7 \pm 0	9 \pm 2	22 \pm 3	11 \pm 2	
Sr	0,5		3 \pm 1	3 \pm 1	14 \pm 3	11 \pm 4	16 \pm 1	16 \pm 5	13 \pm 2	13 \pm 1	

Los valores representan el promedio \pm DE de la concentración de elementos en $\mu\text{g/g}$ de tejido seco. LD: Límite de Detección. % RDR: corresponde al porcentaje de elemento aportado por una porción de pulpa (calculado con datos de endosperma, 97% p/p de parte comestible) respecto a las raciones diaria recomendadas. La porción de 25 g (14 piñones) es en estado húmedo, con 16% de humedad. EMB: embrión de piñones frescos; END: endosperma de piñones frescos; CT: cáscara total; CF: cáscara fina; CG: cáscara gruesa. Los números en negrita indican diferencias significativas en el contenido de cada elemento con respecto al endosperma (n=3, p<0,05). ND: no detectado.

4.3.3. Purificación y poder antioxidante de cada fracción

La purificación de los antioxidantes de las cáscaras CHT (cáscara total hervidos en agua a 100°C) y CTT (cáscara total tostados) fue realizada en varias etapas, según el criterio de utilización de métodos de extracción amigables con el medioambiente y de acuerdo con su posible uso como nutraceutico. En una primera etapa se compararon los métodos de extracción por maceración en agua a 100°C y en metanol. También se realizaron extracciones asistidas por ultrasonido (U) a diferentes temperaturas y tiempos y por microondas (M) a diferentes potencias y tiempos. Para cada extracto se analizó el poder antioxidante evaluado con dos técnicas (FRAP y DPPH) y se seleccionaron aquellos que presentaron valores altos en ambas determinaciones. En cuanto a los extractos de cáscaras de piñones hervidos, los resultados de la técnica de FRAP resumidos en la Figura 40, muestran que el extracto acuoso en ultrasonido a 60°C durante 25 minutos fue el que tuvo un valor significativamente mayor de poder antioxidante (68,06 µg EAA/mg PS). Este valor no presentó diferencias significativas con el obtenido en el extracto CT100 (cáscara de piñones hervidos a 100°C macerado toda la noche). Sin embargo, el uso de ultrasonido en la extracción puede considerarse un método más eficiente ya que se obtiene similar poder antioxidante en un tiempo menor (25 minutos). Por otra parte, según se observa en la Figura 40, los extractos que le siguen en capacidad antioxidante son: el obtenido en microondas a 320W durante 50 segundos y el de ultrasonido a 60°C durante 50 minutos, que no mostraron diferencias significativas entre ellos, con valores de 47,16 y 43,22 µg EAA/mg PS, respectivamente.

Con respecto a los resultados de poder antioxidante evaluado con la técnica de DPPH (Figura 41), los extractos con valores significativamente mayores de inhibición del radical fueron aquellos elaborados con ultrasonido por 25 minutos a 60°C y TA, con valores de 50,98 y 52,3 %, respectivamente. No se hallaron diferencias significativas entre estos extractos, pero sí con los demás tipos de tratamientos.

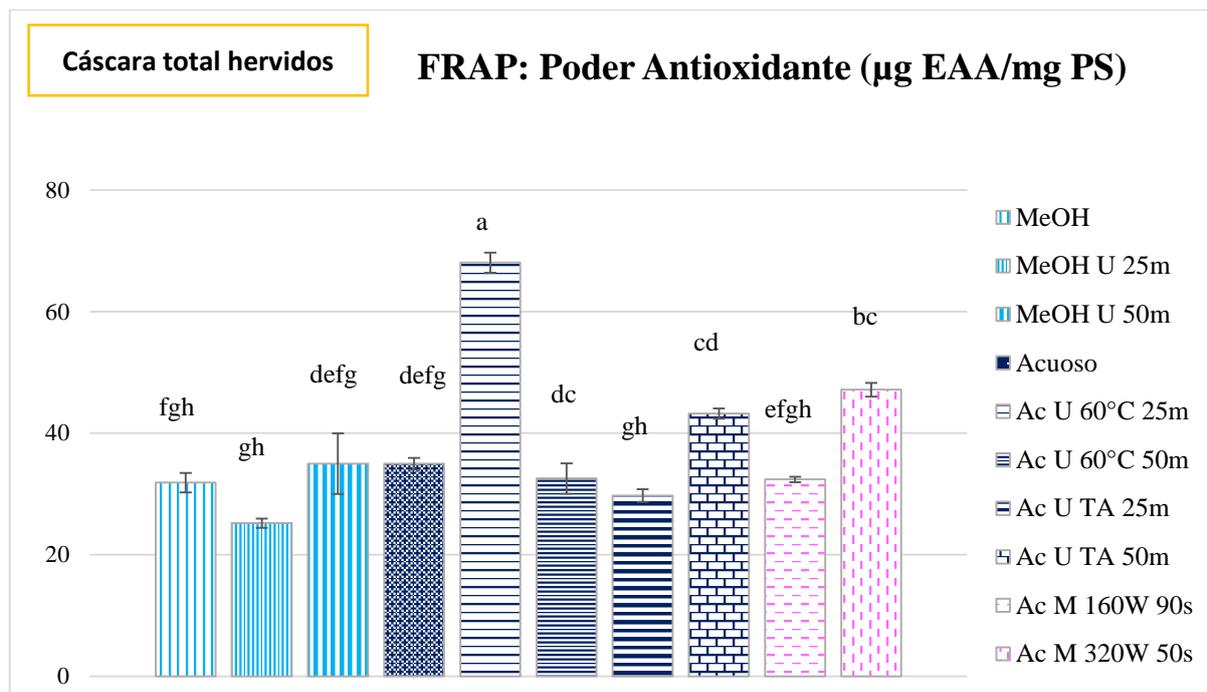


Figura 40: Poder antioxidante medido con la técnica de FRAP de extractos de cáscara total de piñones hervidos. Tratamientos: MeOH: extractos metanólicos, Ac: extractos acuosos, U: ultrasonido, M: microondas. Temperatura de extracción: 60°C y temperatura ambiente (TA). Tiempo de extracción: 25 y 50 minutos (25m y 50m), 90 y 50 segundos (90s y 50s). Potencia de microondas: 160 y 320 watts (160W y 320W). Los valores representan el promedio \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en $\mu\text{g EAA/mg PS}$: equivalentes de ácido ascórbico por mg de peso seco. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

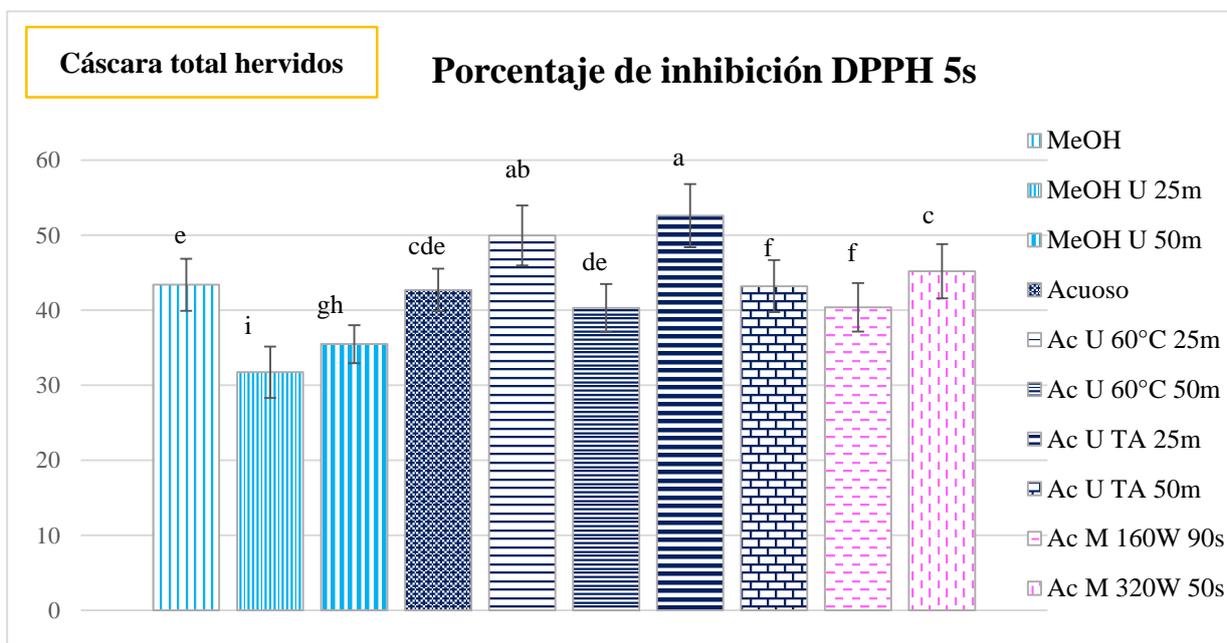


Figura 41: Poder antioxidante medido con la técnica de DPPH de extractos de cáscara total de piñones hervidos. Tratamientos: MeOH: extractos metanólicos, Ac: extractos acuosos, U: ultrasonido, M: microondas. Temperatura de extracción: 60°C y temperatura ambiente (TA). Tiempo de extracción: 25 y 50 minutos (25m y 50m), 90 y 50 segundos (90s y 50s). Potencia de microondas: 160 y 320 watts (160W y 320W). Los valores representan el promedio \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en porcentaje de inhibición del radical a los 5 segundos de extractos diluidos 1:10. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Al analizar los resultados de los extractos de cáscara total de piñones tostados evaluados con la técnica de FRAP (Figura 42), los extractos: metanólico, metanólico con 50 minutos de ultrasonido, acuoso y acuoso con 50 minutos de ultrasonido a 60°C, presentaron los valores mayores, sin diferencias significativas entre sí. El poder antioxidante determinado con la técnica de DPPH (Figura 43) reveló que el extracto metanólico tuvo mayor porcentaje de inhibición y lo siguieron los extractos acuosos sometidos durante 25 y 50 minutos a ultrasonido a 60°C, y el extracto metanólico en ultrasonido a TA durante 25 minutos, sin diferencias significativas entre ellos.

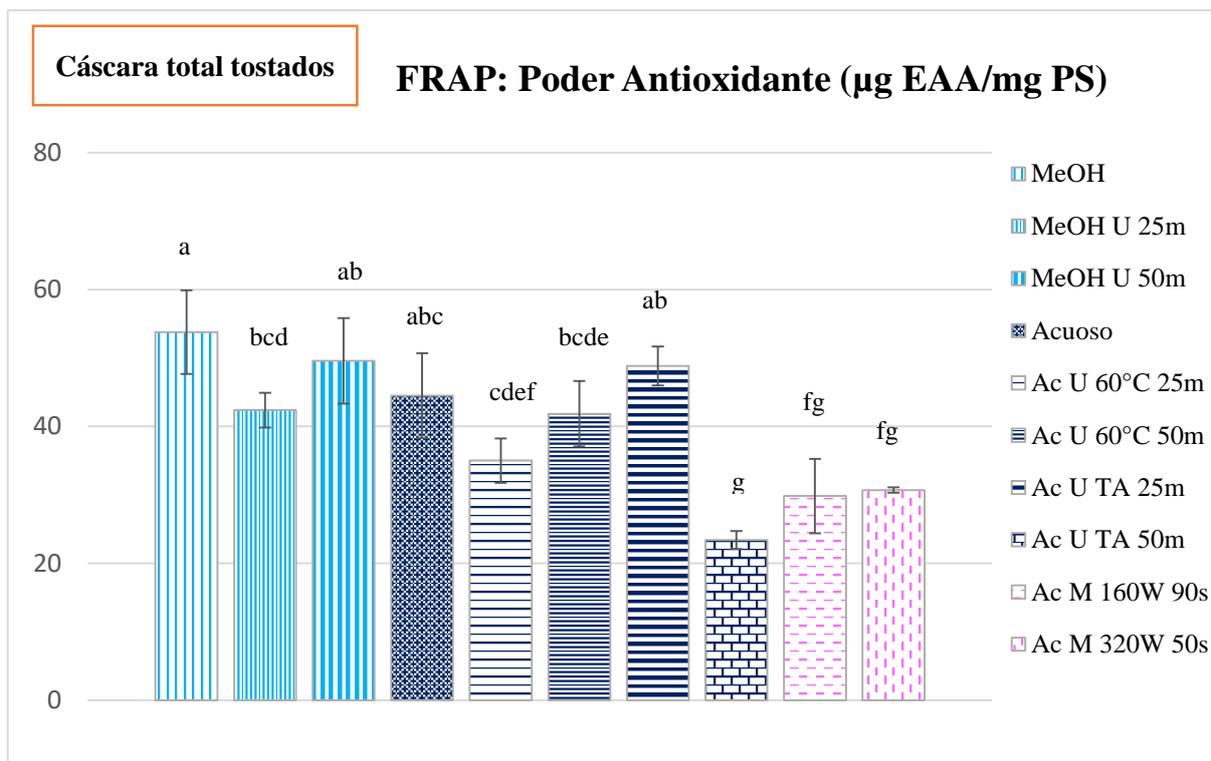


Figura 42: Poder antioxidante medido con la técnica de FRAP de extractos de cáscara total de piñones tostados. Tratamientos: MeOH: extractos metanólicos, Ac: extractos acuosos, U: ultrasonido, M: microondas. Temperatura de extracción: 60°C y temperatura ambiente (TA). Tiempo de extracción: 25 y 50 minutos (25m y 50m), 90 y 50 segundos (90s y 50s). Potencia de microondas: 160 y 320 watts (160W y 320W). Los valores representan el promedio \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en $\mu\text{g EAA/mg PS}$: equivalentes de ácido ascórbico por mg de peso seco. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

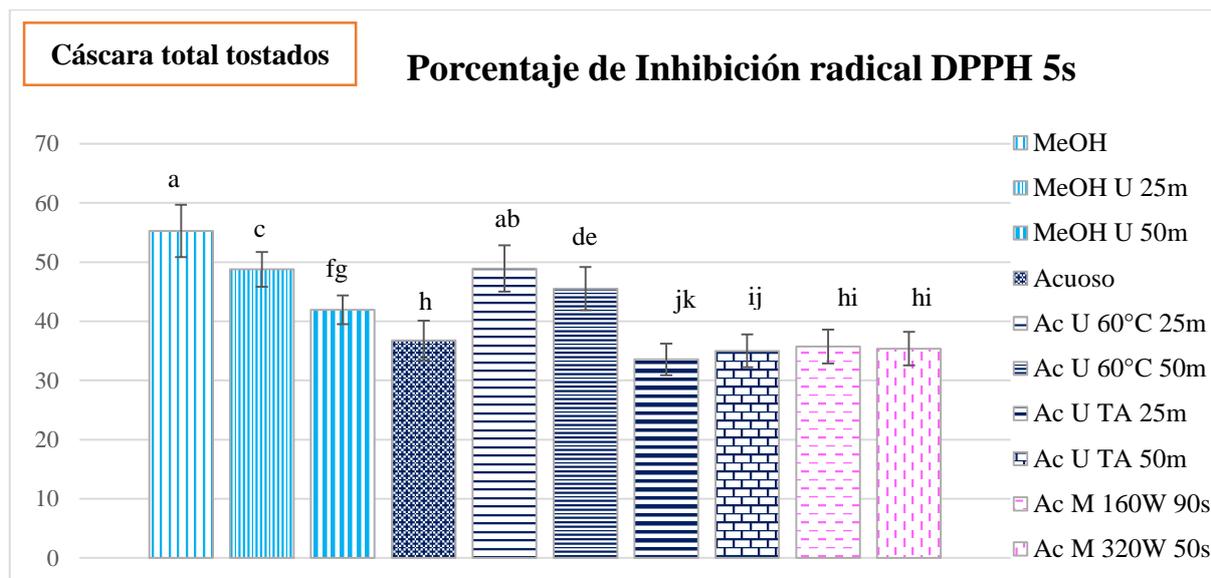


Figura 43: Poder antioxidante medido con la técnica de DPPH de extractos de cáscara total de piñones tostados. Tratamientos: MeOH: extractos metanólicos, Ac: extractos acuosos, U: ultrasonido, M: microondas. Temperatura de extracción: 60°C y temperatura ambiente (TA). Tiempo de extracción: 25 y 50 minutos (25m y 50m), 90 y 50 segundos (90s y 50s). Potencia de microondas: 160 y 320 watts (160W y 320W). Los valores representan el promedio \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en porcentaje de inhibición del radical a los 5 segundos de extractos diluidos 1:10. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

En la Tabla 16 se presentan los valores de poder antioxidante evaluados por la técnica FRAP y en la Tabla 17 los correspondientes a la técnica de DPPH, obtenidos tanto para los extractos de cáscaras de piñones tostados como hervidos, a fin de compararlos entre sí. Sobre la base de dichos resultados, se seleccionaron tres extractos con alto poder antioxidante para continuar con la purificación y elección de la fracción más activa. Los extractos, CHT U 60°C 25 min, CTT U 60°C 50 min y CTT MeOH fueron seleccionados ya que presentaron valores significativamente mayores de poder antioxidante con ambas técnicas realizadas.

Tabla 16: Poder antioxidante evaluado con la técnica de FRAP de extractos de cáscara de piñones tostados y hervidos bajo distintos tratamientos de extracción

Cáscara	Tratamiento	Medias	
CHT	Ac U 60°C 25´	68,06	a
CTT	MeOH	53,81	b
CHT	Ac M 320W 50´´	47,16	bc
CTT	Ac U TA 25´	48,85	bc
CTT	MeOH U TA 50´	49,58	bc
CTT	Acuoso	44,51	bcd
CHT	Ac U 60°C 50´	43,22	cd
CTT	MeOH U TA 25´	42,38	cde
CTT	Ac U 60°C 50´	41,85	cdef
CHT	Acuoso	34,96	defg
CHT	MeOH U TA 50´	34,99	defg
CTT	Ac U 60°C 25´	35,01	defg
CHT	Ac M 160W 90´´	32,38	efgh
CHT	Ac U TA 50´	32,54	efgh
CHT	MeOH	31,87	fgh
CHT	MeOH U TA 25´	25,18	gh
CHT	Ac U TA 25´	29,72	gh
CTT	Ac M 160W 90´´	29,84	gh
CTT	Ac M 320W 50´´	30,71	gh
CTT	Ac U TA 50´	23,41	h

Valores expresados en μg EAA/mg PS: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco. Los valores representan el promedio de dos determinaciones realizadas por duplicado. CTT: cáscara total de piñones tostados. CHT: cáscara total de piñones hervidos. Tratamientos: MeOH: extractos metanólicos, Ac: extractos acuosos, U: ultrasonido, M: microondas. Temperatura de extracción: 60°C y temperatura ambiente (TA). Tiempo de extracción: 25 y 50 minutos (25m y 50m), 90 y 50 segundos (90s y 50s). Potencia de microondas: 160 y 320 watts (160W y 320W). Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Tabla 17: Poder antioxidante evaluado con la técnica de DPPH de extractos de cáscara de piñones tostados y hervidos bajo distintos tratamientos de extracción

Cáscara	Tratamiento	Medias	
CTT	MeOH	54,13	a
CHT	Ac U TA 25´	52,3	ab
CTT	Ac U 60°C 25´	49,47	abc
CHT	Ac U 60°C 25´	50,98	abc
CTT	MeOH U TA 25´	47,39	d
CHT	Ac M 320W 50´´	45,11	e
CTT	Ac U 60°C 50´	44,76	ef
CHT	Acuoso	43,35	efg
CHT	Ac U 60°C 50´	43,11	fg
CHT	MeOH	42,71	g
CTT	MeOH U TA 50´	41,97	gh
CHT	Ac U TA 50´	40,65	h
CHT	Ac M 160W 90´´	40,71	h
CTT	Acuoso	37,39	i
CTT	Ac M 320W 50´´	35,79	ij
CTT	Ac M 160W 90´´	35,87	ij
CTT	Ac U TA 50´	34,5	jk
CHT	MeOH U TA 50´	34,74	jk
CTT	Ac U TA 25´	33,28	kl
CHT	MeOH U TA 25´	32,37	l

Valores expresados en porcentaje de inhibición del radical DPPH a los 30 segundos de extractos diluidos 1:10. Los valores representan el promedio de dos determinaciones realizadas por duplicado. CTT: cáscara total de piñones tostados. CHT: cáscara total de piñones hervidos. Tratamientos: MeOH: extractos metanólicos, Ac: extractos acuosos, U: ultrasonido, M: microondas. Temperatura de extracción: 60°C y temperatura ambiente (TA). Tiempo de extracción: 25 y 50 minutos (25m y 50m), 90 y 50 segundos (90s y 50s). Potencia de microondas: 160 y 320 watts (160W y 320W). Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Posteriormente, se continuó la purificación de los extractos seleccionados con la aplicación de dos tratamientos para eliminar compuestos orgánicos que podrían disminuir o diluir el poder antioxidante y se evaluó mediante la técnica de FRAP y DPPH si los tratamientos mejoraban el poder antioxidante de los extractos.

Uno de los tratamientos consistió en el uso de hexano como solvente para extraer compuestos no polares, aplicado como pretratamiento sobre el material vegetal. Este solvente es utilizado en la industria ya que es estable, presenta un alto poder solubilizante y un conveniente punto de ebullición que facilita su recuperación (Sicaire *et al.* 2015).

Por otro lado, se agregó carbón activado, un método empleado comúnmente para eliminar clorofilas y otros pigmentos de los extractos vegetales que pueden aumentar o disminuir la determinación espectrofotométrica de los antioxidantes y así alterar el resultado de la medición (Boqué 2005). El carbón activado se trata de un carbón poroso que atrapa compuestos, normalmente orgánicos, que se encuentran en un líquido. Es un sólido adsorbente ya que tiene la capacidad de adherir moléculas en su superficie y mantenerlas químicamente intactas. Este proceso es reversible, lo que implica que el compuesto adsorbido puede recuperarse y también regenerar el carbón activado. El carbón activado es una de las sustancias aptas para adsorber moléculas orgánicas que presentan uniones covalentes entre los átomos de carbono e hidrógeno. Se recomienda usar en un porcentaje menor al 2% para remover pigmentos pero no compuestos fenólicos (Gomez Rubio 2020). En este sentido, se evaluó sobre los extractos seleccionados si el tratamiento con carbón activado elimina los pigmentos de los extractos, sin alterar el contenido de antioxidantes.

Los resultados del ensayo de FRAP de los tres extractos bajo el pretratamiento con hexano o el postratamiento con carbón activado se pueden visualizar en la Figura 44. Se puede observar que no se encontraron diferencias significativas en el contenido de antioxidantes entre el extracto control y el extracto obtenido luego del prelavado con hexano para los extractos CTT U 60° 50min y CTT MeOH. Sin embargo, el extracto de cáscara hervida (CHT U 60° 25m) presenta un menor valor con respecto a su correspondiente control (17% de disminución). Por otra parte, los tres extractos bajo el tratamiento con carbón activado presentaron valores significativamente menores y casi nulos de poder antioxidante, lo que demuestra que bajo estas condiciones el carbón activado extrae todas las moléculas de antioxidantes presentes en los extractos.

Resultados similares fueron hallados con la técnica de DPPH (Figura 45). En este caso, también el extracto elaborado con cáscara hervida presentó diferencias significativas entre el control y el extracto con pretratamiento con hexano, mientras que los otros extractos no presentaron diferencias significativas con su respectivo control. La técnica de DPPH también detectó bajos contenidos de antioxidantes en aquellos extractos con el postratamiento con carbón activado.

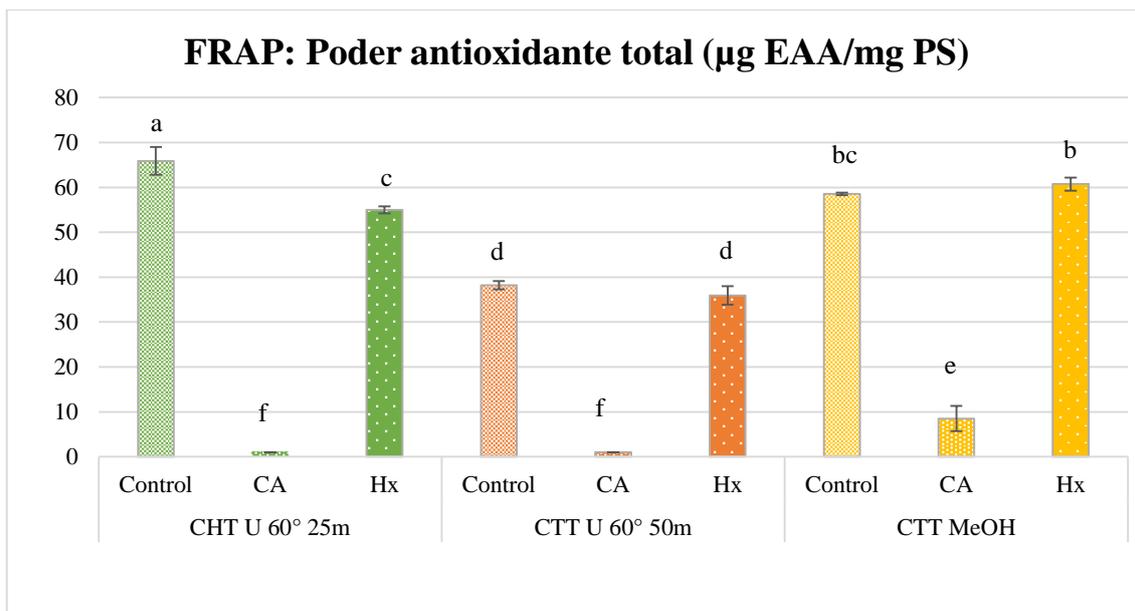


Figura 44: Poder antioxidante evaluado con la técnica de FRAP para los tres extractos elegidos bajo un pretratamiento con hexano (Hx) o un postratamiento con carbón activado (CA) y sus controles respectivos. CHT U 60°C 25m: extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min; CTT U 60°C 50m: extracto de cáscara de piñones tostados obtenido con ultrasonido a 60°C durante 50 min; CTT MeOH: Extracto metanólico de cáscara de piñones tostados. Valores expresados en $\mu\text{g EAA/mg PS}$: equivalentes ácido ascórbico por mg de peso seco. Los valores representan el promedio \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

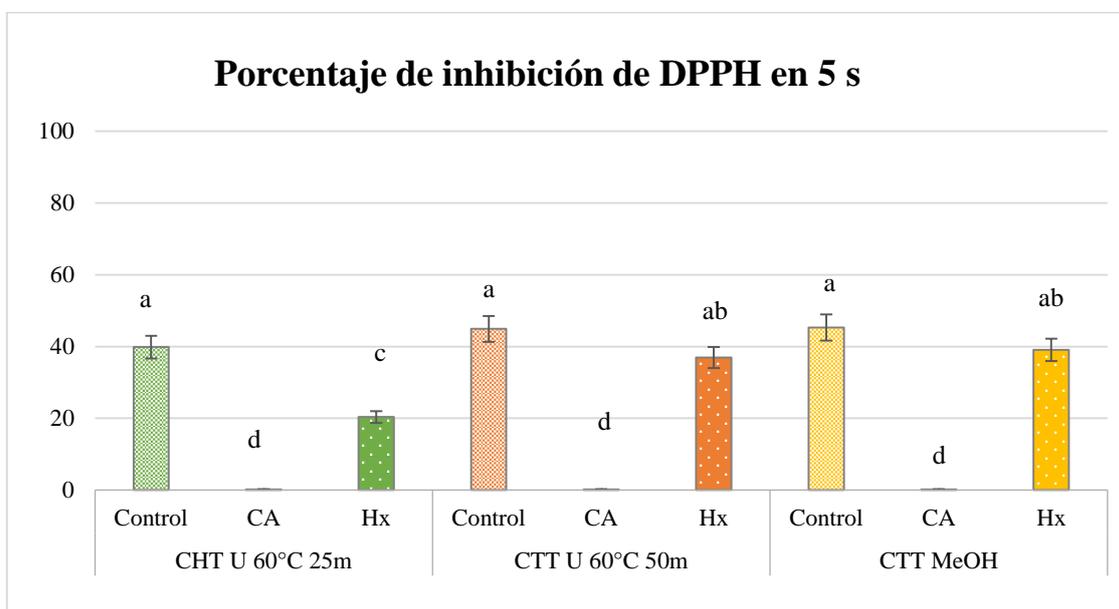


Figura 45: Poder antioxidante evaluado con la técnica de DPPH para los tres extractos elegidos bajo un pretratamiento con hexano (Hx) o un postratamiento con carbón activado (CA) y sus controles respectivos (1:1). CHT U 60°C 25m: extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min; CTT U 60°C 50m: extracto de cáscara de piñones tostados obtenido con ultrasonido a 60°C durante 50 min; CTT MeOH: Extracto metanólico de cáscara de piñones tostados. Valores expresados en porcentaje de inhibición del radical a los 5 s. Los valores representan el promedio \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Por otra parte, los tratamientos posteriores realizados a fin de extraer los antioxidantes del carbón activado agregado a cada extracto (NaOH y buffer acetato de sodio) no resultaron eficientes, ya que los valores de poder antioxidante medidos por FRAP fueron bajos (menores a 3 µg EAA/mg PS).

En vista de estos resultados, y para continuar con la purificación de los extractos, se decidió no aplicar dichos pre- o postratamientos a los extractos, ya que requieren tiempo y el uso de reactivos y por otra parte no incrementan o mejoran el contenido de antioxidantes de las muestras.

El siguiente método ensayado con el fin de purificar los extractos seleccionados por su poder antioxidante y bajo impacto ambiental (acuosos), fue una partición con acetato de etilo para obtener dos fases: hidrofílica y lipofílica. El pequeño aumento del poder extractivo del metanol frente al agua a 100°C asistida por ultrasonido no justificó el uso del extracto obtenido con este solvente tóxico en los ensayos de partición. El acetato de etilo es un co-solvente con propiedades polares apróticas, que tiene la capacidad de formar una capa fuerte de solvatación alrededor de un catión sin formar puentes de hidrogeno. En numerosos estudios, esa característica ha justificado el alto contenido de antioxidantes, y dentro de ellos, los polifenoles, flavonoides, antocianinas y taninos hallados en los extractos vegetales elaborados a partir de particiones de acetato de etilo (Singh *et al.* 2007; Phang *et al.* 2011; Athmouni *et al.* 2015; Hazizul Hasan 2019).

De cada uno de los extractos acuosos seleccionados (CHT Ultrasonido 60°C 25 min o CTT Ultrasonido 60°C 50 min) se obtuvieron dos fases: una inferior hidrofílica con un color más oscuro (CHT-Uinf, CTT-Uinf), y una fase superior lipofílica, con coloración más clara (CHT-Usup, CTT-Usup). Posteriormente, se analizó el poder antioxidante mediante las técnicas de FRAP y DPPH de estos cuatro extractos obtenidos por fraccionamiento, secados en rotavapor y resuspendidos en metanol. La identificación de los fenoles mayoritarios presentes en cada uno se realizó por HPLC.

La Figura 46 representa el poder antioxidante en µg EAA/mg de peso seco de cada uno de los extractos obtenidos por fraccionamiento con acetato de etilo. Se observa que los extractos CTT-Usup y CHT-Uinf presentaron valores significativamente mayores de capacidad antioxidante respecto de las demás fases, sin diferencias significativas entre sí. La comparación de dichos resultados con los obtenidos a partir de los extractos sin fraccionar, evidencia que el fraccionamiento mejora la capacidad antioxidante de ambos extractos. En el caso del extracto CHT Ultrasonido 60°C 25 min (65,9 µg EAA/mg PS) cuando se lo particionó se obtuvo mayor poder antioxidante en la fase acuosa (160 µg EAA/mg PS) mientras que disminuyó en la fase

orgánica (56,4 μg EAA/mg PS). En el caso del extracto CTT Ultrasonido 60°C 50 min (38,2 μg EAA/mg PS) se obtuvo mayor poder antioxidante tanto en la fase acuosa como en la orgánica (100,7 y 180 μg EAA/mg PS, respectivamente). Es importante destacar que el acetato de etilo aumentó aproximadamente 250% el contenido de antioxidantes de la fase acuosa tanto del extracto de cáscara hervida como el de tostada.

Con respecto al análisis del poder antioxidante mediante la técnica de DPPH, las lecturas fueron realizadas a 5 segundos debido al alto poder antioxidante de estas muestras. Los mayores porcentajes de inhibición del radical se encontraron en los extractos de las fases inferiores acuosas (CHT-Uinf y CTT-Uinf), sin observarse diferencias significativas entre los valores de ambas (Figura 47). Cuando se comparan los resultados del fraccionamiento con los extractos originales, ambas fases inferiores tuvieron cerca de un 40% de inhibición del radical en una concentración 1:100, mientras que los extractos originales a partir de CHT y CTT en una concentración de 1:10 tuvieron un porcentaje de inhibición del 50 y 45 % respectivamente (Figuras 43 y 45). Esto evidencia que el fraccionamiento con acetato de etilo aumentó significativamente el poder antioxidante de la fase acuosa, con respecto a la primera extracción con agua.

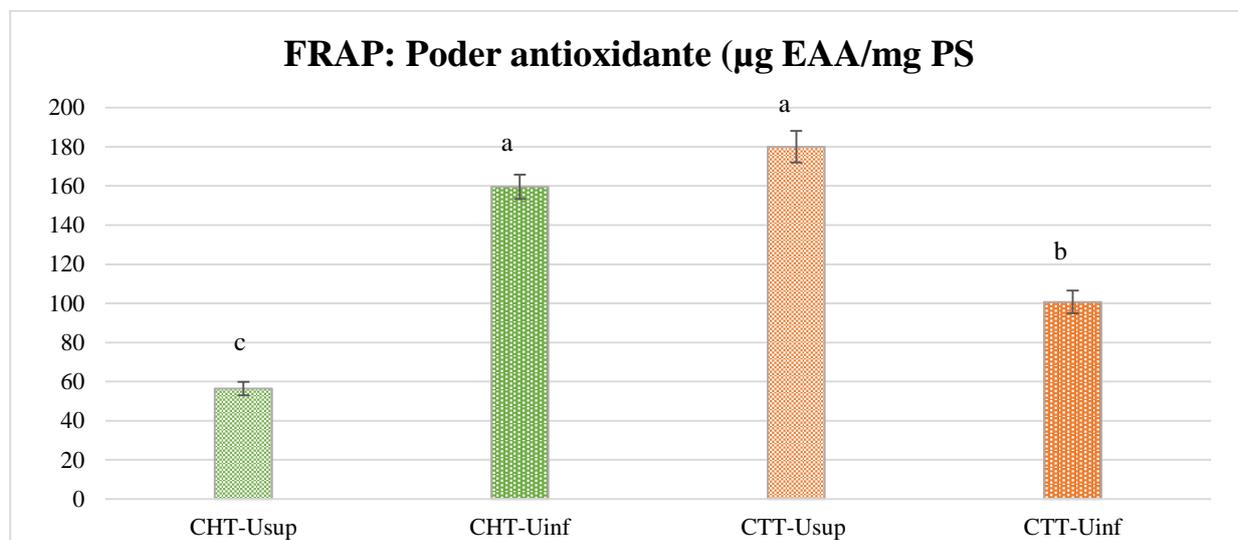


Figura 46: Poder antioxidante evaluado con la técnica de FRAP para fases obtenidas por fraccionamiento con acetato de etilo de extractos de cáscara de piñón.

CHT-USup y CHT-Uinf: fase superior e inferior derivadas del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C por 25 min; CTT-USup y CTT-Uinf: fase superior e inferior del extracto de cáscara de piñones tostados obtenido con ultrasonido a 60°C por 50 min. Los valores representan el promedio \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Valores expresados en μg equivalentes de ácido ascórbico por mg de peso seco (EAA/mg PS). Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

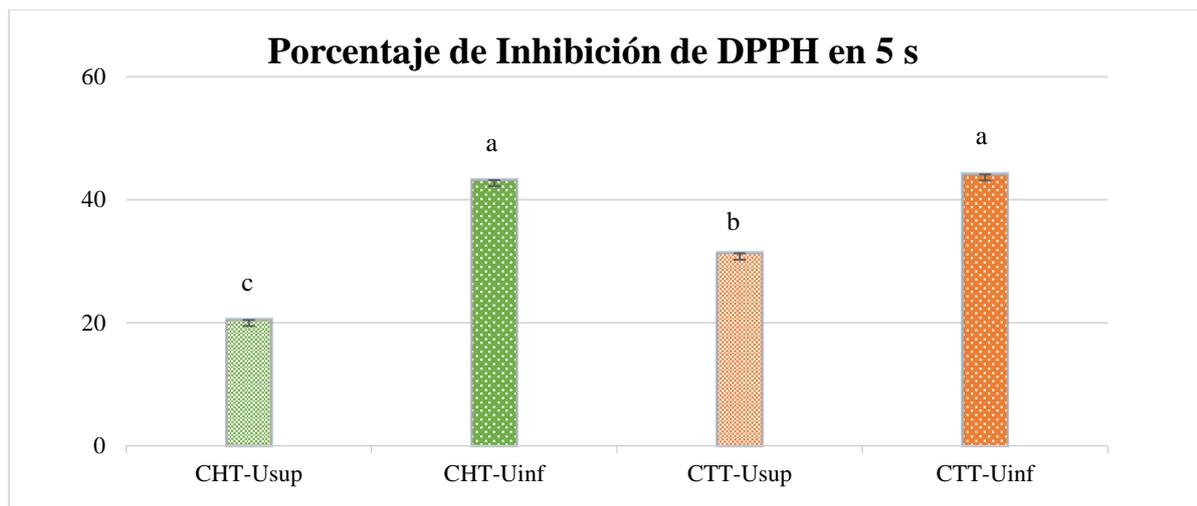


Figura 47: Poder antioxidante evaluado con la técnica de DPPH para fases obtenidas por fraccionamiento con acetato de etilo de extractos de cáscara de piñón.

CHT-USup y CHT-Uinf: fase superior e inferior derivadas del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C por 25 min; CTT-USup y CTT-Uinf: fase superior e inferior del extracto de cáscara de piñones tostados obtenido con ultrasonido a 60°C por 50 min. Valores expresados en porcentaje de inhibición del radical a los 5 segundos de los extractos diluidos en agua 1:100. Los valores representan el promedio \pm DE de dos determinaciones realizadas por duplicado. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

4.3.4. Composición de polifenoles analizados por HPLC

Con respecto al análisis de los compuestos fenólicos, todas las curvas de calibración presentaron un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0.998. En cuanto a las muestras, todos los extractos de cáscara de piñón evaluados (CTFC, CHT-USup, CHT-Uinf, CTT-USup y CTT-Uinf) presentaron 3 compuestos fenólicos en común: ácido gálico, catequina y quercetina; dentro de los cuales se destaca la catequina como mayoritario (Tabla 18). Además, se observó que las fracciones superiores (acetato de etilo) contenían mayor concentración de estos compuestos, comparados con las fracciones inferiores. Estos compuestos también han sido identificados como los fenoles más importantes en extractos de cáscaras de *A. angustifolia* (Peralta *et al.* 2016). Con respecto al extracto obtenido a partir de cáscara total de piñones frescos a 100°C (CTFC), presentó concentraciones menores de ácido gálico, catequina y quercetina que los observados en las fracciones superiores resultantes de la partición de los extractos obtenidos con ultrasonido. Además, en este extracto la concentración de catequina fue menor a la encontrada en los extractos obtenidos con ultrasonido, lo que podría indicar que la extracción de este flavonoide sería la más beneficiada por dicho tratamiento, que posteriormente fue particionada hacia la fase orgánica. El contenido de catequina (2,86 mg/g en CTFC, Tabla 18) resultó similar a los valores obtenidos por De Freitas *et al.* (2018b) y Da Silva *et al.* (2019) en el agua del hervor de piñones de *A. angustifolia*, en la que el contenido

de catequina reportado en esos estudios fue de 2,06 mg/g y 2,38 mg/g, respectivamente. Por otro lado, los valores de catequina observados en todos los extractos de cáscara de piñón resultan elevados cuando fueron comparados con alimentos considerados ricos en estos polifenoles, como son el té verde (0,1-0,8 mg/g), el té negro (0,06-0,5 mg/g), las lentejas (0,316-1,04 mg/g) y la manzana (0,17-0,5 mg/g) (Santos-Buelga y Scalbert 2000; Shukla *et al.* 2018).

Tabla 18: Concentración de polifenoles en muestras de cáscara de piñón analizadas por HPLC

Analito (mg/g PS = µg/mg)	Extractos				
	CHT-Usup	CHT-Uinf	CTT-Usup	CTT-Uinf	CTFC
Ácido Gálico	7,0122 (b)	0,3982 (d)	28,2169 (a)	0,7146 (cd)	1,7712 (c)
Catequina	13,6456 (b)	0,6046 (d)	44,5362 (a)	1,8481 (c)	2,8646 (c)
Quercetina	1,8253 (bc)	0,0063 (d)	11,3094 (a)	0,0269 (d)	3,1115 (b)

CHT-Usup y CHT-Uinf: fase superior e inferior derivadas del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C por 25 min. CTT-Usup y CTT-Uinf: fase superior e inferior derivadas del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones tostados obtenido con ultrasonido a 60°C por 50 min. CTFC: Extracto obtenido con agua a 100°C a partir de cáscaras de piñones frescos. Letras distintas indican diferencias significativas entre extractos para cada compuesto (Tukey, n=2, p<0,05).

Por otro lado, el contenido de quercetina hallado (3,11 mg/g, Tabla 18) también resultó alto, comparado con lo encontrado en otras especies del género *Araucaria*. Por ejemplo, en el agua del hervor de piñones de *A. angustifolia* no fue detectada (De Freitas *et al.* 2018b), y en extractos acuosos elaborados a partir de cáscara de esos piñones se han detectado bajas concentraciones de quercetina tanto en la cáscara externa como en la interna (0,057 y 0,011 mg/g peso fresco, respectivamente) (Cordenunsi *et al.* 2004).

Por lo tanto, la extracción asistida por ultrasonido, seguida de una partición con acetato de etilo, mejora en gran proporción la extracción de ácido gálico, catequina y quercetina en la fracción no polar. Estos resultados, concuerdan con los hallados en otros trabajos que emplean acetato de etilo como solvente de extracción ya que resulta ser el más adecuado para extraer catequina, por ejemplo de extractos de té verde (Dong *et al.* 2011). Otros autores han confirmado que ambos flavonoides pueden ser extraídos en altas concentraciones de solventes orgánicos, no siempre adecuados para el consumo humano (Dong *et al.* 2011).

Con respecto al ácido gálico, es un compuesto que ha sido identificado por Koehnlein *et al.* (2012) en extractos de pulpas de piñones frescos y cocidos de *A. angustifolia*, aunque en concentraciones bajas comparadas con las encontradas en los extractos de cáscara de piñones de *A. araucana* de esta tesis (0,24 mg/g vs. 1,77 mg/g de ácido gálico en extracto acuoso de

cáscara CTFC, Tabla 18). Estos autores señalan que el ácido gálico y otros antioxidantes hallados en las pulpas de piñones cocidos se debe a que durante la cocción estos compuestos presentes en alta concentración en la cáscara migran hacia la pulpa y no tanto a que forman parte de la pulpa en sí misma (Koehnlein *et al.* 2012). Sin embargo, en otros trabajos con extractos acuosos e hidroalcohólicos de cáscaras piñones de *A. angustifolia* no se ha detectado ácido gálico (De Freitas *et al.* 2018b; Da Silva *et al.* 2019).

Por otra parte, se ha descrito que el ácido gálico, formado por un anillo aromático con tres grupos hidroxilos y un grupo carboxilo, es más extraíble en solventes polares como la molécula prótica polar de agua; sin embargo se ha descubierto que su solubilidad en solventes apróticos (como el acetato de etilo) puede aumentar con el incremento de la temperatura (Galanakis *et al.* 2011). Al igual que lo observado para catequina y quercetina, el extracto acuoso a 100°C de cáscaras de piñón mostró un valor de contenido de ácido gálico mayor que el hallado en la fracción acuosa luego de realizada la partición con acetato de etilo, pero significativamente menor a los valores obtenidos en la fracción superior (Tabla 18). Estos resultados son consistentes con las indicaciones generales para la recuperación de fenoles, dentro de las cuales se deben extraer en primera instancia con la utilización de un solvente polar prótico, y luego progresivamente a través de una secuencia de pasos con solventes de menor polaridad (Michael *et al.* 2010; Galanakis *et al.* 2011).

Aunque se han encontrado bajas concentraciones de estos compuestos fenólicos en las fases acuosas de los extractos fraccionados, los cromatogramas resultantes del análisis por HPLC muestran numerosas señales que indican la presencia de compuestos que no han logrado ser identificados. El alto poder antioxidante del extracto CHT-Uinf, medido tanto por la técnica de FRAP como por la de DPPH, no parece estar relacionado con la concentración de estos tres compuestos, sino por la presencia de compuestos minoritarios no identificados que le otorgarían dicha capacidad.

Así, estos resultados demuestran que los extractos purificados de la cáscara del piñón de *A. araucana* poseen un gran valor nutracéutico, porque tanto la quercetina como la catequina son compuestos que pertenecen a la familia de los flavonoides, un grupo de antioxidantes naturales que se encuentran en frutas y vegetales que no solo les aportan sabor y color, sino que se ha descrito que poseen alta actividad anticancerígena (Amarowicz y Pegg 2019). Por otro lado, la extracción asistida por ultrasonido, seguida de una partición con acetato de etilo, mejora en gran proporción por un lado, la extracción de ácido gálico, quercetina y catequina en las fases orgánicas; y por el otro, la extracción de otros antioxidantes no identificados solubles en la fase

acuosa, ya que esta fracción presenta un alto poder antioxidante por FRAP y DPPH. Así, ambas fracciones tendrían un potencial uso como nutracéutico.

4.4. Conclusiones

Los resultados sugieren que los piñones aportan oligoelementos de valor nutricional y que la cáscara de piñón además de presentar alta capacidad antioxidante podría ser utilizada también por ejemplo en nutrición de ganado.

Por otro lado, el análisis de los resultados del poder antioxidante sugiere que diferentes fenoles serían eficientemente extraídos por agua, calor y asistencia de ultrasonido con posterior partición con acetato de etilo. Los flavonoides mayoritarios como catequina y quercetina, así como ácido gálico (en parte proveniente de la hidrólisis de taninos hidrolizables) estarían enriquecidos en la fase orgánica. Asimismo, una de las fases acuosas mostró el mayor poder antioxidante, pese a la baja concentración de estos tres compuestos fenólicos, lo que indica la presencia de otros compuestos extraídos por ultrasonido responsables de dicha capacidad.

El alto poder antioxidante de la cáscara de piñón, con su elevado contenido de taninos, catequina, quercetina y ácido gálico, así como también elementos esenciales, dan un alto valor nutricional, medicinal e industrial a este residuo por lo que se avanzó y profundizó en el estudio de la actividad biológica y las propiedades anticorrosivas de la cáscara de piñón.

CAPITULO 5

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE CÁSCARA DE PIÑÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*

5.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los piñones de *A. araucana* así como los de otras especies del mismo género han sido consumidos históricamente por los habitantes de la Patagonia, especialmente las comunidades mapuches, conocedores ancestrales de su alto valor nutricional. Algunas de sus propiedades nutricionales han sido demostradas en esta tesis. Para su consumo, especialmente en el invierno, los piñones son cocidos y también son usados para elaborar harina y diferentes preparaciones a partir de esta, lo cual los convierte en un alimento muy importante para estas comunidades. Además de estos aspectos nutricionales, distintas partes de estas especies son utilizadas para medicina tradicional (Aslam *et al.* 2013; Sedrez dos Reis *et al.* 2014). Por ejemplo, las comunidades originarias de Argentina y Chile usan la resina del Pehuén para ayudar a curar heridas, para dolores de cabeza y resfriados, para tratar hematomas y úlceras, para fijar fracturas, para trismo y para normalizar la menstruación (Aagesen 2017). Con respecto a los estudios científicos de la especie, se ha estudiado la composición de la parte comestible del piñón y se ha encontrado que está compuesta por almidón (64%), fibra dietaria (25%), azúcares totales (7%) y bajas concentraciones de compuestos fenólicos, lípidos, proteínas y fibra cruda (Henríquez *et al.* 2008). Además, se ha analizado la composición fenólica, capacidad antioxidante y actividad inhibidora de la α -glucosidasa de extractos obtenidos con la parte comestible del piñón (Schmeda-Hirschmann *et al.* 2021). Por otro lado, se ha analizado la composición de diterpenos presentes en la resina del Pehuén y estudiado el efecto gastroprotector en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Schmeda-Hirschmann *et al.* 2005). Sin embargo, estos estudios se han focalizado en la composición de metabolitos de algunos tejidos de la planta con escasa información sobre su actividad biológica, y no hay estudios de la cáscara de los piñones de *A. araucana*. Por su parte, la especie *A. angustifolia* ha sido estudiada en mayor magnitud. En el caso de esta especie, la corteza se utiliza tradicionalmente para tratar tensiones musculares y várices, la resina se usa en el tratamiento de infecciones respiratorias, las infusiones con hojas como antisépticas, antirreumáticas, contra infecciones respiratorias, entre otras cosas (Peralta *et al.* 2016). También, se ha comprobado que el extracto de cáscara de su piñón es rico en taninos, que además de su alta actividad antioxidante, pueden adsorber iones y tintes metálicos, lo cual lo convierte en una herramienta poderosa y económica para el tratamiento de efluentes industriales (Lima *et al.* 2007; Royer *et al.* 2009; Calvete *et al.* 2010; Mota *et al.* 2014; Tomasi *et al.* 2022). Por otra parte, se ha informado que el extracto de cáscara de esos piñones inhibe las amilasas salival y pancreática y así disminuye la glucemia postprandial; como también causa la inhibición de la lipasa pancreática y como consecuencia,

la disminución de triacilglicéridos en plasma de ratones (da Silva *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2015). Además, estudios realizados *in vitro* e *in vivo* demuestran que el extracto de cáscara de piñones de *A. angustifolia* induce citotoxicidad en células tumorales HEP-2 a través de la generación de daño oxidativo de lípidos y proteínas, producción de óxido nítrico, disminución de la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa e inducción de apoptosis; mientras que en la línea no tumoral HEK-293 no se presentan dichos efectos (Branco *et al.* 2015). Por otro lado, Souza *et al.* (2014) hallaron efectos protectores por parte del extracto obtenido de las brácteas (semillas no fecundadas), ante el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno sobre la línea celular fetal (no tumoral) MRC5, a través de la disminución del daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN. Otro estudio de actividad de extractos de brácteas también mostró actividad antioxidante y antimutagénica en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Michelon *et al.* 2012). Además, los extractos metanólicos de cáscara de piñón de *A. angustifolia*, ricos en taninos condensados, también fueron explorados para su potencial uso en formulaciones cosméticas gracias a su alta actividad antioxidante (Mota *et al.* 2014).

Este es el primer estudio que demuestra el alto poder antioxidante y nutritivo de los extractos de cáscaras de piñón de *A. araucana*, analiza su contenido de fenoles y de oligoelementos. Para avanzar respecto de las propiedades bioactivas de estos extractos, se consideró conveniente estudiar su capacidad protectora en modelos de estrés oxidativo en cultivos de células mamíferas y en ratas. Principalmente, porque numerosas evidencias experimentales del grupo dirigido por la Dra. Bongiovanni han demostrado que los extractos de plantas nativas con propiedades antioxidantes, así como flavonoides aislados, preservan el estado redox y la viabilidad de células no tumorales y tejidos de animales sanos, ambos expuestos a arsénico (As), un elemento cancerígeno capaz de inducir estrés oxidativo (Soria *et al.* 2008, 2010a; Ramos Elizagaray *et al.* 2019). El As es un contaminante ambiental vinculado a numerosas enfermedades y se conoce que los principales mecanismos de su toxicidad están vinculados con el estrés oxidativo directa o indirectamente (Dopp *et al.* 2004; Bhadauria y Flora 2007). La exposición al As causa un aumento de las especies reactivas del oxígeno (EROs), lo que provoca daños en el ADN, lípidos y proteínas, además de alterar la arquitectura celular, la permeabilidad y la supervivencia celular (Birben *et al.* 2012). Estas especies reactivas producen la oxidación lipídica de ácidos grasos, la cual consiste en una reacción en cadena que se inicia normalmente con la sustracción de un átomo de hidrógeno del ácido graso diana convirtiéndolo en un radical lipídico.

La respuesta celular a un desequilibrio redox debido a una situación prooxidante está modulada

por compuestos como el GSH y por enzimas antioxidantes. El GSH es el tiol no proteico más abundante y participa no sólo como antioxidante sino también como sustrato en muchas reacciones de detoxificación de As y otros tóxicos (Ventura-Lima *et al.* 2011; Minatel *et al.* 2018). La enzima catalasa (CAT) es una de las enzimas antioxidantes que proporciona el segundo nivel de defensa contra la toxicidad de ROS (Sepasi Tehrani y Moosavi-Movahedi 2018). Por su parte, las glutatión S-transferasas (GST) son enzimas detoxificantes que catalizan la conjugación de GSH con diversos compuestos, incluidos los compuestos metilados de As (Minatel *et al.* 2018) y también ejercen acción antioxidante (Singhal *et al.* 2015). Se ha demostrado que la exposición a As afecta el sistema antioxidante al alterar la actividad de estas enzimas, en forma dependiente de la dosis y el tiempo de exposición (Wang *et al.* 2019). La exposición prolongada al As causa una disminución significativa en los niveles de GST en tejidos hepáticos y renales, mientras que a corto plazo puede inducirse su actividad como mecanismo de protección contra el estrés oxidativo (Fatoki y Badmus 2022). Por estos motivos, resulta muy adecuado utilizar este modelo para analizar un posible efecto citoprotector del extracto de cáscara de piñón.

Por otro lado, estudios previos han demostrado que algunos de estos extractos o compuestos flavonoides ensayados previamente, producen apoptosis de células tumorales (Soria *et al.* 2007b, 2015; Bongiovanni *et al.* 2008). Este sería un efecto con posible sinergia con drogas oncológicas, ya que sus efectos terapéuticos se basan en la producción de radicales libres, generación de estrés oxidativo y muerte de las células tumorales, con relativa baja toxicidad hacia las células normales. Sin embargo, la toxicidad de los tratamientos oncológicos es generalmente alta y resulta importante hallar antioxidantes que contrarresten este efecto. Entre los efectos indeseables de las drogas oncológicas, se puede citar la promoción de mucositis y particularmente la mucositis oral caracterizada por la inflamación de las glándulas salivales, su disfunción y la consecuente alteración de la composición de la saliva con efectos físicos, sociales y psicológicos adversos. La ulceración de la cavidad oral ocurre en hasta el 40% de los pacientes con diferentes cánceres que reciben quimioterapia y se acerca al 100% en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello (Mazzeo *et al.* 2009).

Aunque aún no hay un consenso total respecto del uso de antioxidantes durante la terapia oncológica, existen numerosas evidencias experimentales, reportes médicos y estudios epidemiológicos con polifenoles que promueven la apoptosis de células cancerosas, inhiben la proliferación de células mutadas, reducen la producción de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y regulan negativamente la expresión génica del cáncer (Liu *et al.* 2018). Otros estudios sugieren que los antioxidantes pueden proteger los tejidos normales del daño inducido por la quimioterapia sin

disminuir el control del tumor (Singh *et al.* 2018). Además, los alimentos vegetales, ricos en antioxidantes, han demostrado reducir el riesgo de muerte en pacientes después de ser diagnosticados con cáncer de mama, cabeza y cuello y recto (Oronsky *et al.* 2018).

Entre los agentes anticancerosos, la ciclofosfamida (CF) es ampliamente utilizada para el tratamiento de muchos tipos de cáncer; sin embargo, por su acción inespecífica, produce serios efectos nocivos sobre las células hospedadoras normales (Dong *et al.* 2022). Las altas dosis de CF utilizadas en la quimioterapia generan gran cantidad de EROs y su consecuente daño oxidativo. Uno de los efectos de este daño es la mucositis. La superóxido dismutasa (SOD) y el ácido úrico (AU) son responsables del 70% del potencial antioxidante de la saliva y la presencia de cada uno de estos antioxidantes en la saliva está condicionada principalmente por la función glandular. Aunque la producción salival de SOD y AU aumenta como respuesta al daño oxidativo e inflamatorio de la CF sistémica, la droga también es transportada por la saliva, por lo que los antioxidantes endógenos no son suficientes para impedir el deterioro de las glándulas salivales con la consecuente alteración de la composición de la saliva y la aparición de mucositis (Bachmeier *et al.* 2014). Por otro lado, el marcador de peroxidación lipídica más estudiado es el malondialdehído (MDA), que se produce a partir de ácidos grasos con dos o más dobles enlaces interrumpidos por metileno (Ayala *et al.* 2014). Este marcador se ha observado en niveles altos asociado a enfermedades tales como periodontitis crónica, enfermedades precancerosas orales y carcinoma de células escamosas orales (Tóthová *et al.* 2015). Por su parte, Zhang *et al.* (2021) han encontrado un nivel de MDA aumentado en hígado de ratas tratadas con CF y confirmaron que la exposición a este fármaco destruyó el equilibrio redox dentro del hígado y representó un gran daño para este órgano. Esto demuestra la urgente necesidad de contar con un quimioprotector y/o radioprotector, a fin de atenuar la toxicidad que impone límites en las dosis de la terapia oncológica.

5.1.1. Hipótesis

El extracto de cáscara de piñón presenta alta bioactividad antioxidante que puede ser determinada en modelos *in vitro* e *in vivo* mediante su capacidad de contrarrestar efectos tóxicos de agentes oxidantes.

5.1.2. Objetivo

Evaluar la inocuidad y la capacidad protectora antioxidante de extractos de cáscara de piñón en modelos *in vitro* e *in vivo*.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Reactivos químicos

El medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM) y antibióticos se adquirieron de Sigma-Aldrich. Los solventes de grado HPLC se adquirieron de Fisher Scientific Co. El suero bovino fetal se adquirió de Natocor, Argentina. El arsenito de sodio (NaAsO_2 , CAS N° 7784-46-5, pureza >99,95%) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) fueron adquiridos de Anedra, Argentina. La albúmina sérica bovina (ASB), el 1,cloro 2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) y el glutatión reducido (GSH) se adquirieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU. El kit RANSOD (SD 125) para la determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) fue de RANDOX Laboratories Ltd. El kit de ensayo de malondialdehído (MDA) (ab118970) para detectar la peroxidación lipídica fue de Abcam Laboratory. Para las determinaciones de ácido úrico se utilizó Uricostat enzimático AA (Cod. 1840107) de Wiener lab. Se usó agua Milli-Q en todos los experimentos. Las unidades de filtro estériles PES de 0,22 μm procedían de GVS, EE. UU. La ciclofosfamida 1000 como polvo liofilizado (número de catálogo: 120105-04) fue adquirida de LKM Laboratory.

5.2.2. Evaluación de la actividad biológica del extracto CHT-Uinf en un modelo *in vitro*

5.2.2.1. Línea celular

Para testear la bioactividad *in vitro* de los extractos de cáscara de piñón, se empleó la línea celular CHO-K1, que deriva de un subclón de la línea celular parental CHO, iniciada de una biopsia de ovario de hámster chino adulto.

5.2.2.2. Mantenimiento de la línea celular

Las células fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM 10 g + NaHCO_3 3,75 g + HEPES 4,76 g + H_2O Milli-Q csp 1 l) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 IU/ml de penicilina G sódica y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sulfato de gentamicina. Como esta línea celular no puede sintetizar el aminoácido prolina, necesario para su crecimiento, se le agregó 34,5 mg/l de prolina. El medio de cultivo mencionado en los siguientes párrafos contiene todos estos componentes. Las células fueron mantenidas en estufa, en una atmósfera de 5% de CO_2 a 37°C. Los subcultivos fueron obtenidos cada 72 h por tratamiento suave con tripsina (0,25% p/v) y EDTA (0,53 mM), y se sembraron 10^5 células/75 cm^2 . Luego de este periodo, se obtiene una monocapa con un 80% de cobertura.

5.2.2.3. Evaluación de citotoxicidad y efecto protector del extracto CHT-Uinf por fluorescencia

De acuerdo a los resultados mostrados anteriormente, se seleccionó el extracto con mayor actividad antioxidante, que corresponde a la fracción acuosa del extracto obtenido a partir de cáscara hervida total con ultrasonido a 60°C 25 min (CHT-Uinf) y particionada con acetato de etilo. Además de seleccionarlo por su alto poder antioxidante, dicho extracto fue elegido porque es acuoso y este solvente no presenta toxicidad para el ambiente ni el ser humano. También se tuvo en cuenta que la biomasa de cáscaras de piñones hervidos obtenida de la industrialización de los mismos es comparativamente mayor a la biomasa de cáscaras de piñones tostados. Todos estos criterios fueron tomados en cuenta para elegir el extracto CHT-Uinf a fin de evaluar su actividad biológica *in vitro*.

Los efectos del As (5 µg/ml) y el extracto (2 µg/ml) sobre las células fueron analizados por separado y también combinados. Las células sin tratamiento, incubadas en medio solo, se utilizaron como control. Para determinar viabilidad se utilizó diacetato de fluoresceína (DAF), una sustancia no polar que atraviesa la membrana celular y es hidrolizada por esterasas lisosomales en células viables, produciéndose la fluoresceína, que exhibe fluorescencia verde al excitarse a 490 nm. Para que dicho proceso ocurra, es necesario que las membranas celulares se encuentren intactas y funcionales para la correcta función hidrolítica intralisosomal, por lo que células no viables son incapaces de hidrolizar el DAF y/o de retener la fluoresceína. Por otro lado, también se usó como segundo marcador el yoduro de propidio (YP), que ingresa a las células cuando la membrana se encuentra desintegrada (proceso de apoptosis tardía o necrosis) y se intercala entre las bases del ADN y ARN, en una relación de 1 molécula por cada 4-5 pares de bases. Una vez unido a los ácidos nucleicos, la fluorescencia roja del YP resulta incrementada unas 20-30 veces, y queda en el rango de excitación de los 510 a 560 nm. La viabilidad de células CHO-K1 fue determinada con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i y el software NIS-Elements Basic Research 3. Así, con esta doble tinción, se logró distinguir entre células viables (con gránulos en el citoplasma que fluorescen verde) y células en apoptosis tardía o necróticas (con núcleos de color rojo). Además, se pudieron diferenciar aquellas células viables que presentaban cambios morfológicos coherentes con un estado de apoptosis, con morfología redondeada y mayor separación entre sí.

Para este ensayo, se cultivaron 40000 células/pozo en placas de 6 pozos (9,6 cm²) durante 24 h. Luego se removió el medio y se incubaron con los tratamientos durante 2 h. Seguido a esto, el medio fue removido y se agregaron, en oscuridad, 20 µl de una solución formada por DAF 25 µg/ml y YP 1 µg/ml y se incubaron durante 15 minutos. Por último, cada pozo fue lavado

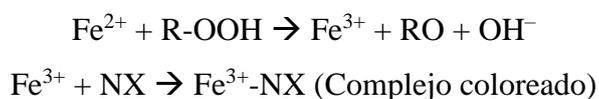
con buffer fosfato de sodio (PBS) pH 7,4 para eliminar el excedente de los fluoróforos, se observaron en el microscopio de fluorescencia y se tomaron tres fotografías por pozo, en diferentes campos. Las imágenes fueron analizadas digitalmente por el software ImageJ/FIJI de forma independiente. Se realizó sustracción de coloración de fondo, ajuste de brillo y contraste, aplicación de filtro de mediana y división de canales, cuando fue necesario, a fin de poder utilizar sobre las imágenes procesadas la herramienta multi-point para el conteo de células. En cada imagen se contabilizó el N° total de células por campo, N° de células no viables (se distinguió entre aquellas que presentaron citoplasma y núcleo rojo o citoplasma verde y núcleo rojo) y N° total de células viables (se diferenció entre aquellas de forma alargada o redonda).

5.2.2.4. Evaluación de citotoxicidad y efecto protector del extracto CHT-Uinf por la técnica de cristal violeta

Se analizaron los efectos del As (5 µg/ml) y el extracto CHT-Uinf (2 µg/ml) por separado y combinados, sobre la viabilidad de células CHO-K1, mediante la técnica de tinción con cristal violeta descrita en la sección 3.2.7.3. *Bioensayos para la evaluación de citotoxicidad*. Las células sin tratamiento, incubadas en medio sin agregado de As ni extracto, fueron utilizadas como control. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto del control (100% de viabilidad).

5.2.2.5. Determinación de hidroperóxidos celulares

Los hidroperóxidos (HP) son una medida del estado redox celular porque se forman en condiciones prooxidantes. Su determinación se basa en la capacidad de los HP para oxidar Fe²⁺ a Fe³⁺ en pH ácido (Soria *et al.* 2010a; Ramos Elizagaray *et al.* 2019). El hierro oxidado forma luego un complejo coloreado con naranja de xilenol, el cual es cuantificado a 560 nm. La reacción puede ser descripta como:



Dónde:

NX = naranja de xilenol

R = H o un grupo lipídico

Para determinar el contenido de HP acuosos (peróxido de hidrógeno) se utilizó una solución acuosa (solución A) de 100 mM de sorbitol y 125 µM de naranja de xilenol; y para los orgánicos, una solución de metanol al 90% (solución B) que contiene 4 mM de BHT y 125 µM de naranja de xilenol. Además, una solución de 25 mM de amonio ferroso en 2,5 ml de ácido

sulfúrico (solución C) fue utilizada para ambas determinaciones.

Para el ensayo se sembraron 10000 células por pozo en placas de 6 pozos (9,6 cm²) y se incubaron 48 h en estufa con medio de cultivo fresco. Luego, se removió el medio y se agregaron los tratamientos con un volumen total de 200 µl/pozo. Los tratamientos fueron: As 5 µg/ml, diferentes concentraciones del extracto y las combinaciones de estos. Se realizaron controles sin tratamiento con As o extracto. Las células fueron tratadas durante 2 h y luego, una vez removidos los tratamientos, se agregaron 5 µl de SDS al 20% (para favorecer la lisis celular y la liberación de los peróxidos) y 100 µl de solución de trabajo. En el caso de los HP acuosos, la solución de trabajo constó de las soluciones A y C en una relación 100:1, y en el caso de los orgánicos, de las B y C en la misma relación. Las placas se incubaron durante 30 minutos a TA y luego, se procedió a la lectura de las absorbancias en espectrofotómetro a 560 nm.

Las curvas de calibración para hidroperóxidos acuosos y orgánicos se realizaron a partir de una solución 100 µM de H₂O₂ y 200 µM de hidroperóxido de tert-butilo, respectivamente. Los datos fueron expresados en µmoles/10000 células.

5.2.2.6. Evaluación de actividad de enzimas del sistema antioxidante

Para evaluar la actividad enzimática de las enzimas catalasa y glutatión S-transferasa, se cultivaron 5 millones de células CHO-K1 durante 48 h en frascos de cultivo de 75 cm² de área de crecimiento, por tratamiento. Posteriormente, el medio fue removido y las células fueron tratadas durante 2 h. Los tratamientos fueron: As 5 µg/ml, CHT-Uinf 2µg/ml, la combinación de ambos y el control (medio solo). Luego, las células fueron removidas del frasco con tripsina 0,25% (p/v) - 0.53 mM EDTA 1X, la cual fue posteriormente inhibida con SFB. Posteriormente, fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos, luego el medio de cultivo junto con la tripsina fue descartado y las células fueron resuspendidas en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7. Posteriormente, las células fueron homogeneizadas con homogeneizador Bio-Gen PRO200 (PRO Scientific Inc.) y centrifugadas a 3000 x g durante 10 minutos en centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante obtenido fue utilizado para determinar la actividad de glutatión S-transferasa y catalasa.

5.2.2.6.1. Evaluación de actividad de Glutatión S-transferasa -GST:

Las glutatión S-transferasas (GST) constituyen una superfamilia de isoenzimas cuya función es la detoxificación celular de una serie de compuestos electrofílicos que incluyen algunas EROs y los productos generados durante el daño celular, tales como lipoperóxidos (Hayes *et al.* 2005). La actividad de la enzima GST se calculó mediante el seguimiento de la formación del complejo tioéter-glutatión-dinitrobenzeno, como producto de la reacción enzimática de glutatión (GSH)

con 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) detectado a 340 nm de longitud de onda (Habig y Jakoby 1981; Ferrari *et al.* 2011; Mardirosian *et al.* 2015). En primer lugar, se determinó una línea base (blanco), que corresponde a la conjugación no enzimática de ambos sustratos (CDNB y GSH) y se midió de manera cinética la absorbancia de la solución (buffer de fosfato de sodio 0,1 M pH 6,5, GSH 50 mM, CDNB 0,05 M). Posteriormente se agregaron 40 µl del sobrenadante de 3000 x g del homogenado de células, se alcanzó un volumen final de 1 ml y se registró de manera cinética la absorbancia durante 2 minutos. La actividad se expresó como µmoles de CDNB conjugado por minuto por mg de proteína, se utilizó el coeficiente de extinción molar para el CDNB de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.2.2.6.2. Evaluación de actividad de Catalasa:

La enzima Catalasa (CAT) participa en el metabolismo del H_2O_2 , está presente en la mayoría de los órganos del cuerpo y su función es catalizar la reducción de H_2O_2 a O_2 y H_2O . A altas concentraciones de H_2O_2 , la CAT tiene la capacidad de reducirlo, puesto que la catalasa requiere dos moléculas de H_2O_2 para llevar a cabo la reducción; por el contrario, a bajas concentraciones de H_2O_2 decrece su eficiencia (Cemeli *et al.* 2009).

Para la determinación de la actividad enzimática se registró espectrofotométricamente de manera continua la disminución de la absorbancia del H_2O_2 a una longitud de onda de 240 nm (Beers and Sizer 1952; Ferrari *et al.* 2011; Mardirosian *et al.* 2015).

En un volumen final de 0,6 ml de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7 con H_2O_2 25 mM se colocaron 30 µl del sobrenadante de 3000 x g del homogenado de células en cubeta de cuarzo y se registró de manera continua durante 2 minutos, a 25°C , la disminución de la absorbancia a 240 nm. Los valores de caída en la absorbancia fueron corregidos por hidrólisis espontánea no enzimática del sustrato durante 2 minutos.

La actividad específica de CAT se expresó como mmoles de H_2O_2 hidrolizados por minuto por mg de proteína. Para los cálculos de la actividad específica se utilizó el coeficiente de absortividad molar del H_2O_2 , $40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.2.2.6.3. Evaluación de proteínas totales

Para estandarizar los valores de actividad enzimática, se midió la concentración de proteínas totales. La determinación en sobrenadante de 3000 x g fue realizada según el método descrito por (Lowry *et al.* 1951). La cantidad de proteínas se calculó a partir de la ecuación de la recta ajustada a una curva estándar de albúmina sérica bovina y se expresó en mg de proteína por ml.

5.2.3. Evaluación de actividad biológica de la cáscara de piñón en un modelo *in vivo*

El estudio *in vivo* consistió en evaluar el efecto antioxidante de un extracto de cáscara de piñón (CTFC) en glándulas submandibulares de ratas tratadas con el citostático ciclofosfamida (CF). Se analizó la concentración de ácido úrico (AU) y la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), como marcadores de capacidad antioxidante, y la concentración de malondialdehído (MDA) resultante de la peroxidación lipídica, como marcador de daño oxidativo, en ratas tratadas con CF.

El extracto se preparó a partir de una infusión elaborada diariamente con 2 g de cáscara total de piñones frescos triturada, cada 100 ml de agua a 100°C. Se esperó que se enfríe y se filtró con papel de filtro. El extracto se suministró por vía oral como se describe más adelante. Por otra parte, la dosis de CF administrada diariamente en los tratamientos correspondientes fue de 50 mg/kg peso corporal mediante una inyección intraperitoneal.

El experimento se realizó en los laboratorios del Dr. Adrián Mazzeo de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, quien desarrolló este modelo a fin de analizar los efectos de la CF y otras drogas oncológicas en glándulas salivares. El ensayo incluyó 28 ratas machos albinas Wistar con una edad de 12 semanas y un peso corporal de 350/400 gramos. Las ratas fueron alojadas en jaulas individuales, en un bioterio con temperatura e iluminación controlada y dieta para roedores de GEPSA Grupo Pilar SA (Córdoba, Argentina) *ad libitum*. El cuidado y uso apropiado de las mismas se realizó según la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH) y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (33620180100414CB). Cada rata tenía acceso libre a comida y 50 ml de agua o extracto de cáscara de piñón, por día por tratamiento. En caso de que alguna rata consumiera los 50 ml del agua o extracto en menos de 24 h, se agregó agua.

Las ratas fueron divididas en cuatro grupos experimentales (7 por grupo) que se muestran en la Tabla 19. En el octavo día, fueron anestesiados con la administración de una dosis conjunta de ketamina y xylazina (80 y 12,8 mg/kg PC respectivamente) y se extirparon ambas glándulas submandibulares. Al finalizar el procedimiento quirúrgico se procedió a la eutanasia de los animales mediante una maniobra física de dislocación cervical. Los animales fueron mantenidos en ayuno 24 h previas al sacrificio.

Luego de la extracción, una muestra de 10 mg de glándula submandibular fue homogeneizada en buffer (de acuerdo a las especificaciones de cada kit analítico empleado), centrifugada a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se analizaron en los sobrenadantes de cada muestra de los cuatro grupos experimentales la actividad de SOD, concentración de AU y MAD. Todas las

determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Tabla 19: Grupos experimentales utilizados para el estudio *in vivo*. CF= ciclofosfamida; CP= Cáscara de piñones frescos.

GRUPO	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Control n= 7	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Ayuno Agua	Cirugía
CF n = 7	Agua	Agua	Agua	Agua CF Ip. 50mg/kg Pc	Agua CF Ip. 50mg/kg Pc	Agua	Ayuno Agua	Cirugía
CP + CF n = 7	CP	CP	CP	CP	CP +CF Ip. 50mg/kg Pc	CP +CF Ip. 50mg/kg Pc	Ayuno CP	Cirugía
CP n = 7	CP	CP	CP	CP	CP	CP	Ayuno CP	Cirugía

CF: ciclofosfamida; CP: extracto cáscara de piñones; Pc: peso corporal; Ip: intraperitoneal

5.2.3.1. Actividad de Superóxido dismutasa (SOD) en glándula submaxilar

La actividad enzimática de SOD se determinó espectrofotométricamente mediante el kit de Ransod (Cat N° SD216) de Randox (Randox Laboratories Ltd., Crumlin Co., Antrim, Reino Unido). El mismo detecta a 505 nm de longitud de onda el colorante formazán generado por oxidación de la sal de tetrazolio promovida por el anión superóxido (Figura 48). Así, si la muestra contiene elevada actividad de SOD, este anión es depurado y disminuirá la producción del colorante, y viceversa. Como el anión superóxido es muy inestable, debe ser artificialmente producido *in situ* mediante la oxidación específica de xantinas. Los valores de actividad SOD se expresaron en unidades por gramo de glándula (U/g).

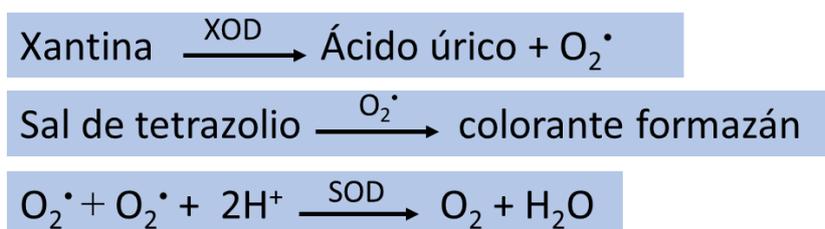


Figura 48: Reacciones que ocurren en la medición de actividad de superóxido dismutasa mediante el kit Ransod XOD: xantina oxidasa, O_2^\bullet : anión superóxido

5.2.3.2. Contenido de Ácido úrico (AU) en glándula submaxilar

Para medir el contenido de AU se utilizó el método enzimático espectrofotométrico UOD/PAP (Trinder Color; Wiener Lab). Según dicha técnica, la cantidad de AU se determinó por medición de la absorbancia del pigmento quinonimina de color rojizo que se vuelve más intenso al aumentar la concentración de H₂O₂ y por ende, de AU (Figura 49).

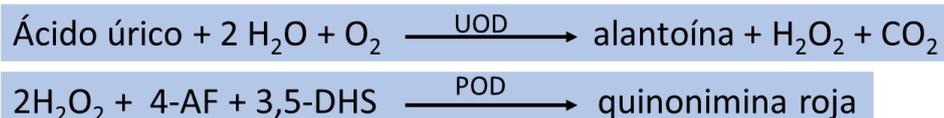


Figura 49: Esquema de las reacciones utilizadas para medir contenido de ácido úrico. UOD: uricasa, POD: peroxidasa 4-AF: 4-aminofenazona 3,5-DHS: sal sódica de 3,5-diclorohidroxibenceno sulfónico.

5.2.3.3. Contenido de malondialdehído (MDA) en glándula submaxilar

El análisis de peroxidación lipídica en glándulas submandibulares de ratas Wistar se analizó a través de la determinación de la concentración de malondialdehído (MDA) con el Kit de ensayo para MDA (ab118970) del laboratorio Abcam. En este ensayo, el MDA presente en la muestra, resultante de la peroxidación lipídica, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y genera un complejo MDA-TBA, que puede cuantificarse colorimétricamente a una longitud de onda de 532 nm. La curva de calibración se obtuvo a partir de cantidades crecientes de la solución estándar de MDA (4,17 M) incubadas con TBA. Las muestras de tejido fueron lavadas en PBS y luego homogeneizadas en una solución de lisis junto con una solución de BHT, ambas aportadas por el kit. La mezcla fue centrifugada a 13000 x g por 10 minutos para remover material insoluble y se recolectó el sobrenadante. A cada muestra y/o punto de la curva de calibración (200 µl) se le agregaron 600 µl de solución TBA y se incubaron a 95°C durante 60 minutos. Luego, se enfriaron en un baño de hielo durante 10 minutos. Por último, se colocaron 200 µl de la mezcla de reacción en cada pozo de una multiplaca de 96 pozos y se realizó la lectura en un Lector de microplacas Elisa a 532 nm. Los ensayos fueron realizados por duplicado. El contenido de MDA se expresó como M/g de glándula submandibular.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Determinación de citotoxicidad del extracto CHT-Uinf por fluorescencia

La citotoxicidad puede analizarse mediante técnicas que involucran el estudio y análisis de los cambios dinámicos en la organización estructural durante los distintos estadios funcionales de la célula. La técnica de doble tinción con DAF y YP permite, mediante microscopía de fluorescencia, distinguir entre células no viables y viables, y a su vez, caracterizar los tipos

celulares según su morfología. Algunas fotografías representativas de los distintos tratamientos y el control se presentan en la Figura 50.

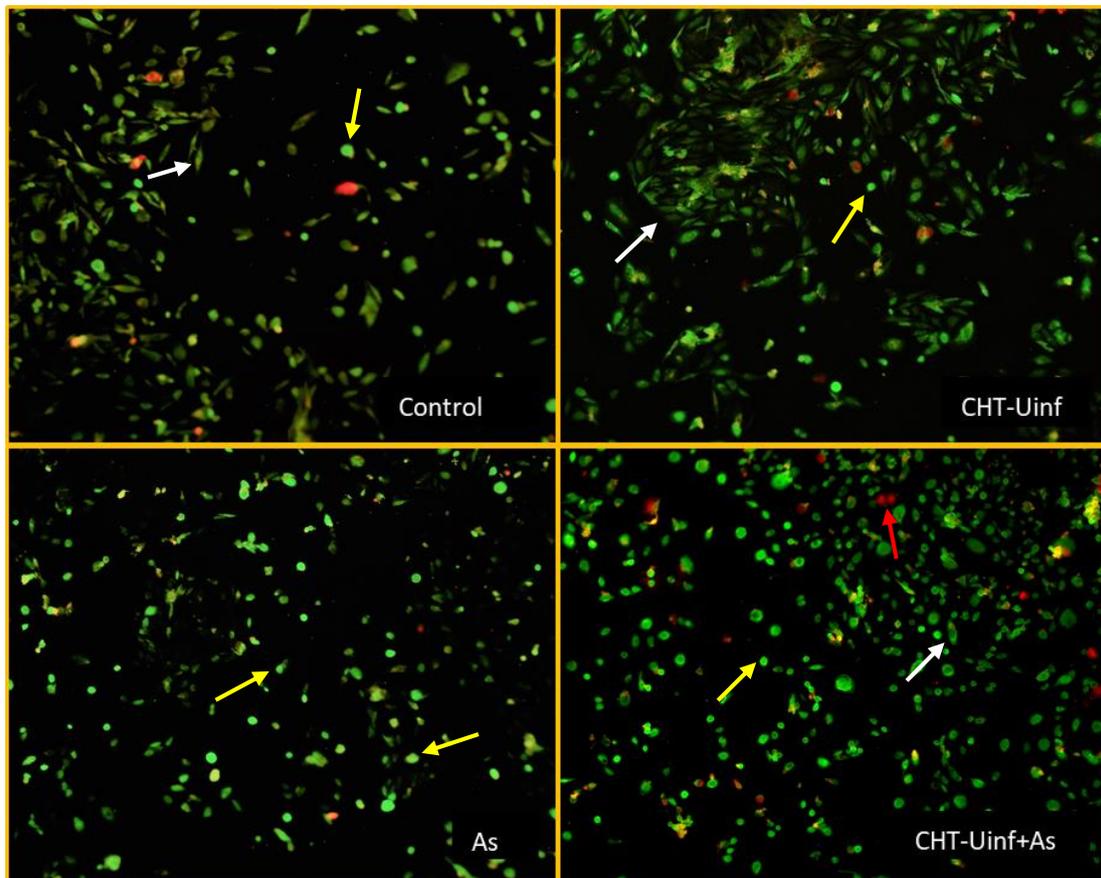


Figura 50: Imágenes de células CHO-K1 luego de 2 h de tratamiento con 2 $\mu\text{g/ml}$ de extracto CHT-Uinf (fase inferior de la partición con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min), 5 $\mu\text{g/ml}$ arsénico (As), la combinación de ambos (CHT-Uinf+As) y control tomadas con microscopio de fluorescencia (100X). Flechas blancas: células viables normales; flechas amarillas: células viables apoptóticas; flechas rojas: células no viables.

En primera instancia se determinó el número total (independientemente de su morfología) de células adheridas a la placa de cada tratamiento y el resultado fue graficado en la Figura 51. Se observó que el tratamiento con extracto CHT-Uinf mostró un número significativamente mayor de células que los demás tratamientos y que el control. Si bien el tratamiento con As 5 $\mu\text{g/ml}$ presentó el valor más bajo en el número de células totales adheridas, no presentó diferencias significativas con el control y el tratamiento combinado con extracto y As. Según Banfalvi (2017), los cambios morfológicos relacionados a la adherencia de las células que inician la apoptosis se dividen en cuatro estados: (1) preapoptótico, (2) hinchazón, (3) redondeo, y (4) flotación. La presencia de mayor número de células en los tratamientos con extracto muestra

que hay mayor número de células adheridas. El número de células adheridas en el tratamiento con As fue similar al del control, pero es posible que las células tratadas con As se encontraran en un estado de apoptosis avanzado, previo al de flotación, como se observó en los análisis morfológicos que se describen a continuación.

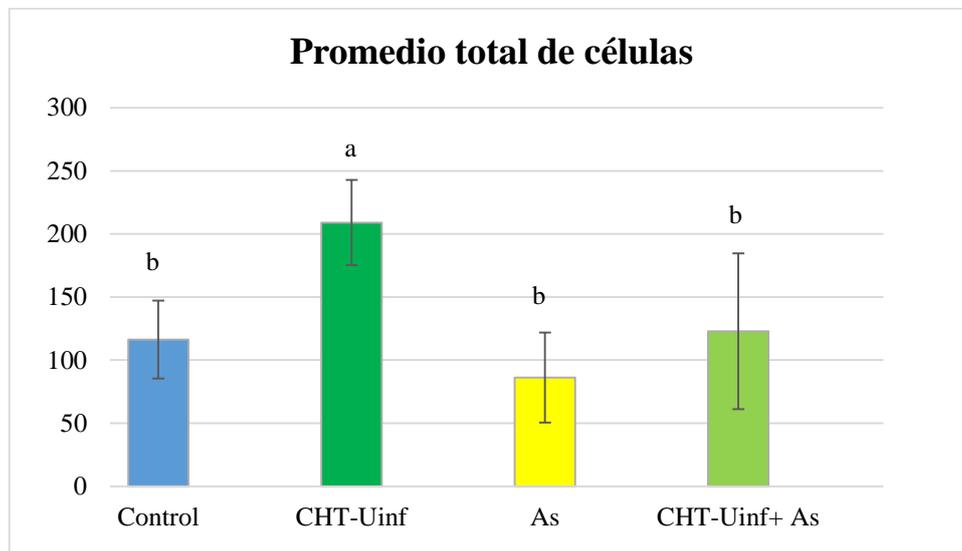


Figura 51: Promedio total de células fluorescentes adheridas por campo bajo distintos tratamientos: control, con extracto CHT-Uinf 2 $\mu\text{g/ml}$ (fase inferior de la partición con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min), con As 5 $\mu\text{g/ml}$ y con la combinación de ambos. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0,05$).

Cuando se comparó la marcación con fluoróforos en cada tratamiento, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de células teñidas con FDA (viables) y teñidas con YP (no viables) entre los controles y el tratamiento con As. Por otro lado, fue muy baja (0,4% del total) la cantidad de células no viables totalmente teñidas con YP (citoplasma y núcleo rojos, en apoptosis avanzada) en el tratamiento con el extracto CHT-Uinf. Mientras que, se encontró una proporción aumentada (16,5 % del total) de células no viables (núcleo rojo, en proceso de necrosis, se marca con una flecha roja en la Figura 50) en el tratamiento conjunto CHT-Uinf+As. Las células redondas, pequeñas y en contacto con otras células, fueron consideradas en proceso de división celular y no fueron consideradas en la valoración de diferencias morfológicas. Asimismo se analizó la proporción de células viables con la morfología normal de una célula CHO-K1 (con forma alargada y poligonal, adherida a la superficie de la placa y en contacto con células adyacentes) y también la proporción de células viables con morfología redondeada y separadas de las demás (viables en estado 3 de apoptosis) (Desjardins y MacManus 1995; Banfalvi 2017) (Figura 52).

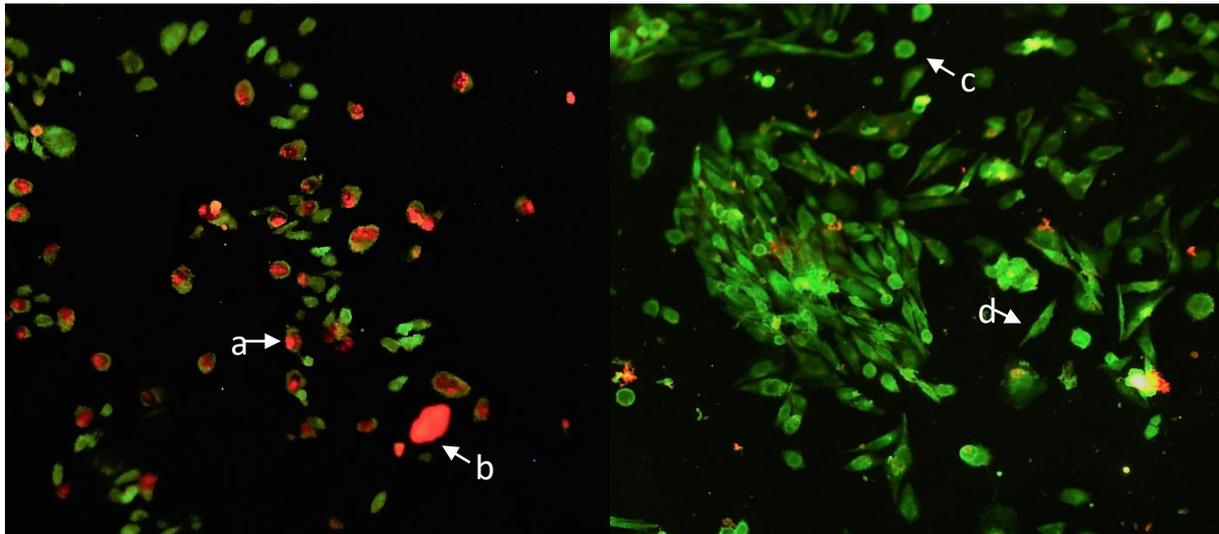


Figura 52: Ejemplos de tipos celulares hallados en los distintos tratamientos: a) célula no viable con núcleo teñido con YP (células necróticas); b) célula no viable teñida completa con YP (estado avanzado de apoptosis); c) célula viable con forma redondeada y aislada (en proceso de apoptosis); y d) célula viable con morfología normal.

La Figura 53 muestra que no se encontraron diferencias significativas en las proporciones de células viables normales y viables apoptóticas entre el control y el tratamiento con extracto; ambos presentaron cerca de un 70% de células viables normales y aproximadamente un 23% de células viables redondas (se indican con flechas amarillas las células viables apoptóticas y con flechas blancas las células viables normales en la Figura 50). En contraste, el tratamiento con As presentó un 89% de células viables apoptóticas y un 5% de células viables normales. Este resultado evidencia que la exposición a As durante 2 horas, aunque no redujo el número de células adheridas, generó un aumento significativo en la proporción de células viables que iniciaron un proceso de apoptosis. Estas células se observaron redondas grandes y separadas, pero con sus membranas íntegras, ya que no presentaron tinción con YP (se indican con flechas en la Figura 50). En este sentido, el tratamiento con As no causó un aumento en la proporción de células teñidas con YP con respecto al control. El tratamiento combinado de As con el extracto de cáscara de piñón mostró proporciones similares de células viables normales y apoptóticas (41 y 43%) (ambos tipos celulares se indican en la Figura 50 con flechas blancas y amarillas, respectivamente). Esto evidencia cierto efecto protector del extracto sobre la toxicidad inducida por el As, que presentó 5% de células viables normales y 89% de apoptóticas (Figura 53).

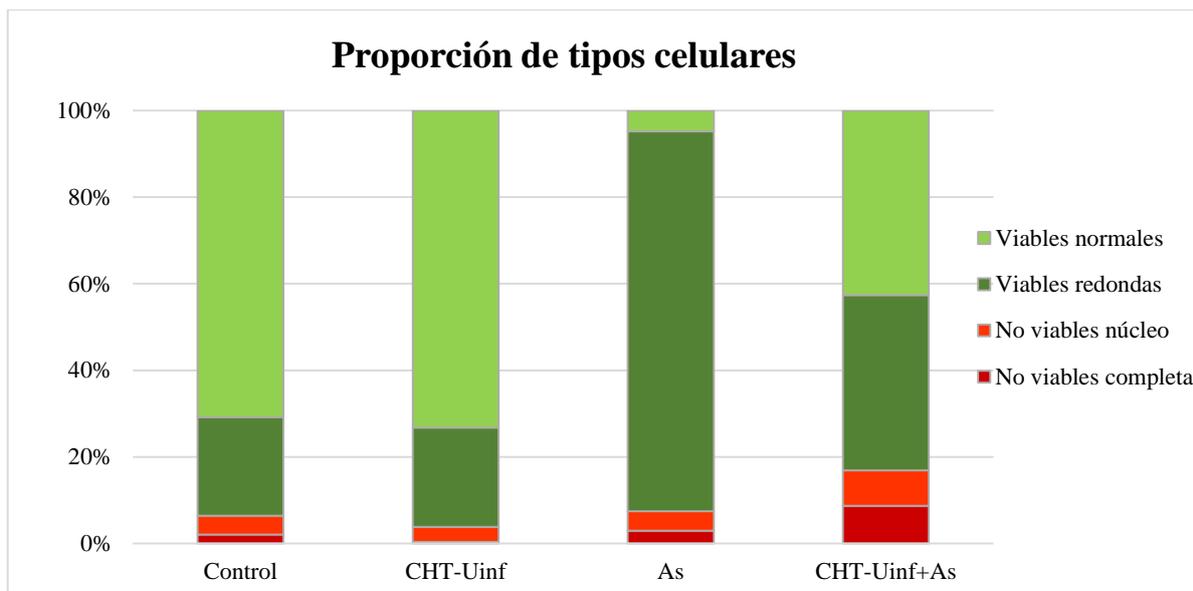


Figura 53: Proporción de tipos de células adheridas por campo bajo distintos tratamientos: control, con extracto de cáscara de piñón CHT-Uinf 2 μ g/ml (fase inferior de la partición con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min), con As 5 μ g/ml y con la combinación de ambos.

Al conjugar los resultados de número de células adheridas y su viabilidad/morfología para los diferentes tratamientos, se encontró que el valor promedio de células normales observadas en cada campo fue mayor en el tratamiento con extracto CHT-Uinf > control > As+ CHT-Uinf > As (Figuras 51 y 53). Sobre la base de este resultado, no se puede descartar un efecto proliferativo o inhibitorio de la muerte celular del extracto de la cáscara del piñón. Este extracto inhibiría principalmente la muerte por necrosis ya que en el tratamiento con CHT-Uinf se encontró el menor valor relativo (porcentual) y absoluto (número de células adheridas) de células con núcleos rojos (teñidas con YP) con respecto a los demás tratamientos. Sólo el efecto proliferativo parece mantenerse como parte del efecto protector frente a un agente oxidante como el As, ya que la proporción de células inviables (necróticas con núcleos rojos y apoptóticas con citoplasma y núcleo rojos), aumenta en el tratamiento combinado. Estos efectos, tales como cambios en la morfología celular, efecto inhibitorio de necrosis y protector de la viabilidad frente a As, han sido observados en cultivos de células VERO y CHO-K1 tratadas con extractos antioxidantes de otras especies vegetales (Soria *et al.* 2008, 2010b).

5.3.2. Determinación de citotoxicidad del extracto CHT-Uinf por cristal violeta

Asimismo, se evaluó si el extracto CHT-Uinf presentaba algún efecto tóxico sobre la línea celular CHO-K1 a través del uso de la técnica de tinción de cristal violeta. Los resultados de las determinaciones espectrofotométricas (expresados como porcentaje de viabilidad o de

absorbancia de células adheridas, respecto al control, 100%) sugieren que no habría efectos en la viabilidad de células en los tratamientos con extracto, con As 5 $\mu\text{g/ml}$ y con la combinación de ambos luego de 2 h de exposición (Figura 54). La técnica de tinción con cristal violeta es un método rápido y versátil para testear la viabilidad celular bajo diversas condiciones, aunque está potencialmente comprometida por respuestas proliferativas que ocurren al mismo tiempo que las respuestas de muerte celular y es insensible a cambios en el metabolismo celular (Aslanturk 2013). En el presente estudio, esta técnica no arrojó diferencias quizás porque muchas de las células en mitosis, que están débilmente adheridas, se liberan con esta metodología de tinción, o porque el tiempo de exposición fue menor al necesario para generar cambios significativos dentro del rango de medición de la misma. Este tiempo fue elegido mediante la valoración de la cantidad de células adheridas y viables (DAF positivas) a distintos tiempos de incubación con As 5 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados indicaron que 2 h es el máximo tiempo de incubación que permite estudiar los cambios morfológicos producidos por As, sin alcanzarse el estado de flotación, el cual no permite tal análisis. Así, no se puede descartar que mayores tiempos de exposición revelen algún efecto tóxico del extracto CHT-Uinf sobre las células y que éstas se liberen de la monocapa teñida.

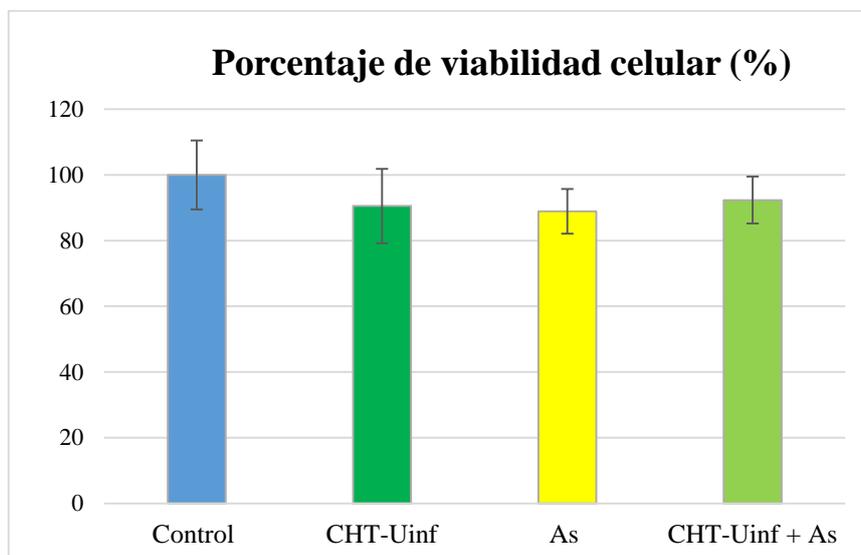


Figura 54: Porcentaje de viabilidad celular de células CHO-K1 teñidas con cristal violeta tratadas con extracto CHT-Uinf 2 $\mu\text{g/ml}$ (fase inferior de la partición con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min), As 5 $\mu\text{g/ml}$, la combinación de ambos y control durante 2 h en 2 experimentos con 8 réplicas.

Cuando se analizaron las imágenes de las placas con las células teñidas con cristal violeta al microscopio óptico, se pudieron observar cambios que no fueron evidenciados por la medición

de absorbancia. En la Figura 55 se observa que tanto las células del control como las expuestas al extracto presentan morfología típica alargada, con núcleos normales con cromatina laxa, las cuales son características de células viables en interfase (indicado con flechas blancas en Figura 55); aunque a diferencia de las células control, las expuestas al extracto presentaron mayor distancia entre ellas. Como se mencionó antes, esto último podría estar relacionado al desprendimiento de las células en proceso de mitosis. Por su parte, las células expuestas a As presentaron mayor intensidad en su coloración, probablemente debido a que los núcleos se ven picnóticos por la condensación de la cromatina, y células más redondeadas con morfología no típica de células epiteliales sino de células en proceso de apoptosis (indicado con flechas amarillas en Figura 55). Estas características morfológicas y tintoriales concuerdan con los resultados hallados en estudios que evalúan citotoxicidad y genotoxicidad en células expuestas a As (Hanna y Taylor 1985; Dopp *et al.* 2004) y con los resultados propios obtenidos con marcación por DAF y YP. En cuanto a las células expuestas a ambos, As y extracto, se observa cierta variabilidad entre ellas: algunas tienen morfología típica, en contacto con las adyacentes y con núcleos claros, mientras que otras presentan cromatina condensada, formas redondeadas y más separadas entre sí (indicadas en la Figura 55 con flechas blancas y amarillas, respectivamente). Esto podría ser indicio de que el extracto disminuiría en parte los efectos tóxicos del As en estas condiciones, lo cual resulta coherente con los resultados con marcación por DAF y YP, los cuales indican similares proporciones de células viables normales y apoptóticas. Cabe aclarar que en ambas valoraciones no se contabilizaron las células en proceso de mitosis, ya sea porque no se consideró esa morfología, o porque se despegaron durante la aplicación de la técnica de tinción con cristal violeta.

Así, tanto las diferencias en la intensidad de coloración como la falta de cuantificación de las células que se despegan por presentar baja adherencia durante la mitosis, podrían conjugarse y ocasionar que los valores de absorbancia no muestren diferencias significativas entre los tratamientos.

Se destaca, sin embargo, que el estudio al microscopio óptico evidenció diferencias morfológicas relevantes, en concordancia con lo observado en la tinción con los fluoróforos.

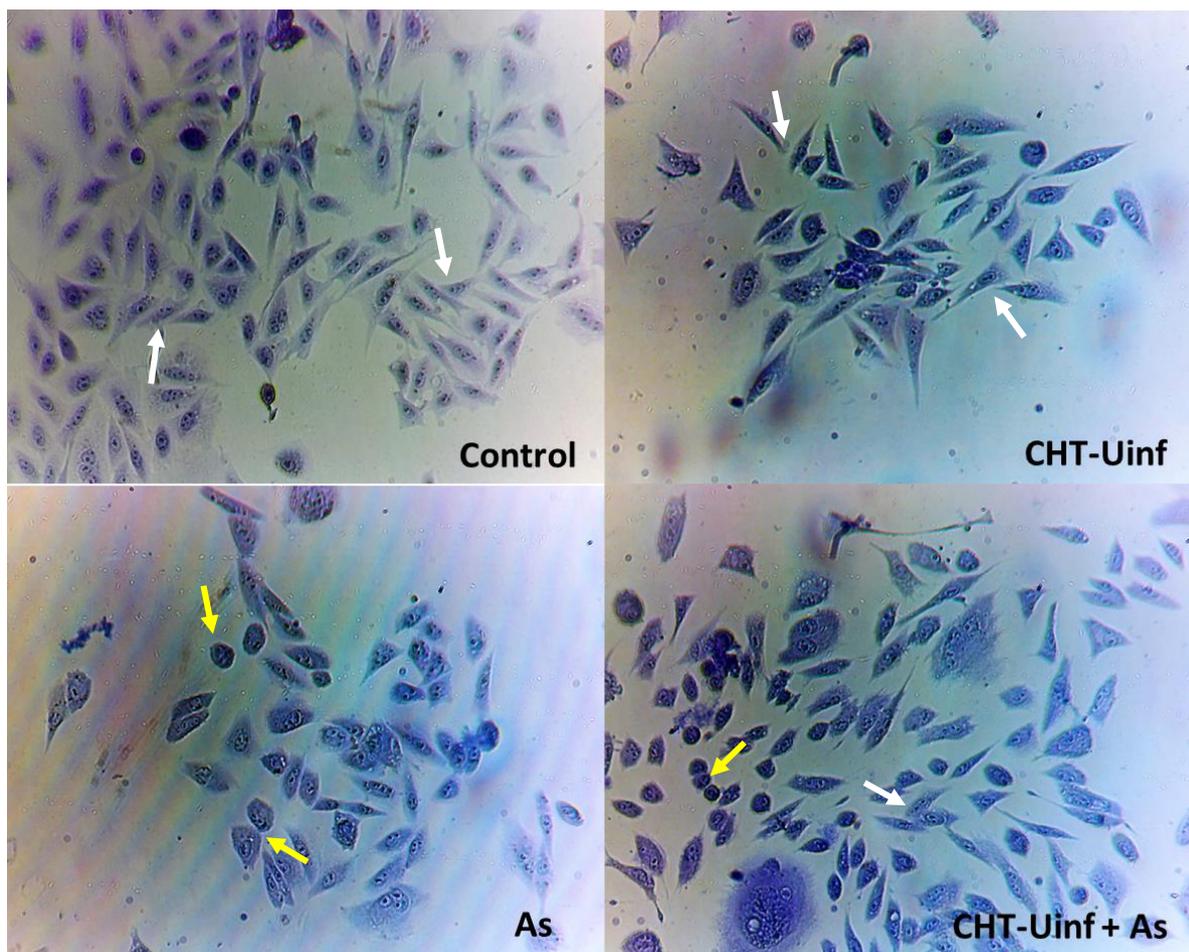


Figura 55: Fotografías representativas tomadas con microscopio (100X) de células expuestas a extracto CHT-Uinf 2µg/ml (fase inferior de la partición con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min), As 5 ppm, la combinación de ambos y el control teñidas con cristal violeta. Flechas blancas: células viables normales; flechas amarillas: células viables apoptóticas.

5.3.3. Determinación de hidroperóxidos celulares

Numerosos estudios han demostrado que existe una estrecha relación entre los contaminantes ambientales prooxidantes y el riesgo de desarrollar distintas enfermedades (entre otros: Mohammed Abdul *et al.* 2015; Tchounwou *et al.* 2019; Kocadal *et al.* 2020; Peters *et al.* 2021). La generación de EROs y ERNs así como el desequilibrio en el sistema de defensa antioxidante, se proponen como uno de los mecanismos principales de causa de enfermedades inducidas por este tipo de agentes químicos (Zheng *et al.* 2020). En condiciones homeostáticas, los radicales libres son producidos de manera controlada en reacciones de óxido-reducción como parte de un sistema fisiológico celular. Se ha demostrado que entre estos tóxicos ambientales, los metales pesados, el As y los plaguicidas generan EROs y ERNs y por consiguiente un desequilibrio en el estatus prooxidante/antioxidante. Este desbalance resulta en alteraciones conformacionales y oxidativas en biomoléculas claves como proteínas, lípidos y ácidos

nucleicos (Pisoschi *et al.* 2021). El As es un contaminante ambiental vinculado a numerosas enfermedades y se sabe que el principal mecanismo de su toxicidad es a través de la inducción de estrés oxidativo (Wang *et al.* 2019) el cual puede ser aminorado por antioxidantes vegetales, como se ha demostrado en diferentes estudios realizados por este grupo de investigación (entre otros: Soria 2008; Soria *et al.* 2014, 2015; Ramos Elizagaray *et al.* 2019). Por eso resultó interesante evaluar el efecto del extracto de cáscara de piñón sobre la formación de hidroperóxidos en células expuestas a As. Para estos ensayos, se tuvieron en cuenta los resultados mostrados previamente al evaluar citotoxicidad. Si bien 5 $\mu\text{g/ml}$ de As fueron suficientes para inducir algunos cambios morfológicos, consistentes con inicio de apoptosis, la cantidad de células teñidas con cristal violeta o las proporciones DAF/YP no evidenciaron diferencias significativas con los controles. Por esto, los ensayos a fin de evaluar la capacidad protectora de los extractos de cáscara de piñón, a través del análisis de la concentración de HP celulares, se realizaron con una concentración mayor de As. En estudios previos del grupo se determinó que las células CHO-K1 tratadas durante 2 h con hasta 15 $\mu\text{g/ml}$ de As no presentaron una disminución significativa de la tinción con cristal violeta con respecto al control, pero sí cambios significativos en la producción de hidroperóxidos, activación de quinasas y otros marcadores de estrés oxidativo (Bongiovanni *et al.* 2007; Soria *et al.* 2010a).

5.3.3.1. Determinación de hidroperóxidos acuosos (HP acuosos)

En primera instancia, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de As en la formación de HP. La Figura 56 muestra que no se encontraron diferencias significativas en la formación de hidroperóxidos acuosos entre el control y las células expuestas a 5 $\mu\text{g/ml}$ de As (concentración usada en ensayos mostrados en las secciones 5.3.1 y 5.3.2), mientras que se obtuvo un valor significativamente mayor de hidroperóxidos acuosos en las células tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de As (20 veces mayor con respecto al valor control). Estos resultados son coherentes con los mostrados anteriormente, que indican que la mayor parte de las células CHO-K1 tratadas con 5 $\mu\text{g/ml}$ de As (89%) estaría en una etapa muy temprana de la apoptosis. En consecuencia, 2 h de incubación con 10 $\mu\text{g/ml}$ de As fue la condición seleccionada para estudiar el efecto protector de los dos extractos de cáscara de piñón seleccionados por su alto poder antioxidante.

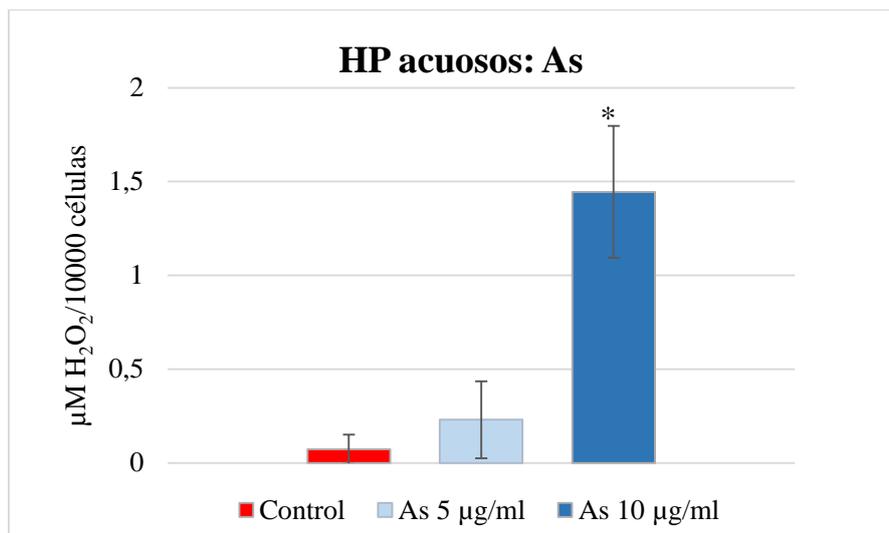


Figura 56: Formación de hidroperóxidos acuosos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, As 5 µg/ml y As 10 µg/ml. Los datos son promedio de dos experimentos con 8 réplicas, expresados en µM H₂O₂/10000 células. Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (Tukey, $p < 0,05$).

Se evaluó la formación de HP acuosos en células tratadas con los extractos CHT-U 60°C 25' y CTT-U 60°C 50' a diferentes concentraciones. Los resultados muestran que las células tratadas con el extracto CHT-U 60°C 25' en una concentración de 4 y 8 µg/ml no presentan diferencias significativas en la formación de HP acuosos con respecto al control, mientras que el extracto CTT-U 60°C 50' no presenta diferencias significativas a concentraciones menores o iguales a 20 µg/ml (Figura 57). Ambos extractos en concentraciones mayores aumentan significativamente la formación de HP acuosos en las células tratadas y esto es más notable con el extracto CTT-U 60°C 50', que muestra un aumento de 15,7 y 25,5 veces con respecto al control en las concentraciones de 40 µg/ml y 80 µg/ml, respectivamente (Figura 57). Estos resultados indican que los extractos pueden tener un efecto prooxidante dependiente de la concentración. Este fenómeno ha sido descrito para varios polifenoles (Scutto *et al.*, 2022).

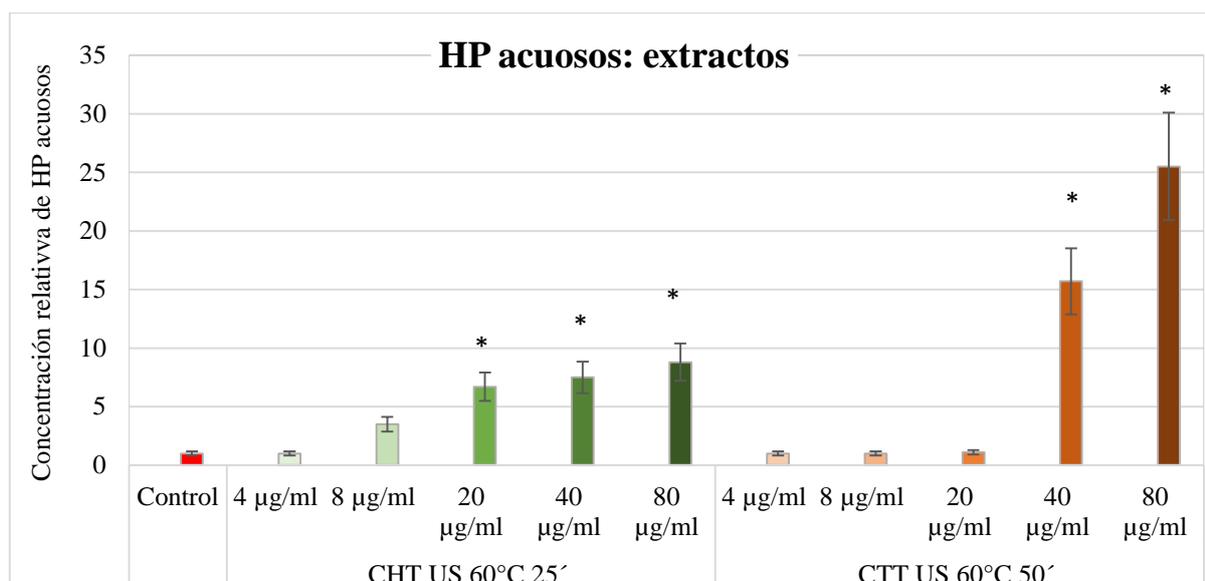


Figura 57: Formación de hidroperóxidos acuosos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT-U 60°C 25' y CTT-U 60°C 50' en distintas concentraciones (4, 8, 20, 40 y 80 µg/ml). CHT U 60°C 25m: extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C con posterior tratamiento con ultrasonido a 60°C durante 25 min; CTT U 60°C 50m: extracto de cáscara de piñones tostados a 100°C con posterior tratamiento con ultrasonido a 60°C durante 50 min. Los datos son promedio de dos experimentos con 8 réplicas, expresados en concentración relativa respecto al control (al control se le asignó un valor de 1, que corresponde a 0,11 µM H₂O₂/ 10000 células). Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (Tukey, p<0,05).

Para evaluar el posible efecto protector de los extractos frente a la exposición a 10 µg/ml de As, que aumentó 14 veces la cantidad de HP acuosos, se utilizaron las concentraciones 8 y 20 µg/ml de los mismos. Los resultados obtenidos muestran que las células expuestas a 10 µg/ml As y tratadas con 8 µg/ml del extracto CHT-U 60°C 25' no muestran diferencias significativas en la formación de HP acuosos en comparación con el control, lo que sugiere un fuerte efecto protector (Figura 58). Cuando se utiliza una mayor concentración de este extracto (20 µg/ml) se observa un aumento en la cantidad de HP acuosos, aunque el efecto es menor que el esperado de la sumatoria As+extracto (Figura 58). Lo mismo se observa en las células tratadas con 10 µg/ml de As en conjunto con 8 o 20 µg/ml del extracto CTT-U 60°C 50'. Es decir que, sólo el extracto CHT-U 60°C 25' fue capaz de inhibir totalmente la formación de HP inducida por As a una concentración baja (8 µg/ml), aunque las otras mezclas de As y extractos reflejan un valor de HP menor al esperable de la sumatoria o combinación de los resultados individuales. Estos resultados podrían indicar un fenómeno de hormesis, con un efecto protector importante a bajas concentraciones que disminuye conforme se aumenta la dosis, como se ha observado para algunos polifenoles (Carecho *et al.* 2022; Murakami 2022). Esto también podría reflejar el efecto prooxidante que se ha observado para la quercetina (presente en ambos extractos; Tabla

18) en células CHO-K1; sin embargo, este flavonoide es también capaz de prevenir en parte la producción de HP acuosos en estas células cuando es suministrado conjuntamente con As (Soria *et al.* 2007b, 2010a). Por otro lado, también estarían involucradas las respuestas del sistema antioxidante endógeno celular, que pueden ser diferencialmente afectadas por As, extractos y sus combinaciones que modulan sus efectos (Flora 2011).

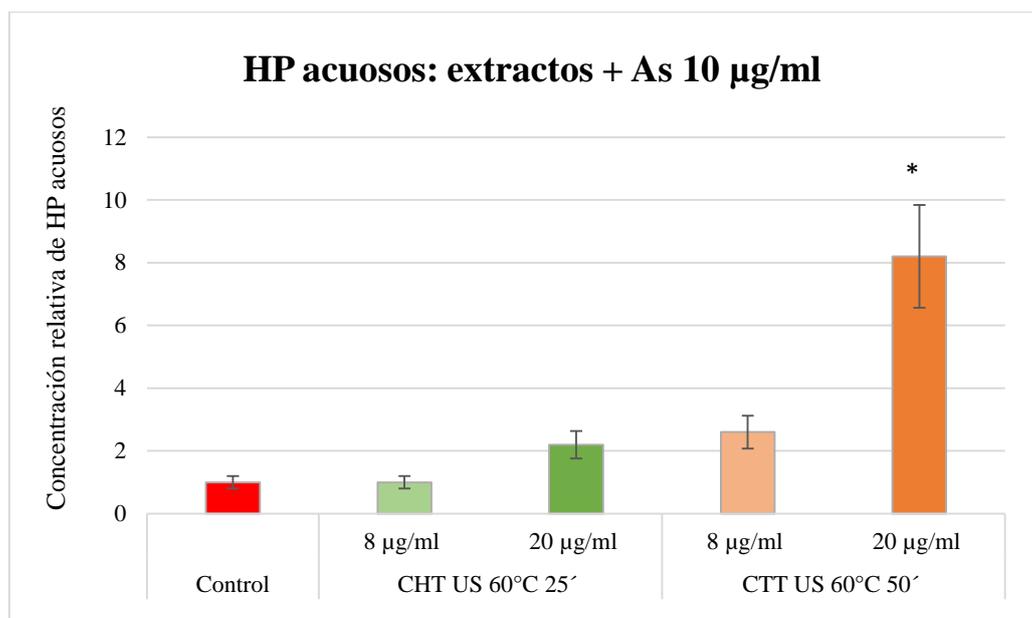


Figura 58: Formación de hidroperóxidos acuosos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT-U 60°C 25' y CTT-U 60°C 50' en distintas concentraciones (8 y 20 µg/ml) con 10 µg/ml de As. CHT U 60°C 25m: extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min; CTT U 60°C 50m: extracto de cáscara de piñones tostados a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 50 min. Los datos son promedio de dos experimentos con 8 réplicas, expresados en concentración relativa respecto al control (al control se le asignó un valor de 1, que corresponde a 0,11 µM H₂O₂/10000 células. Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (Tukey, p<0,05).

Para analizar con más detalle el efecto protector o prooxidante de los extractos sobre las células CHO-K1, se evaluó la formación de HP acuosos por exposición a dos concentraciones de las fracciones purificadas obtenidas por partición con acetato de etilo a partir de los extractos CHT-U 60°C 25' y CTT-U 60°C 50' (Figura 59). Las células tratadas con el extracto CHT-Uinf (acuoso) no mostraron diferencias significativas con el control, aunque las tratadas con el extracto CHT-Usup (orgánico) aumentaron significativamente en ambas concentraciones el contenido de HP acuosos de las células, lo cual denota un enriquecimiento del efecto prooxidante en la fracción orgánica. No se encontraron diferencias significativas entre el control

y ambas particiones provenientes del extracto de cáscaras tostadas (CTT-U sup o inf) a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$; mientras que a 40 $\mu\text{g/ml}$ aumentó significativamente la concentración de HP acuosos (Figura 59). Estos resultados podrían indicar que los factores responsables del efecto prooxidante del extracto CHT-U 60°C 25' (evidente a concentraciones superiores a 20 $\mu\text{g/ml}$) son particionados hacia la fase orgánica, mientras que el efecto prooxidante del extracto CTT-U 60°C 50' (observado a 40 $\mu\text{g/ml}$) se evidencia en ambas particiones, si bien resulta menor (Figura 59). También indicaría que la quercetina no sería la principal responsable del alto valor de HP acuosos observados bajo el tratamiento con CHT-Usup, porque el extracto CTT-Usup es el que contiene la mayor concentración de este flavonoide.

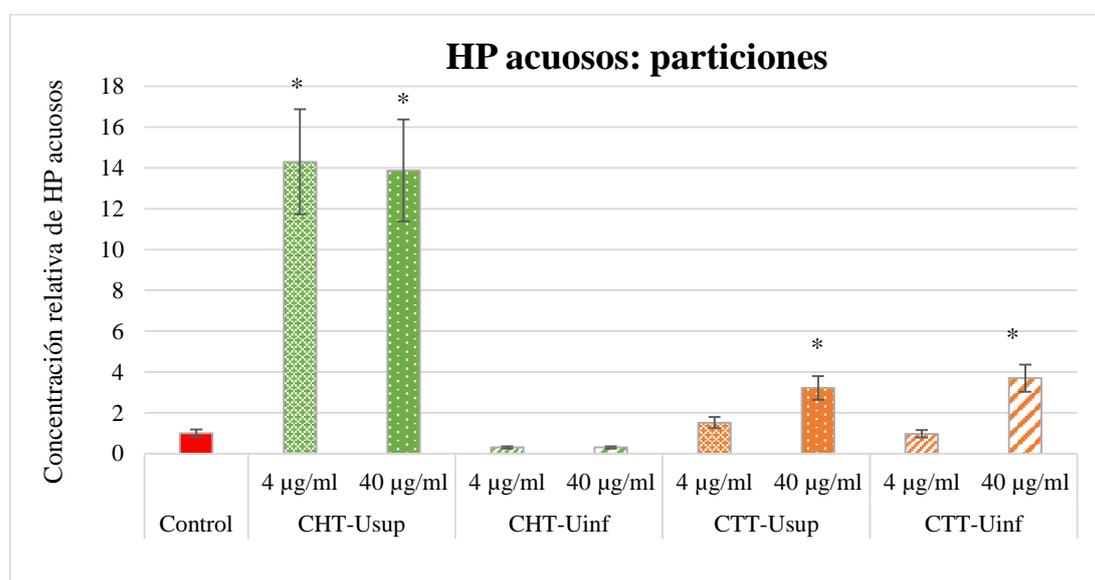


Figura 59: Formación de hidroperóxidos acuosos en células CHO-K1 expuestas durante 2 h: a los siguientes tratamientos: Extractos CHT-Usup, CHT-Uinf, CTT-Usup o CTT-Uinf en dos concentraciones (4 y 40 $\mu\text{g/ml}$) y control. CHT-Usup y CHT-Uinf: fase superior e inferior del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min; CTT-Usup y CTT-Uinf: fase superior e inferior del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones tostados obtenido con ultrasonido a 60°C durante 50 min. Los datos son promedio de dos experimentos con 8 réplicas, expresados en concentración relativa respecto al control (al control se le asignó un valor de 1, que corresponde a 0,11 μM $\text{H}_2\text{O}_2/10000$ células. Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (Tukey, $p < 0,05$).

Al analizar el efecto de los extractos sobre la concentración de HP acuosos en células expuestas conjuntamente con As (Figura 60), se observó que los valores obtenidos son menores que la sumatoria de los hallados en los tratamientos individuales (porque 10 $\mu\text{g/ml}$ de As inducía un aumento de 14 veces en la concentración de HP). Esto indicaría que todas las fracciones de los extractos evaluadas tienen un efecto protector, aunque sólo las fracciones de la cáscara tostada fueron capaces de prevenir totalmente el efecto prooxidante del As. La fase superior (CTT-

Usup es la que contiene los valores más altos de ácido gálico, catequina y quercetina, posiblemente involucrados en este efecto protector. Por otra parte, la fase orgánica del extracto de cáscara hervida (CHT-Usup), que presentó un efecto prooxidante (aumento de HP acuosos), tuvo un efecto levemente protector porque la concentración de HP resultantes del tratamiento combinado As+extracto fue menor que la sumatoria de los valores obtenidos en los tratamientos individuales. Se puede concluir que si bien los extractos analizados pueden presentar un efecto prooxidante que depende de la concentración utilizada, al ser suministrados conjuntamente con un agente prooxidante como el As, se manifiesta el efecto protector. Por otra parte, la proporción y actividad de los compuestos responsables de estos efectos contrapuestos sería modificada por el método de obtención del extracto (cáscara hervida o tostada) y la afinidad de los mismos por solventes acuosos u orgánicos.

En este sentido, la partición con acetato de etilo permitiría obtener una fase acuosa del extracto de cáscara hervida (CHT-Uinf), enriquecida en metabolitos capaces de contrarrestar el efecto del As sobre la producción de HP acuosos (2,6 vs. 14 veces el valor del control; CHT-Uinf+As vs. As).

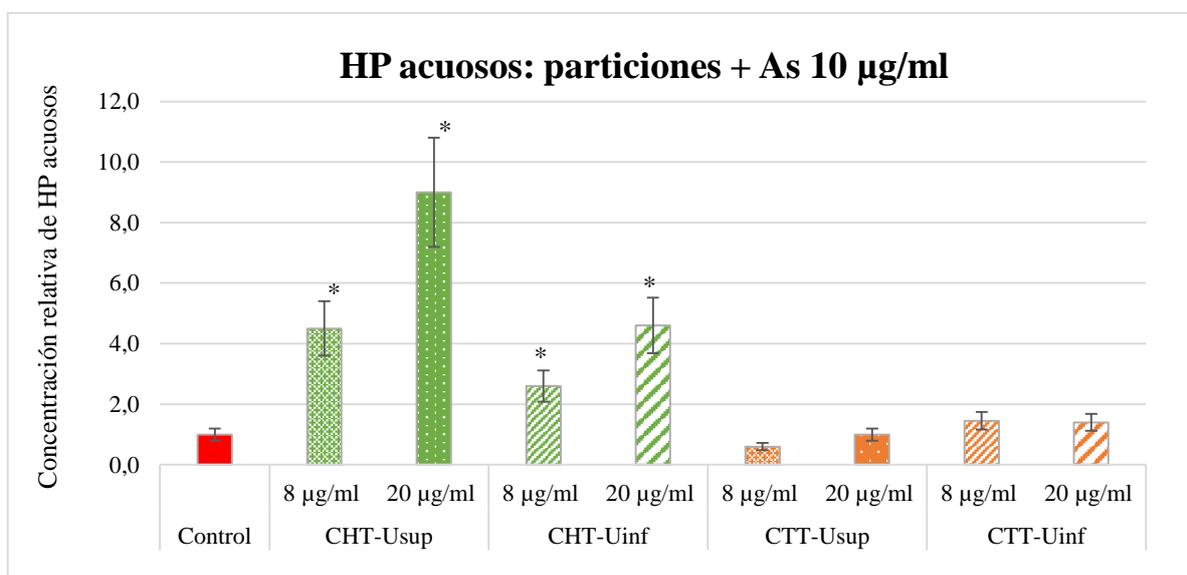


Figura 60: Formación de hidroperóxidos acuosos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT-Usup, CHT-Uinf, CTT-Usup o CTT-Uinf en dos concentraciones (8 y 20 µg/ml) con 10 µg/ml As. CHT-Usup y CHT-Uinf: fase superior e inferior del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min; CTT-Usup y CTT-Uinf: fase superior e inferior del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones tostados obtenido con ultrasonido a 60°C durante 50 min. Los datos son promedio de dos experimentos con 8 réplicas, expresados en concentración relativa respecto al control (al control se le asignó un valor de 1, que corresponde a 0,11 µM H₂O₂/10000 células. Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (Tukey, p<0,05).

5.3.3.2. Determinación de hidroperóxidos lipídicos (HP lipídicos)

Los productos iniciales de la peroxidación de los lípidos, generalmente ácidos grasos poliinsaturados, son los hidroperóxidos lipídicos. Estas sustancias activas se descomponen en varios aldehídos (malondialdehído es el más conocido) o, si el ácido graso original es el ácido araquidónico, en isoprostanos. Todos estos productos de degradación y descomposición se utilizan en la evaluación del estrés oxidativo, por lo que los HP lipídicos sólo representan uno de los tantos marcadores de este proceso complejo (Dotan *et al.* 2004). En secciones anteriores se ha mostrado que las células CHO-K1 expuestas a 5 $\mu\text{g/ml}$ de As presentan algunas alteraciones coherentes con un estadio temprano de apoptosis, viables y redondeadas (89% del total) (Figura 53). Resultados previos, indican que la muerte celular sólo es observada con dosis superiores a 15 $\mu\text{g/ml}$ de As (Bongiovanni *et al.* 2007) o después de 4 horas de incubación (Soria *et al.* 2010b). En la Figura 61 se observa que 5 o 10 $\mu\text{g/ml}$ de As no fueron suficientes para alterar la producción de HP lipídicos, aunque se observó un aumento significativo de la concentración de HP acuosos. Esto indicaría que el sistema antioxidante endógeno sería capaz de controlar en parte el estado redox en las condiciones ensayadas, y así evitar un daño oxidativo significativo en membranas, en estadios tempranos de apoptosis.

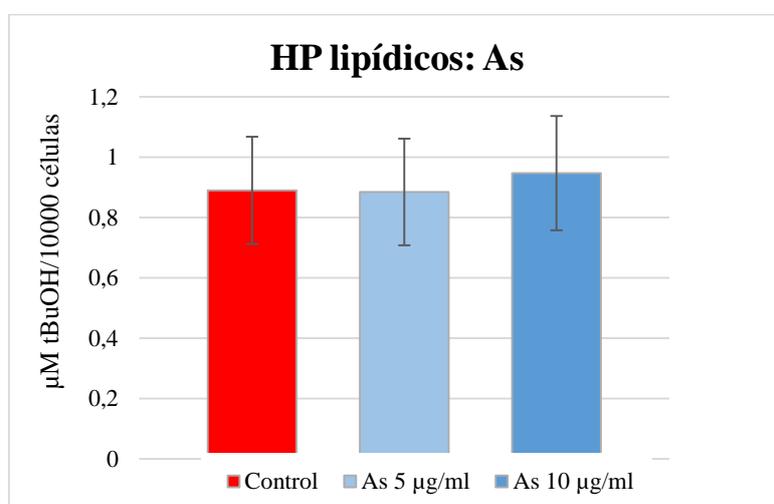


Figura 61: Formación de hidroperóxidos lipídicos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, As 5 $\mu\text{g/ml}$ y As 10 $\mu\text{g/ml}$. Los datos son promedio de dos experimentos con 8 réplicas, expresados en $\mu\text{M tBuOH/10000 células}$.

Por otra parte, tampoco se observaron diferencias significativas en la formación de HP lipídicos en comparación con el control, cuando las células fueron expuestas a los extractos CHT-U 60°C 25' o CTT-U 60°C 50', en las concentraciones ensayadas (Figura 62). Si bien se había observado que ambos extractos causaban un aumento de HP acuosos en concentraciones ≥ 20

$\mu\text{g/ml}$ para CHT-U 60°C 25' y $\geq 40 \mu\text{g/ml}$ para CTT-U 60°C 50'. Esto podría indicar que los extractos tienen efecto prooxidante evidenciado en la formación de H_2O_2 y otros peróxidos acuosos, sin embargo no ocasionaría daño por peroxidación de lípidos de membrana en las concentraciones ensayadas.

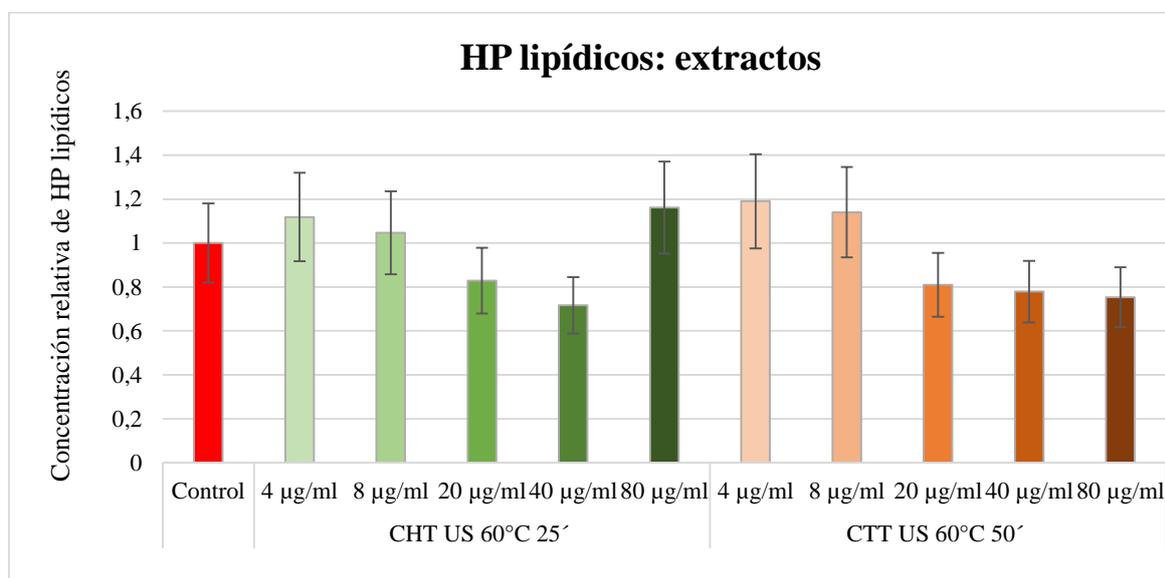


Figura 62: Formación de hidroperóxidos orgánicos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT US 60°C 25' y Extracto CTT US 60°C 50' en distintas concentraciones (4, 8, 20, 40 y $80 \mu\text{g/ml}$). CHT U 60°C 25m: extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C con posterior tratamiento con ultrasonido a 60°C durante 25 min; CTT U 60°C 50m: extracto de cáscara de piñones tostados a 100°C con posterior tratamiento con ultrasonido a 60°C durante 50 min. Los datos son promedio de dos experimentos con 8 réplicas, expresados en concentración relativa respecto al control (al control se le asignó un valor de 1, que corresponde a $0,9 \mu\text{M tBuOH}/10000$ células).

Los resultados mostrados en la Figura 63 denotan que las células expuestas a $10 \mu\text{g/ml}$ de As y tratadas conjuntamente con diferentes concentraciones de los extractos CHT US 60°C 25' o CTT US 60°C 50' no presentan alteraciones significativas en la concentración de HP lipídicos respecto al control. Estos resultados se repiten cuando se particionan en fases orgánicas (superior) y acuosas (inferior) (Figuras 64 y 65). Sin embargo, dicho extracto en conjunto con As no presentó diferencias significativas con el control. El único tratamiento que presentó un efecto significativo fue As+CTT-Uinf $20 \mu\text{g/ml}$ en el cual disminuyen significativamente los HP lipídicos respecto al control. Los extractos CTT-U (inf y sup) habían mostrado la capacidad de revertir totalmente el aumento de HP acuosos cuando fueron incorporados junto con As. En este caso, la combinación As+CTT-Uinf $20 \mu\text{g/ml}$ sería capaz de disminuir la concentración de HP lipídicos, por debajo del valor control. Sin embargo, se repite el hecho de que la combinación de ambos puede tener un efecto diferente al del As y los extractos por separado.

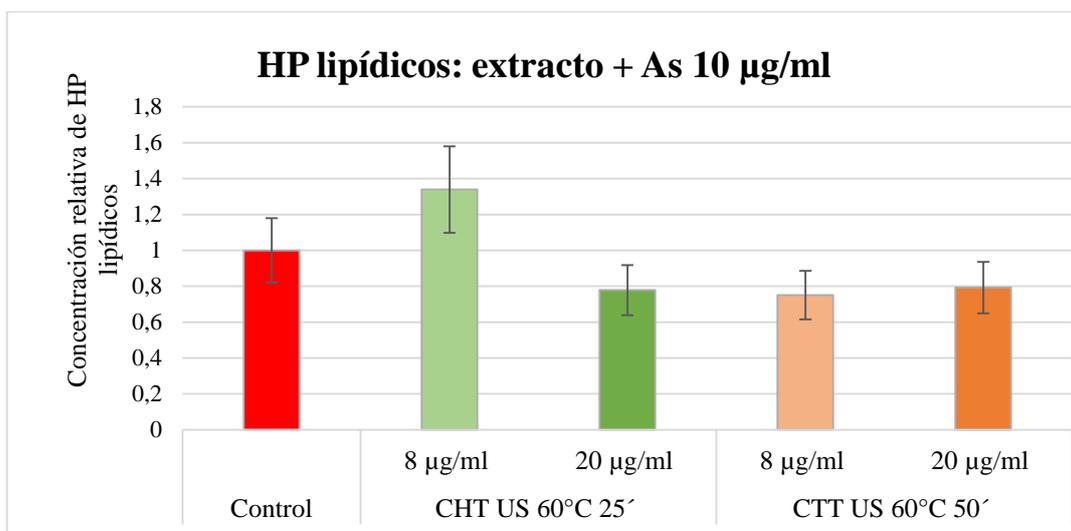


Figura 63: Formación de hidroperóxidos orgánicos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT US 60°C 25' y CTT US 60°C 50' en distintas concentraciones (8 y 20 µg/ml) con 10 µg/ml de As. CHT U 60°C 25m: extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min; CTT U 60°C 50m: extracto de cáscara de piñones tostados a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 50 min. Los datos son promedio de dos experimentos con 8 réplicas, expresados en concentración relativa respecto al control (al control se le asignó un valor de 1, que corresponde a 0,9 µM tBuOH/10000 células).

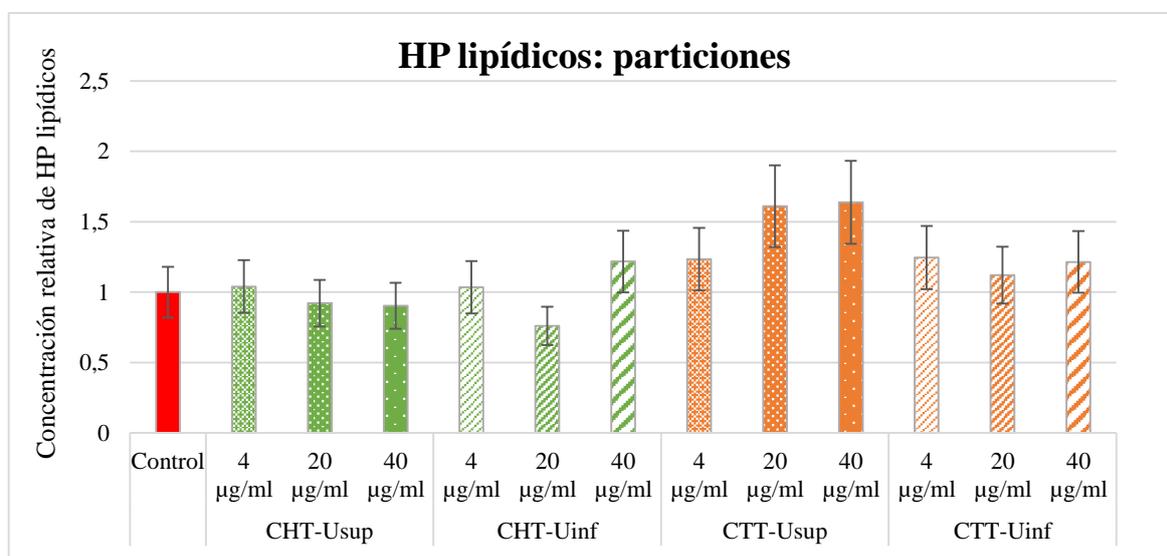


Figura 64: Formación de hidroperóxidos orgánicos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT-Usup, CHT-Uinf, CTT-Usup y CTT-Uinf en distintas concentraciones (4, 20 y 40 µg/ml). CHT-Usup y CHT-Uinf: fase superior e inferior del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min; CTT-Usup y CTT-Uinf: fase superior e inferior del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones tostados obtenido con ultrasonido a 60°C durante 50 min. Los datos son promedio de dos experimentos con 8 réplicas, expresados en concentración relativa respecto al control (al control se le asignó un valor de 1, que corresponde a 0,9 µM tBuOH/10000 células).

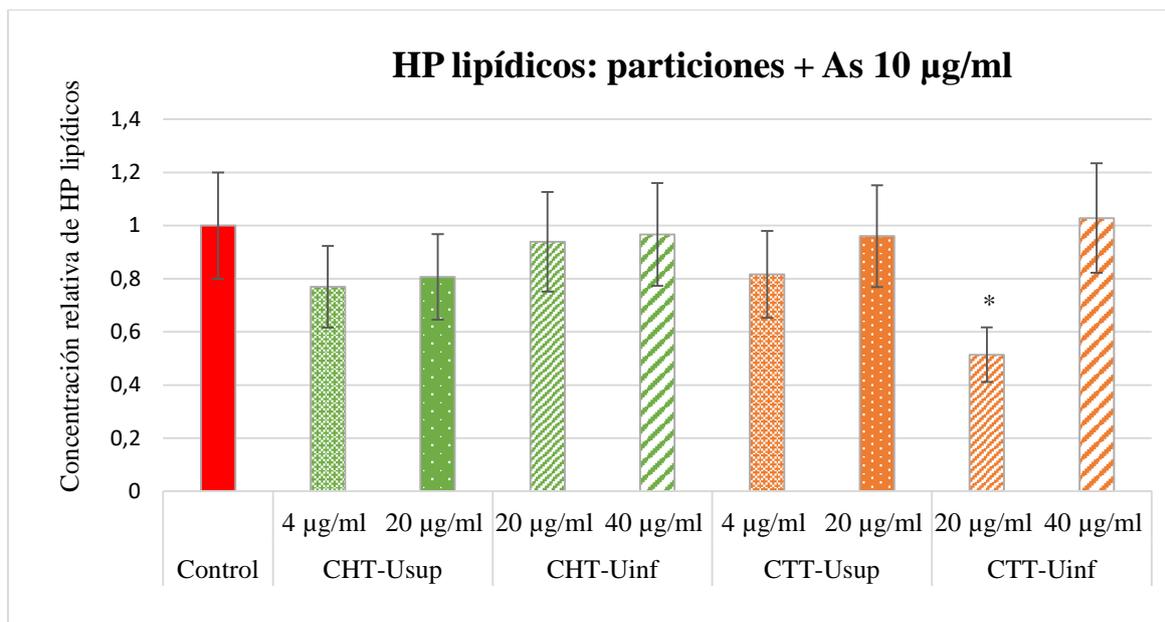


Figura 65: Formación de hidroperóxidos orgánicos en células CHO-K1 cultivadas bajo las siguientes condiciones por 2 h: Control, Extracto CHT-USup, CHT-Uinf, CTT-USup y CTT-Uinf en distintas concentraciones (4, 20 y 40 µg/ml) con 10 µg/ml de As. CHT-USup y CHT-Uinf: fase superior e inferior del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min; CTT-USup y CTT-Uinf: fase superior e inferior del fraccionamiento con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones tostados obtenido con ultrasonido a 60°C durante 50 min. Los datos son promedio de dos experimentos con 8 réplicas, expresados en concentración relativa respecto al control (al control se le asignó un valor de 1, que corresponde a 0,9 µM tBuOH/10000 células). Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (Tukey, $p < 0,05$).

5.3.4. Actividad enzimática

5.3.4.1. Actividad de la enzima Glutación S-transferasa

Al determinar la actividad específica de GST se observó un incremento significativo del 30% en las células CHO-K1 expuestas a 5 µg/ml de As con respecto al control (Figura 66). Estos resultados concuerdan con estudios sobre el efecto del As en el sistema antioxidante de células y tejidos de mamíferos, en los que se ha observado un incremento de la actividad de la enzima GST, como también de las enzimas SOD y Glutación peroxidasa (GPx), las cuales forman parte del sistema antioxidante endógeno (Oyagbemi *et al.* 2017; Wang *et al.* 2019). Esto se asocia con la existencia de una respuesta antioxidante que se activa en presencia de ciertos compuestos o elementos, incluido el As, para contrarrestar un desbalance del estado redox y que involucra al factor 2 relacionado con el factor nuclear E2 (Nrf2) (Wang *et al.* 2019). Este factor de transcripción responde a dicho estrés uniéndose al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en el promotor de genes que codifican enzimas con funciones antioxidantes y detoxificantes (Vomhof-DeKrey y Picklo 2012). Por otra parte, es importante señalar que en otros estudios se

ha encontrado que la exposición a As durante un tiempo más prolongado o en mayor concentración provoca una disminución significativa de la actividad de GST, lo que denota un efecto contraproducente de este metaloide que conduce a daño oxidativo (Dobritzsch *et al.* 2020). Por lo tanto, los resultados hallados muestran una respuesta adaptativa a baja concentración (que probablemente involucra a la respuesta protectora del sistema Nrf2/ARE) y un efecto tóxico a una mayor concentración de As (aumento de HP acuosos). Cabe aclarar que en este estudio, se observó que si bien las células CHO-K1 expuestas a 5 µg/ml de As estarían en un estadio temprano de apoptosis, el porcentaje de viabilidad fue similar al control.

Por su parte, el extracto de cáscara de piñón, CHT-Uinf, también causó un aumento significativo de la actividad de GST con respecto al control (Figura 66). En relación a este resultado, se ha encontrado que los compuestos fenólicos de infusiones de *Camelia sinensis*, extractos de pulpa de manzana y de granada aumentan la expresión génica de enzimas antioxidantes y detoxificantes a través de la inducción del factor de transcripción Nrf2 (Kim *et al.* 2014; Sharma *et al.* 2016; Li *et al.* 2017; Truong y Jeong 2022). En particular, el flavonoide quercetina, que ha sido identificado en el extracto CHT-Uinf, es una de las sustancias que dispara la respuesta del ARE (Ma y He 2012). Por último, la actividad de GST en el tratamiento que combina As con extracto no presentó diferencias significativas con la del control, lo que evidencia la anulación de las respuestas individuales de estos tratamientos. Es importante señalar que no se produjo disminución de la actividad enzimática bajo ningún tratamiento. En las condiciones ensayadas de tiempo, concentración y línea celular, de manera similar a lo descrito en las secciones anteriores se observa que las respuestas o valores obtenidos en tratamientos conjuntos de extractos y As, no corresponden a la sumatoria de los individuales. Esto se relacionaría con que los polifenoles, al participar de diferentes vías de señalización y activar respuestas adaptativas, presentan una notable capacidad para modular diferentes mecanismos como la respuesta al estrés oxidativo, la toxicidad de los metales, la apoptosis y la respuesta del sistema inmune, entre otros (Carecho *et al.* 2022; Murakami 2022).

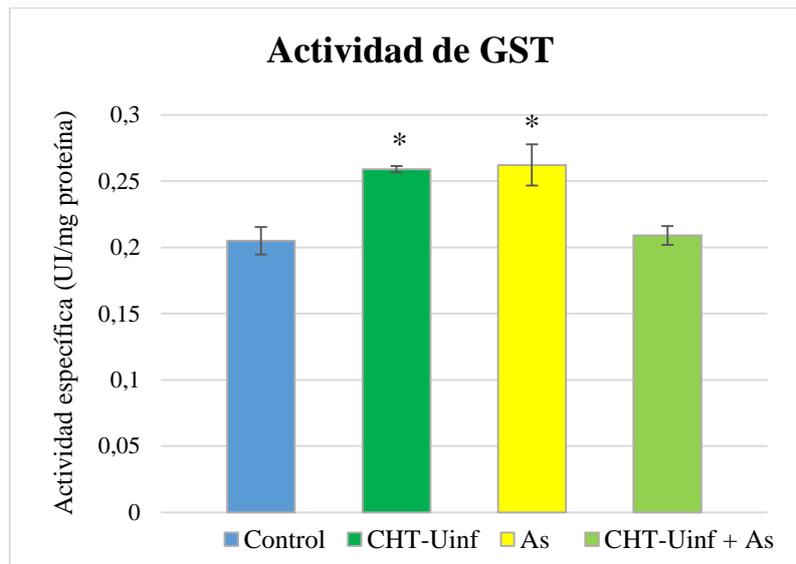


Figura 66: Actividad específica de GST expresada en UI/mg proteína en células CHO-K1 expuestas 2 h a 400 µg/ml de extracto CHT-Uinf (fase inferior de la partición con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min), 5 µg/ml de As, la combinación de ambos y el control. Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control Tukey, ($p < 0,05$).

5.3.4.2. Actividad de la enzima catalasa

La actividad específica de la enzima catalasa (CAT) no difirió significativamente entre el tratamiento con extracto CHT-Uinf y el control, con valores de 32,85 y 34,75 UI/mg de proteína, respectivamente (Figura 67). Por su parte, el tratamiento con As aumentó levemente la actividad de CAT con respecto al control y este aumento no fue observado en el tratamiento con As y extracto o con extracto solo, ya que no se encontraron diferencias significativas en la actividad de CAT respecto al control (Figura 67). Este resultado concuerda con la alteración que generó el As en la enzima GST, que denota un efecto protector a una baja concentración y un tiempo corto de exposición. En general, la exposición a corto plazo a bajas concentraciones de As puede aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes; mientras que la exposición crónica disminuye su actividad (Flora 2011). Se ha demostrado que el daño oxidativo del As en células puede ser disminuido con el agregado de las enzimas CAT y SOD por su acción de dismutación de EROs como el H_2O_2 y el anión superóxido, respectivamente (Kessel *et al.* 2002). Por otro lado, en dos estudios de ratas, se encontró que el extracto obtenido de brácteas de *A. angustifolia* prevenía la alteración en la actividad de CAT, que se incrementaba bajo estrés oxidativo (Souza *et al.* 2014; de Souza Machado *et al.* 2015).

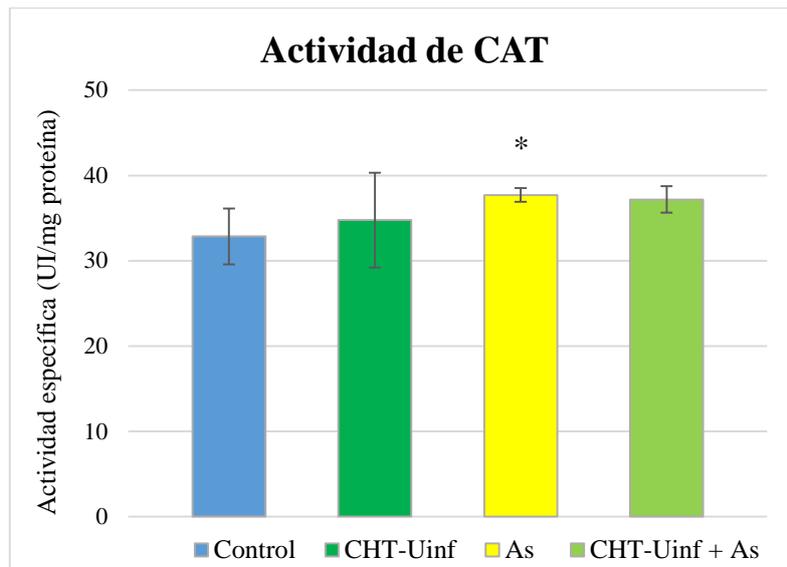


Figura 67: Actividad específica de catalasa expresada en UI/mg proteína en células CHO-K1 expuestas 2 h a 400 $\mu\text{g/ml}$ de extracto CHT-Uinf (fase inferior de la partición con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min), 5 $\mu\text{g/ml}$ de As, la combinación de ambos y el control. Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (Tukey, $p < 0,05$).

5.3.4.3. Contenido de proteínas totales

Los resultados de contenido de proteínas en el sobrenadante de células sometidas a los tratamientos y el control, se muestran en la Figura 68. Tanto en el tratamiento con As como en el del extracto de cáscara de piñón CHT-Uinf por separado, se observó un aumento significativo del contenido de proteínas respecto al control. Como se mostró previamente, este extracto causó un aumento en el número total de células que estaría relacionado con el valor observado en el contenido de proteínas. Asimismo, se conoce que diversos nutraceuticos de origen vegetal pueden inducir la transcripción de los vitagenes (numerosos genes involucrados en reparación), lo que llevaría a un aumento de la expresión de las proteínas que proporcionan los medios para mantener la homeostasis (Franco *et al.* 2022). Por otra parte, como se describió previamente, el As en las condiciones ensayadas no afectó significativamente el número de células totales, si bien se ha reportado que este metaloide a bajas concentraciones genera la activación de vías vinculadas a la respuesta al estrés, entre ellas, la proliferación a través de la cascada de quinasas activadas por mitógenos (MAPK); mientras que a altas concentraciones activa vías que conducen a la apoptosis (Minatel *et al.* 2018; Medda *et al.* 2021). En el presente estudio, se observó que el As incrementó los HP acuosos pero no causó alteración en membranas ya que no aumentó el nivel de HP lipídicos y las células mantuvieron su integridad. Asimismo, tanto

este metaloide como el extracto de cáscara de piñón CHT-Uinf, incrementaron la actividad de GST, consistente con la inducción de una respuesta adaptativa temprana. Así, los aumentos en la concentración de proteínas, inducidos por los tratamientos As y extracto CHT-Uinf de forma individual, serían coherentes con la activación del proceso denominado “respuesta al estrés”, inducido para contrarrestar los efectos de los mismos. Este efecto sería atenuado cuando se realiza la exposición conjunta a extracto y As. En este sentido, la concentración de proteínas celulares mostró el mismo perfil que el observado para los otros parámetros estudiados: la concentración de proteínas de la combinación de ambos tratamientos no mostró diferencias significativas con respecto al control.

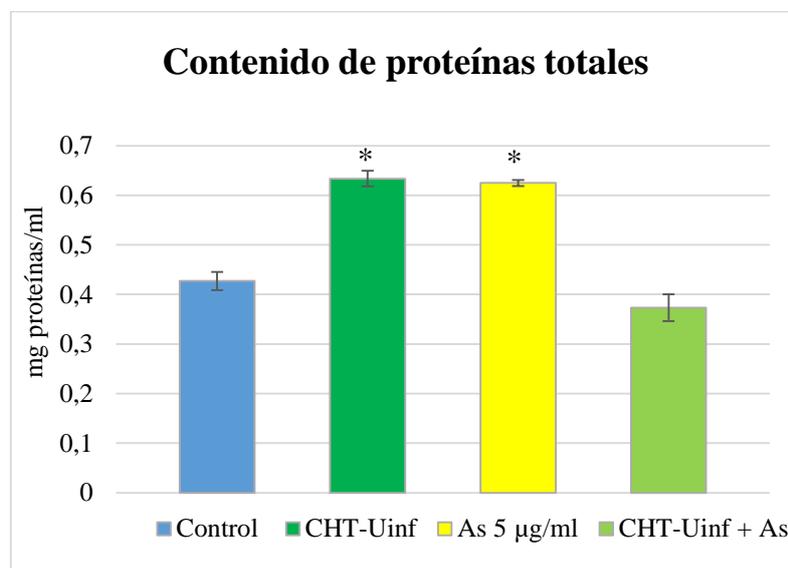


Figura 68: Contenido de proteínas totales en células CHO-K1 expuestas 2 h a 400 µg/ml de extracto CHT-Uinf (fase inferior de la partición con acetato de etilo del extracto de cáscara de piñones hervidos a 100°C obtenido con ultrasonido a 60°C durante 25 min), 5 µg/ml de As, la combinación de ambos y el control. Asteriscos indican diferencias significativas con el control (Tukey, $p < 0,05$).

5.3.5. Actividad de extracto de cáscara de piñón *in vivo*

Como se ha discutido previamente, diversas drogas citostáticas, como la ciclofosfamida (CF) son capaces de aumentar la generación de EROs, que promueven alteraciones clínicas e histológicas en la mucosa oral y tejidos periodontales, como también, disfunciones en las glándulas salivales y cambios en la saliva en ratas y humanos (Bachmeier *et al.* 2014, 2019). La enzima superóxido dismutasa (SOD) y el ácido úrico (AU) secretados por las glándulas salivales son los principales compuestos responsables del potencial antioxidante de la saliva y han sido correlacionados positivamente con la salud oral. Además, existe evidencia de que el

consumo de polifenoles aumenta las defensas antioxidantes a través del aumento del contenido de AU y la actividad de SOD (Li *et al.* 2011; Varoni *et al.* 2013). Teniendo en cuenta estas consideraciones, se examinó el efecto del extracto de cáscara de piñón en la actividad de SOD, en el contenido de AU y en la lipoperoxidación (contenido de malondialdehído, MDA) en glándulas submandibulares de ratas tratadas con CF. La Figura 69 muestra que las glándulas salivales de las ratas control presentaron un balance entre los agentes de respuesta antioxidante SOD y AU, y el marcador de daño oxidativo MDA en una proporción 1,1:1,9:1. Se observó un aumento significativo en la actividad de SOD (235%) en las glándulas submandibulares de ratas tratadas con CF con respecto al control. De manera similar, en pacientes bajo tratamiento con quimioterapia con CF, la actividad de la enzima SOD salival aumenta como un mecanismo de defensa en contra del estrés oxidativo producido por el tratamiento (Bachmeier *et al.* 2014). Por otra parte, no se observó un aumento significativo en la lipoperoxidación (contenido de MDA) en las glándulas salivales de ratas tratadas con CF (Figura 69), por lo cual se puede deducir que el aumento de la actividad de SOD sería suficiente para evitar el daño oxidativo en membranas de las glándulas. En cuanto al contenido de AU, no se observaron en el presente estudio diferencias significativas en el tratamiento con CF con respecto al control. Sin embargo, se ha encontrado que en ratones el AU provee una protección significativa contra la depresión de la médula ósea (disminución de producción de células sanguíneas) y la inducción de micronúcleos causadas por el tratamiento con CF (Al-Bekairi *et al.* 1991).

En este estudio, se observó un aumento significativo de los antioxidantes endógenos (605 y 436%, SOD y AU, respectivamente) en las glándulas de ratas tratadas con el extracto antioxidante exógeno (extracto de cáscara de piñón, CTFC) con respecto al control. Un resultado similar se obtuvo con el tratamiento que combina el extracto con la droga citostática. (661 y 314%, SOD y AU, respectivamente) (Figura 69). Se ha descrito que tanto AU como SOD inducen resistencia al estrés y pueden extender la esperanza de vida (Sun *et al.* 2014; Wan *et al.* 2020). El incremento de SOD inducido por el extracto solo o combinado con CF, resultó mayor al observado con la droga CF aislada (Figura 69). Adicionalmente, el extracto mostró capacidad de aumentar los niveles del antioxidante AU, a diferencia de la CF. El AU es un antioxidante natural que participa en la remoción del anión superóxido, y así previene la degradación de SOD, enzima responsable de eliminar las EROs de las células (Kutzing y Firestein 2008). Por tanto, el extracto de cáscara de piñón es capaz de mejorar *in vivo* la respuesta antioxidante salival de las ratas. Es importante señalar, sin embargo, que en todos los tratamientos la respuesta tisular (aumento de SOD y/o AU) fue suficiente para evitar la peroxidación lipídica ya que los valores de MDA fueron similares a los del control.

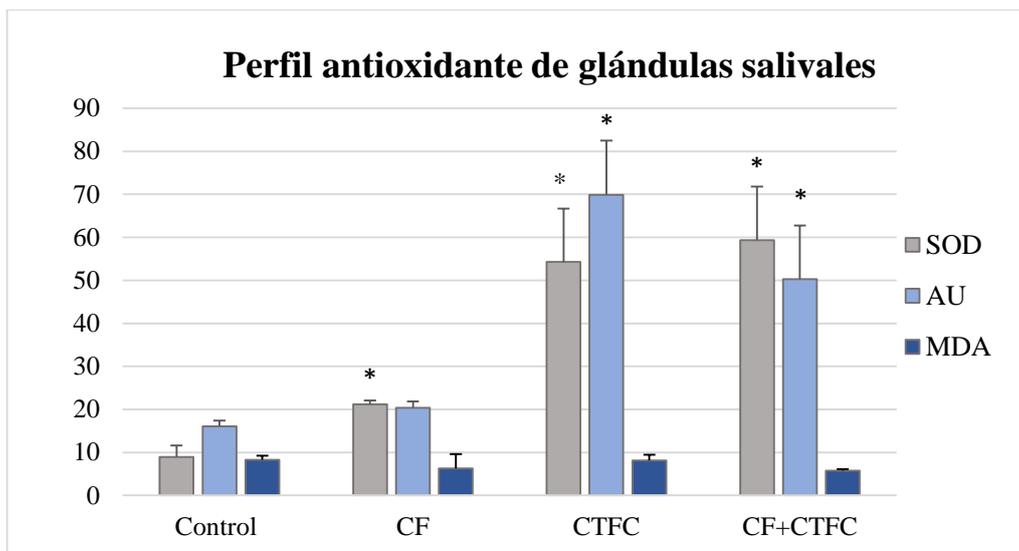


Figura 69: Efecto del extracto de cáscara de piñón (CTFC, extracto de cáscara total de piñones frescos en agua a 100°C), ciclofosfamida (CF), y el cotratamiento (CTFC+CF) en la actividad de superóxido dismutasa (SOD; unidades/g), contenido de ácido úrico (AU; mg/g) y de malondialdehído (MDA; M/g) en glándulas submandibulares de ratas Wistar. Control: ratas no tratadas. Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (Tukey, $p < 0,05$).

5.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos de los estudios en modelo *in vitro* indican que el extracto obtenido a partir de cáscaras de piñones hervidos, elegido por su alto poder antioxidante, no presenta citotoxicidad en células CHO-K1, y adicionalmente es capaz de causar un aumento del número promedio de células con características de células viables en interfase y una disminución de células necróticas, con respecto a los demás tratamientos. Además, este extracto antioxidante al ser aplicado con As presenta un efecto protector al aumentar la proporción de células viables normales, respecto al tratamiento con As solo.

Por otra parte, las fracciones obtenidas mediante partición con acetato de etilo de los extractos acuosos de cáscara de piñón seleccionados manifiestan un efecto protector al ser capaces de atenuar el efecto del As sobre la producción de HP acuosos. En particular, las fracciones obtenidas a partir de cáscara tostada fueron capaces de prevenir totalmente el efecto prooxidante del As, principalmente la fase superior (CTT-Usup) rica en quercetina, catequina y ácido gálico. Los tratamientos ensayados no causarían daño oxidativo significativo en membranas ya que no se observa aumento de HP lipídicos. Por su parte, la fracción inferior del extracto de cáscara tostada (CTT-Uinf 20 µg/ml) es la única que muestra un efecto a nivel de hidroperóxidos lipídicos, al disminuir su concentración en células coexpuestas a éste y As.

El extracto de cáscara de piñón (CHT-Uinf) aumenta la actividad de GST probablemente a

través de la señalización de Nrf2 y ARE, como ha sido documentado para compuestos fenólicos. Sin embargo, el extracto al ser suministrado juntamente con As anula la inducción de la actividad enzimática de GST y CAT así como también el aumento del contenido de proteínas totales causadas por el As, de manera similar a lo observado para los niveles de hidroperóxidos acuosos.

Los ensayos *in vivo* demostraron que el extracto de cáscara de piñón es capaz de inducir un aumento significativo de las defensas antioxidantes endógenas de la saliva de ratas aún en presencia de CF, lo que puede proporcionar una alta protección frente a un estado de estrés oxidativo. Esta capacidad del extracto puede ser particularmente relevante para el desarrollo de tratamientos complementarios que ayuden a prevenir el dolor, la odinodisfagia, la disgeusia, la deshidratación, la desnutrición y las infecciones sistémicas asociadas con la mucositis oral relacionada con el tratamiento de pacientes con cáncer.

En síntesis, el extracto de cáscara de piñón constituye un residuo de la industria alimenticia que contiene un alto poder antioxidante, capaz de ser extraído eficientemente con agua, la asistencia de ultrasonido, temperatura y posterior eliminación de componentes menos polares. Este extracto no manifiesta actividad citotóxica, aunque puede presentar un efecto prooxidante a altas concentraciones (de acuerdo a nuestros protocolos experimentales). Esta dualidad antioxidante/prooxidante, dispara una respuesta adaptativa que es capaz de contrarrestar los efectos dañinos de agentes de alta toxicidad como el As o la CF. Por lo tanto, los resultados señalan que sería correcta la hipótesis relacionada al aprovechamiento de este residuo como nutracéutico y/o quimioprotector.

CAPITULO 6

ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTICORROSIVA DE LA CÁSCARA DEL PIÑÓN

6. 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Se define como corrosión al fenómeno que causa la degradación de un material a causa del intercambio de iones con un medio agresivo, lo cual resulta en la pérdida de propiedades del material. La corrosión ocurre por reacciones de óxido-reducción que se desarrollan entre un material y el medio en el que se encuentra, y son consideradas las más perjudiciales ya que representan costos anuales multimillonarios debido a destrucciones de equipos y estructuras metálicas (Asmara *et al.* 2018). El acero inoxidable es una aleación ampliamente utilizada en varios campos de la industria moderna debido a su alta resistencia a la corrosión y oxidación. Sin embargo, es aún susceptible a la corrosión en algunos procesos industriales lo que genera un problema industrial importante.

Uno de los principales métodos para combatir la corrosión es el uso de inhibidores, que protegen la superficie de los metales del ataque corrosivo y retardan la tasa de deterioro del material (Ituen *et al.* 2020). Estas sustancias se utilizan en bajas concentraciones para controlar los efectos de la corrosión en procesos industriales o bien, son usados en las formulaciones de pinturas anticorrosivas.

Entre otros, las soluciones ácidas son ampliamente usadas en procesos industriales para la limpieza y descalcificación de las superficies metálicas durante los procesos de producción y almacenamiento, lo que facilita su posterior corrosión (Marzorati *et al.* 2019). Es por esto que los inhibidores de la corrosión suelen ser incorporados a estos medios ácidos y generalmente, están formados por compuestos orgánicos, los cuales pueden ser muy efectivos a concentraciones bajas ya que son solubles en ese tipo de medios. Los inhibidores verdes de la corrosión son comúnmente elaborados a partir de extractos de plantas que son abundantes en muchos países. Estos se adsorben a la superficie del metal y proporcionan sitios de fijación de electrones gracias a que contienen átomos de O, N, P y S, múltiples enlaces y anillos aromáticos en su estructura molecular (Peter *et al.* 2015; Asmara *et al.* 2018; Ituen *et al.* 2020). Se conoce que estos átomos coordinan con los iones metálicos y forman films protectores en la superficie del metal, que inhiben el proceso de corrosión causado por el fluido ácido usado en el proceso industrial de limpieza y descalcificación (Ituen *et al.* 2020).

En los últimos años, los extractos vegetales han sido considerados como una fuente de compuestos orgánicos naturales, que por un procedimiento simple y de bajo costo pueden ser extraídos y utilizados como anticorrosivos, con una baja toxicidad y sin representar un riesgo para el ambiente a diferencia de los productos sintéticos usados para ese fin.

Se ha demostrado que el extracto de la cáscara del piñón tiene un alto poder antioxidante, es decir que tiene una alta capacidad de aceptación de electrones y que el 2,38% del peso de la

cáscara hervida son fenoles fácilmente extraíbles. Este sería un recurso de aplicación industrial muy asequible y doblemente ecológico, dado que la materia prima es un residuo y que la extracción se realiza con agua.

6.1.1. Hipótesis

El extracto de cáscara de piñón presenta alta capacidad para contrarrestar o prevenir los efectos corrosivos del medio ácido en metales.

6.1.2. Objetivo

Evaluar la capacidad del extracto de cáscara de piñón de inhibir la corrosión de metales expuestos a un medio ácido.

6.2. Materiales y métodos

Uno de los métodos más simples y con amplia aplicación práctica para evaluar la corrosión es el método de pérdida de peso del metal. Dicho método consiste en evaluar el comportamiento, luego de cierto tiempo de inmersión, del acero frente a una sustancia corrosiva (por ejemplo, un ácido) en ausencia o presencia de distintas concentraciones de un extracto antioxidante.

El experimento gravimétrico fue desarrollado según el método estándar de ASTM G 31-72. El extracto de cáscara de piñones frescos (2 g en 100 ml de agua a 100°C) fue secado en un rotavapor durante 6 h a 80 °C. El residuo fue disuelto en metanol hasta llegar a una concentración de 13,8 mg de peso seco por ml (este es el extracto correspondiente a la columna CTFC de la Tabla 14). Las arandelas de acero de 245 mm² fueron lijadas con papel de lija con tres tipos de granos: 30 segundos por lado con lija p120, 30 segundos por lado con lija p600 y 10 segundos por lado con lija p1500, para remover las sustancias agregadas a fin de prevenir la oxidación del metal. Luego, fueron lavadas con acetona y secadas en campana. Una vez secas, fueron pesadas en una balanza analítica de 4 cifras decimales (peso inicial) y se colocó a cada una en un erlenmeyer que contenía 20 ml de HCl 1M (control) o 20 ml de HCl 1M con distintas concentraciones del extracto: 50, 100, 200 and 400 µg/ml, por triplicado. Después de 5 h de inmersión, las arandelas fueron enjuagadas con agua destilada y acetona y, fueron puestas a secar. Una vez secas, cada una fue pesada para conocer el peso final.

La eficiencia de inhibición de la corrosión (% EI) y la tasa de corrosión (TC) fueron calculadas con las siguientes fórmulas:

$$\% EI = (1 - PP_{trat}/PP_{control}) \times 100$$

$$TC = \frac{P_{inicial} - P_{final}}{A \times t}$$

Dónde: PP_{trat} y $PP_{control}$ son las pérdidas de peso de las arandelas en los tratamientos y el control, respectivamente, $P_{inicial}$ y P_{final} son los promedios de los pesos iniciales y finales del control y de cada tratamiento, A es el área total de la arandela y t el tiempo de inmersión.

6.3. Resultados y discusión

En los últimos años ha crecido el uso de productos naturales y no tóxicos como inhibidores de la corrosión por sus ventajas ambientales. En este contexto, se evaluó la eficiencia del extracto del residuo de la industria del piñón (cáscara total) como inhibidor de la corrosión. Los resultados muestran que luego de 5 horas de exposición a un ácido fuerte, el extracto de cáscara de piñón mostró una eficiencia de inhibición que aumentó proporcionalmente a la concentración del extracto, con un valor máximo de 61 % cuando el ensayo se realizó con extracto de 400 µg peso de cáscara seca por ml de HCl (Figura 70). Por otro lado, la tasa de corrosión disminuyó significativamente cuando se le agregó el extracto de cáscara de piñón a los tratamientos a partir de los 100 µg/ml de HCl (Figura 71). Dicha actividad inhibitoria es similar a aquella descrita en residuos sólidos de hojas frescas de banana, de caña de azúcar y de cáscara de sandía (Marzorati *et al.* 2019). Numerosos estudios le han atribuido esta capacidad anticorrosiva a la presencia de moléculas con grupos funcionales polares con átomos de S, O y N., en alcaloides, polifenoles, taninos y flavonoides, los cuales forman una capa protectora que se adhiere a la superficie del acero y resulta en una barrera para agentes oxidantes como el HCl u otros (Asmara *et al.* 2018; Verma *et al.* 2018; Marzorati *et al.* 2019; Ituen *et al.* 2020). El extracto de cáscara de piñón utilizado presentó un alto contenido de taninos (2 % p/p) y de flavonoides (mayor a 124 µg EQ/ mg PS), con una alta proporción de catequina y quercetina (2,86 y 3,11 mg/g PS, respectivamente). Dicha composición es consistente con la de otros extractos naturales descritos como inhibidores de la corrosión (Asmara *et al.* 2018; Marzorati *et al.* 2019). Todos estos resultados sugieren que la cáscara de piñón, residuo de la industria del piñón, podría ser un recurso adecuado para producir nuevos compuestos naturales inhibidores de la corrosión de metales.

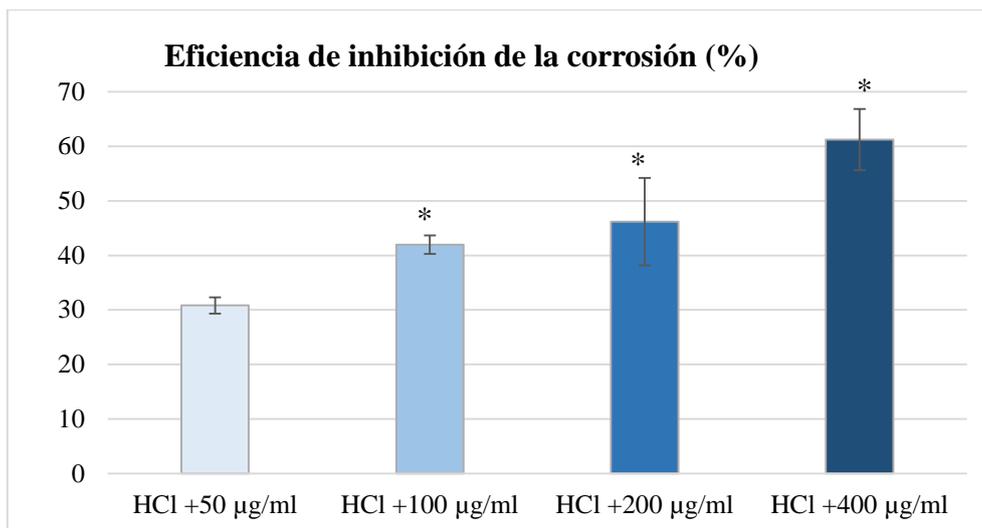


Figura 70: Eficiencia de inhibición de la corrosión de extracto de cáscara fresca de piñón a diferentes concentraciones de extracto (50, 100, 200 y 400 µg de peso seco de cáscara por ml de volumen de incubación) en HCl 1 M. Los valores se expresan como media \pm desvíos de dos experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (Tukey, $p < 0,05$).

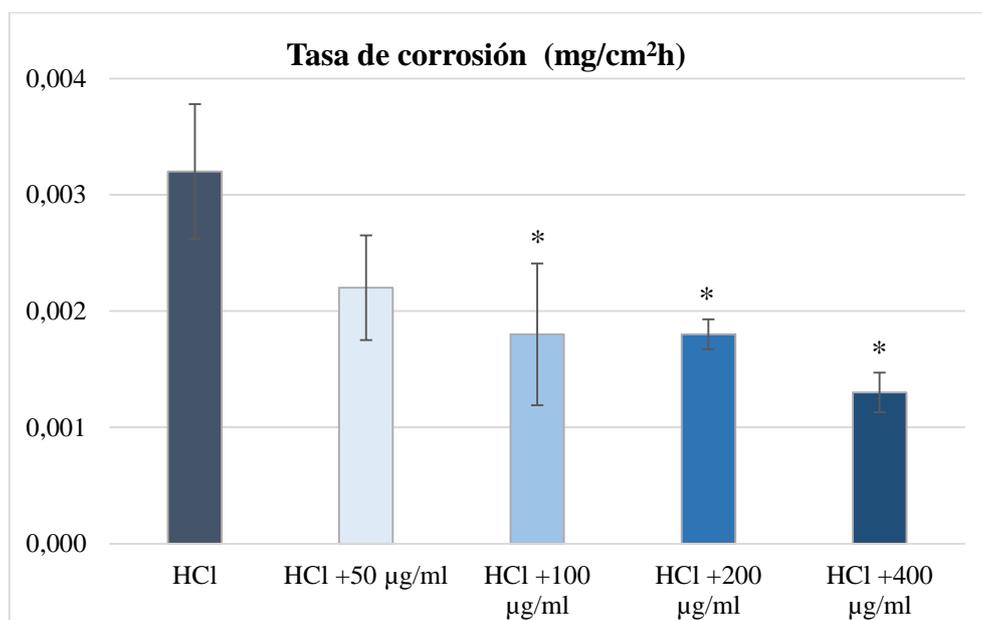


Figura 71: Tasa de corrosión de extracto de cáscara fresca de piñón a diferentes concentraciones (50, 100, 200 y 400 µg de peso seco por ml de volumen de incubación) en HCl 1 M. Los valores se expresan como media \pm desvíos de dos experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (Tukey, $p < 0,05$).

6.4. Conclusiones

El test diseñado para evaluar corrosión por inmersión de metales en HCl, mostró que se presenta mayor pérdida de masa en las arandelas de acero tratadas con HCl 1M, comparadas con aquellas

inmersas en HCl con el agregado de extracto de cáscara de piñón. Las altas eficiencias de inhibición de la corrosión encontradas en los tratamientos con extracto de cáscara de piñón (mayor al 60% en el caso del tratamiento con el extracto obtenido de 400 μ g de cáscara seca de piñón/ml de HCl), ponen de manifiesto el potencial que tiene dicho extracto como inhibidor de la corrosión de metales y un posible uso industrial que puede reemplazar a otros inhibidores de origen sintético. Además de alinearse con las nuevas tendencias de producción amigables con el medioambiente, es un recurso que puede obtenerse a bajo costo, debido a que es un residuo de la industria que no es utilizado con alguna finalidad y es descartado.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES FINALES

Numerosas especies vegetales de la Norpatagonia son utilizadas con fines medicinales, dentro de la cultura popular. Por la estrecha relación que existe entre los procesos inflamatorios y el estrés oxidativo, se seleccionaron especies vegetales del norte de la Patagonia utilizadas tradicionalmente para tratar inflamaciones, con el objetivo de contribuir al conocimiento de las propiedades de las mismas. Sobre la base de su abundancia en esta región, su uso tradicional como plantas medicinales con propiedades antiinflamatorias, la utilización de órganos aéreos que no pongan en peligro a la planta y la experiencia del grupo en el tema, se estudiaron las propiedades antioxidantes de extractos de hojas y tallos de *Monttea aphylla* (Mata de sebo), *Grindelia chilensis* (Melosa), *Larrea nitida* (Jarilla de la Sierra), *Larrea cuneifolia* (Jarilla macho) *Mandevilla laxa* (Jazmín de Chile) y *Pteromonnina dictyocarpa* (Quelén); así como los extractos de los diferentes tejidos de las semillas de *Araucaria araucana* (Pehuén) llamadas piñones. Además, dada la reducción importante de las poblaciones de pehuenes que conlleva a la especie a estar en peligro de extinción, se avanzó en la obtención biotecnológica de los antioxidantes de piñones mediante el cultivo *in vitro* de sus células.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que todos los extractos acuosos poseen actividad antioxidante y no presentan citotoxicidad tanto en células tumorales como normales, excepto el obtenido de *G. chilensis*, con un marcado efecto citotóxico, más pronunciado en células tumorales. Esto señala la inocuidad de los extractos vegetales estudiados, y en el caso del proveniente de *G. chilensis* su potencial estudio para aplicarlo en tratamientos antiproliferativos. Es importante destacar que el agua utilizada como solvente de extracción resulta eficiente para extraer compuestos fenólicos de los tejidos estudiados, especialmente a una temperatura de 100°C. Esto es altamente relevante ya que es un método de extracción simple y asimismo, el agua es un solvente seguro para la salud y amigable con el medioambiente.

Por otra parte, los estudios realizados con cultivo de células vegetales *in vitro* demostraron que la porción comestible del piñón puede ser utilizada para antioxidantes *in vitro* a partir del piñón de manera sustentable y con mejor rendimiento que el tejido original. Estos resultados demuestran que es posible el aprovechamiento de los recursos naturales sin afectar las poblaciones vegetales nativas ni su hábitat.

Entre los resultados más destacados por su impacto ambiental positivo, se encuentra la alta capacidad antioxidante hallada en la cáscara de piñón, un residuo de la industria alimenticia de la región. Dentro de los compuestos fenólicos que la constituyen se identificó quercetina, ácido gálico y catequina; y además se encontraron oligoelementos de gran valor nutricional. Por lo tanto, estas cáscaras pueden resultar un importante recurso con potencial uso como

nutracéutico, capaz de aportar oligoelementos y antioxidantes naturales.

El fraccionamiento posterior del extracto de cáscara de piñón mediante diferentes métodos con ultrasonido, temperaturas y con acetato de etilo permitió conocer la distribución diferencial de compuestos fenólicos como ácido gálico, catequina y quercetina, así como estudiar posteriormente su actividad biológica *in vitro* e *in vivo*.

Los ensayos realizados en cultivos de células animales muestran que la incubación con el extracto de cáscara de piñón en un período corto de tiempo no produce citotoxicidad, no induce la formación de hidroperóxidos acuosos (excepto a altas concentraciones) e induce respuestas adaptativas antioxidantes sin provocar daño oxidativo. En presencia de As, el extracto muestra un efecto protector al disminuir la concentración de hidroperóxidos acuosos y aumentar la proporción de células viables con morfología normal. Por otra parte, anula la inducción de la actividad enzimática de glutatión S-transferasa y catalasa y el aumento del contenido de proteínas totales causadas por el arsénico.

Asimismo, se demostró que los extractos de la cáscara de piñón presentan actividad quimioprotectora frente a los efectos secundarios de tratamientos oncológicos, como es el caso del estrés oxidativo inducido por la droga citostática ciclofosfamida en glándulas salivares de ratas tratadas. Se verifica también que el extracto de cáscara de piñón tiene un marcado efecto anticorrosivo en acero expuesto a una solución ácida, lo cual constituye otra posible aplicación de este residuo para la obtención de agentes anticorrosivos de metales.

Finalmente se concluye que la flora patagónica contiene especies de gran valor medicinal y nutricional, con gran capacidad antioxidante y sin presentar efectos tóxicos. También, que es posible obtener antioxidantes de plantas en peligro de extinción, mediante el cultivo de sus células en laboratorio. Por último, los residuos de la industria alimenticia del piñón constituyen una fuente económica y de alto rendimiento de antioxidantes con potenciales usos tanto en la prevención y tratamiento de enfermedades, como en la industria metalúrgica.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aagesen DL (2017) Indigenous Resource Rights and Conservation of the Monkey-Puzzle Tree (*Araucaria araucana*, Araucariaceae): A Case Study from Southern Chile. *Economic Botany*, 52 (2): 146–160.
- Agati G, Tattini M (2010) Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol* 186:786-793. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03269.x>
- Ahn HN, Jeong SY, Bae GU, Chang M, Zhang D, Liu X, Pei Y, Chin YW, Lee J, Oh SR, Song YS (2014) Selective estrogen receptor modulation by *Larrea nitida* on MCF-7 cell proliferation and immature rat uterus. *Biomol Ther* 22:347-354. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.050>
- Akerele O (1994) Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mund Salud* 42:2183-2186
- Al-Bekairi AM, Qureshi S, Asgher Chaudhry M, Shah AH (1991) Uric acid as an inhibitor of cyclophosphamide-induced micronuclei in mice. *Mutat Res Lett* 262:115-118. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(91\)90116-L](https://doi.org/10.1016/0165-7992(91)90116-L)
- Amarowicz R, Pegg RB (2019) Natural antioxidants of plant origin. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Eds.; Academic Press: Cambridge, UK, 2019; 1–81.
- Angélica Koehnlein E, Elise Santos Carvajal A, Marcela Koehnlein E, da Silva Coelho-Moreira J, Dorneles Inácio F, Castoldi R, Bracht A y Peralta RM (2012) Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. *African J Food Sci* 6:512-518. <https://doi.org/10.5897/ajfs12.128>
- Arguello F (2017) Optimización del blanqueamiento de un extracto acuoso de estevia con carbón activado y celite 545. *Esc Agrícola Panam* 59
- Arias JP, Zapata K, Rojano B, Arias M (2016) Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *J Photochem Photobiol B Biol* 163:87-91. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.014>
- Aslam M, Choudhary B, Uzair M, Ijaz A (2013) Phytochemical and Ethno-Pharmacological Review of the Genus *Araucaria* – Review. *Trop J Pharm Res* 12:651-659. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i4.31>

- Aslanturk (2013) *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. In M. L. Larramendy & S. Soloneski (Eds.), *Genotoxicity - A predictable risk to our actual world* (pp. 1– 17). London, UK: IntechOpen.
- Asmara YP, Kurniawan T, Sutjipto AGE, Jafar J (2018) Application of plants extracts as green corrosion inhibitors for steel in concrete - A review. *Indones J Sci Technol* 3:158-170. <https://doi.org/10.17509/ijost.v3i2.12760>
- Athmouni K, Belghith T, Bellassouad K, El Feki A, Ayadi H (2015) Effect of extraction solvents on the biomolecules and antioxidant properties of *Scorzonera undulata* (asteraceae): Application of factorial design optimization phenolic extraction. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 14:313-320. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2015.4.32>
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014:.. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Azar P (2008) Utilización de vegetales en las sociedades indígenas norpatagónicas. Contribución a una base de datos. Tesis de licenciatura. Facultad de Filosofía y Letras, Universidad de Buenos Aires.
- Bachmeier E, López MM, Linares JA, *et al* (2019) 5-Fluorouracil and Cyclophosphamide Modify Functional Activity in Submandibular Gland of Rats. *J Oral Res* 8:363-369. <https://doi.org/10.17126/joralres.2019.056>
- Bachmeier E, Mazzeo MA, López MM, Brunnotto MN, Mazzeo MA (2014) Mucositis and salivary antioxidants in patients undergoing bone marrow transplantation (BMT). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 19:e444-e450. <https://doi.org/10.4317/medoral.19062>
- Banfalvi G (2017) Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis* 22:306-323. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1333-3>
- Barbosa JZ, dos Santos Domingues CR, Poggere GC, Vargas Motta AC, Rodrigues dos Reis A, Ferreira de Moraes M, Prior SA (2019) Elemental composition and nutritional value of *Araucaria angustifolia* seeds from subtropical Brazil. *J Food Sci Technol* 56:1073-1077. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-03555-y>
- Barbosa ML, de Meneses AAPM, de Aguiar RPS, de Castro e Souza JM, de Carvalho Melo Cavalcante AA, Maluf SW (2020) Oxidative stress, antioxidant defense and depressive disorders: A systematic review of biochemical and molecular markers. *Neurol Psychiatry*

- Brain Res 36:65-72. <https://doi.org/10.1016/j.npbr.2020.02.006>
- Barboza GE, Cantero JJ, Núñez C, Pacciaroni A, Ariza Espinar L (2009) Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana* 34:7-365
- Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195:133-140. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)50881-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50881-x)
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bergesse AE, Figueroa Gisela Y, Parra ML, Sontag LO, Nepote V, Ryan LC (2020) Piñón flour (*Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch). Obtaining and evaluating nutritional and sensory quality. *Nutr Clin y Diet Hosp* 40:36-44. <https://doi.org/10.12873/403bergesse>
- Bhadauria S, Flora SJS (2007) Response of arsenic-induced oxidative stress, DNA damage, and metal imbalance to combined administration of DMSA and monoisoamyl-DMSA during chronic arsenic poisoning in rats. *Cell Biol Toxicol* 23:91-104. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0135-8>
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5:9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bjørklund G, Chirumbolo S (2017) Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition* 33:311-321. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.07.018>
- Blois M (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181:1199-1200
- Bongiovanni G, Cantero J, Eynard A, Goleniowski M (2008) Organic extracts of *Larrea divaricata* Cav. induced apoptosis on tumoral MCF7 cells with an higher cytotoxicity than nordihydroguaiaretic acid or Paclitaxel. *J Exp Ther Oncol* 7:1-7
- Bongiovanni GA, Soria EA, Eynard AR (2007) Effects of the plant flavonoids silymarin and quercetin on arsenite-induced oxidative stress in CHO-K1 cells. *Food Chem Toxicol* 45:971-976. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.12.002>

- Boqué R (2005) La selectividad en análisis químico. Univ Rovira i Virgili 1-8
- Borges CV, Minatel IO, Gomez-Gomez HA, Lima GPP (2017) Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. *Med Plants Environ Challenges* 259-277. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_15
- Borneo R, León AE, Aguirre A, Ribotta P, Cantero JJ (2009) Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their *in vitro* testing in a model food system. *Food Chem* 112:664-670. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.027>
- Branco CDS, Lima ÉD De, Rodrigues TS, DallAgnol R, Agostini F, Moura S, Salvador M (2015) Mitochondria and redox homeostasis as chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEP-2 cancer cells. *Chem Biol Interact* 231:108-118. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.03.005>
- Brito A, Areche C, Sepúlveda B, *et al* (2014) Anthocyanin characterization, total phenolic quantification and antioxidant features of some Chilean edible berry extracts. *Molecules* 19:10936-10955. <https://doi.org/10.3390/molecules190810936>
- Britza SM, Byard RW, Musgrave IF (2022) Traditional Chinese medicine-associated nephrotoxicity and the importance of herbal interactions – An overview. *Pharmacol Res - Mod Chinese Med* 3:100099. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100099>
- Brunetti C, Sebastiani F, Tattini M (2019) Review: ABA, flavonols, and the evolvability of land plants. *Plant Sci* 280:448-454. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.12.010>
- Calvete T, Lima EC, Cardoso NF, Vaghetti JCP, Dias SLP, Pavan FA (2010) Application of carbon adsorbents prepared from Brazilian-pine fruit shell for the removal of reactive orange 16 from aqueous solution: Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. *J Environ Manage* 91:1695-1706. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.03.013>
- Cantero JJ, Núñez CO, Bernardello G, Amuchástegui A, Mulko J, Brandolín P, Palchetti MV, Iparraguirre J, Virginil N, y Ariza Espinar L (2019) Las plantas de interés económico en Argentina
- Carabajal MPA, Isla MI, Zampini IC (2017) Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of herbal teas from native plants used in traditional medicine in Argentina. *South African J Bot* 110:258-265. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.10.006>
- Carecho R, Figueira I, Terrasso AP, Godinho-Pereira J, de Oliveira C, Pereira S A,

- Milenkovic D, Leist M, Brito C, Nunes dos C (2022) Circulating (Poly)phenol Metabolites: Neuroprotection in a 3D Cell Model of Parkinson's Disease. *Mol Nutr Food Res* 2100959. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100959>
- Cassani MJ (2013) Análisis del proceso de patrimonialización en el turismo gastronómico de Villa Pehuenia, Neuquén. En: X Jornadas de sociología de la UBA. pp 1-21
- Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D (2009) Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res - Rev Mutat Res* 681:51-67. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.05.002>
- Chandrasekara A, Shahidi F (2018) Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction - A review. *J Tradit Complement Med* 8:451-458. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.006>
- Chen J, Chen JJ, Yang LQ, Hua L, Gao K (2011) Labdane diterpenoids and shikimic acid derivatives from *Araucaria cunninghamii*. *Planta Med* 77:485-488. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250570>
- Christie JM, Jenkins GI (1996) Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* 8:1555-1567. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.9.1555>
- Cömert ED, Gökmen V (2018) Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Res Int* 105:76-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.056>
- Cordenunsi BR, De Menezes EW, Genovese MI, Colli C, Gonçalves De Souza A, Lajolo FM (2004) Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. *J Agric Food Chem* 52:3412-3416. <https://doi.org/10.1021/jf034814l>
- Corso M, Perreau F, Mouille G, Lepiniec L (2020) Specialized phenolic compounds in seeds: structures, functions, and regulations. *Plant Sci* 296:110471. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110471>
- Cortez MV, Bongiovanni GA, Rodrigo Fantón ET N, Morero ML SE (2012) Capacidad antioxidante del consumo de *Pteromonnia dictyocarpa* frente a neurotoxicidad oxidativa por arsénico. En: XLIV Reunión Annual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental – SAFE 2012. p.47
- Craig J, Callahan M, Huang RCC, Delucia AL (2000) Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expression by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antiviral Res* 47:19-28. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(00\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(00)00089-9)

- da Silva SM, Koehnlein EA, Bracht A, Castoldi R, de Moraes G R, Baesso M L, Peralta R A, de Souza C G M, de Sá-Nakanishi A B, Peralta R M (2014) Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Food Res Int* 56:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.004>
- Da Silva TBV, Moreira TFM, De Oliveira A, Bilck AP, Gonçalves OH, Ferreira ICFR, Barros L, Barreiro MF, Yamashita F, Shirai MA, Leimann FV (2019) *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze extract as a source of phenolic compounds in TPS/PBAT active films. *Food Funct* 10:7697-7706. <https://doi.org/10.1039/c9fo01315f>
- De Freitas, T.B., Santos, C.H., Silva, M.V., Shirai, M.A., Dias, M.I., Barros, L., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C., Gonçalves, O.H., & Leimann, F.V. (2017). Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. *Food Packaging and Shelf Life*, 15, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.006>
- de Souza Machado F, Kuo J, Ongaratti BR, da Silva Medeiros N, Salvador M, Dani C, Funchal C (2015) Antioxidant and neuroprotective potential of extract of Brazilian pine *Araucaria angustifolia* bracts against oxidative stress induced by sodium azide in hippocampus of rats. *Integr Pharmacol Toxicol Genotoxicol* 1:16-20. <https://doi.org/10.15761/iptg.1000105>
- Del Vitto LA, Petenatti EM, Petenatti ME (1997) Herbal Resources of San Luis (Argentina). First Part: Native Plants. *Multequina* 6
- Desjardins LM, MacManus JP (1995) An adherent cell model to study different stages of apoptosis. *Exp. Cell Res.* 216:380-387
- Devi KS, Sruthy PB, Anjana JC, Rathinamal J (2015) Identification of Bioactive Compounds and Toxicity Study of *Araucaria columnaris* Bark Extract on Human Embryonic Kidney Cell Line. *Asian J Biotechnol* 7:129-136. <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2015.129.136>
- Dias MC, Pinto DCGA, Silva AMS (2021) Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules* 26:1-16. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- Dobritzsch D, Grancharov K, Hermsen C, Kraussa GJ, Schaumlöffe D (2020) Inhibitory effect of metals on animal and plant glutathione transferases. *J Trace Elem Med Biol* 57:48-56. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.09.007>
- Dong JJ, Ye JH, Lu JL, Zheng XQ, Liang YR (2011) Isolation of antioxidant catechins from

- green tea and its decaffeination. *Food Bioprod Process* 89:62-66.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.02.003>
- Dong NQ, Lin HX (2021) Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant–environment interactions. *J Integr Plant Biol* 63:180-209.
<https://doi.org/10.1111/jipb.13054>
- Dong YJ, Lin MQ, Fang X, Xie ZY, Luo R, Teng X, Li B, Li B, Li LZ, Jin HY, Yu QX, L GY, Chen SH (2022) Modulating effects of a functional food containing *Dendrobium officinale* on immune response and gut microbiota in mice treated with cyclophosphamide. *J Funct Foods* 94:1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105102>
- Dopp E, Hartmann LM, Florea AM, von Recklinghausen U, Pieper R, Shokouhi B, Rettenmeier AW, Hirner AV, Obe G (2004) Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 201:156-165.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.05.017>
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I (2004) Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 43:200-227.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.001>
- Echeverri Del Sarto J, Gallia MC, Ferrari A, Bongiovanni GA (2016) Tissue plant culture as a novel industrial strategy to produce biopharmaceuticals from endangered plants. En: *Proceedings of the 24th International Academic Conference, Barcelona*. International Institute of Social and Economic Sciences, pp 113-121
- Efferth T (2019) Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering* 5:50-59.
<https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Eguchi N, Vaziri ND, Dafoe DC, Ichii H (2021) The role of oxidative stress in pancreatic β cell dysfunction in diabetes. *Int J Mol Sci* 22:1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms22041509>
- Escapa IH, Catalano SA (2013) Phylogenetic analysis of Araucariaceae: Integrating molecules, morphology, and fossils. *Int J Plant Sci* 174:1153-1170.
<https://doi.org/10.1086/672369>
- Ezcurra C (1981) Revisión de las Apocinaceas de Argentina
- Fatoki JO, Badmus JA (2022) Arsenic as an environmental and human health antagonist: A review of its toxicity and disease initiation. *J Hazard Mater Adv* 5:100052.

<https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100052>

Feillet-Coudray C, Fouret G, Vigor C, Bonafos B, Jover B, Blachnio-Zabielska A, Rieusset J, Casas F, Gaillet S, Landrier JF, Durand T, Coudray C (2019) Long-Term Measures of Dyslipidemia, Inflammation, and Oxidative Stress in Rats Fed a High-Fat/High-Fructose Diet. *Lipids*. <https://doi.org/10.1002/lipd.12128>

Ferrari A, Lascano C, Pechen De D'Angelo AM, Venturino A (2011) Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 153:34-39.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.08.003>

Flora SJS (2011) Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med* 51:257-281. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.008>

Franco R, Navarro G, Martínez-Pinilla E (2022) Plant-derived compounds, vitagens, vitagenes and mitochondrial function. *PharmaNutrition* 19:100287.
<https://doi.org/10.1016/j.phanu.2021.100287>

Galanakis CM, Goulas V, Tsakona S, Manganaris GA, Gekas V (2011) A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Int J Food Prop* 16:382-396.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2010.522750>

Galano JM, Lee YY, Oger C, C., Vigor C, Vercauteren J, Durand T, Giera M, Lee J C (2017) Isoprostanes, neuroprostanes and phytoprostanes: An overview of 25 years of research in chemistry and biology. *Prog Lipid Res* 68:83-108.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.09.004>

Gallardo H, Queralt I, Tapias J, Guerra M, Carvalho ML, Marguá E (2016) Possibilities of low-power X-ray fluorescence spectrometry methods for rapid multielemental analysis and imaging of vegetal foodstuffs. *J Food Compos Anal* 50:1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.04.007>

Gandullo R, Siffredi G, Velasco V (2016) Guía para el reconocimiento de especies del norte neuquino. INTA Digital (INTA)

Gao S, Wang Y, Yu S, Huang Y, Liu H, Chen W, He X (2020) Effects of drought stress on growth, physiology and secondary metabolites of Two Adonis species in Northeast China. *Sci Hortic (Amsterdam)* 259:108795.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108795>

- Gastaldi B (2018) Análisis de los compuestos fenólicos y volátiles de plantas medicinales y aromáticas del noroeste de la Patagonia Argentina, estudio de las actividades antioxidante y citotóxica. Tesis de Doctorado Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Repositorio Institucional CONICET Digital.
- Giorgis MA, Cingolani AM, Chiarini F, Chiapella J, Barboza G, Ariza Espinar L, Morero R, Gurvich DE, Tecco PA, Subils R, Cabido M (2011) Composición florística del Bosque Chaqueño Serrano de la provincia de Córdoba, Argentina. *Kurtziana* 36:9-43
- Gnabre JN, Ito Y, Ma Y, Huang RC (1996) Isolation of anti-HIV-1 lignans from *Larrea tridentata* by counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 719:353-364. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00727-X](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00727-X)
- Goleniowski ME, Bongiovanni GA, Palacio L, Nulez CO, Cantero JJ (2006) Medicinal plants from the «Sierra de Comechingones», Argentina. *J Ethnopharmacol* 107:324-341. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.026>
- Golovinskaia O, Wang CK (2021) Review of functional and pharmacological activities of berries. *Molecules* 26:. <https://doi.org/10.3390/molecules26133904>
- Gomez Rubio R (2020) Estudio de recuperación de antioxidantes presentes en la hoja de olivo. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos.
- Gramza A, Korczak J, Rudzinska M (2005) Tea Extracts as Free Radical Scavengers. 14:861-867
- Gramza A, Bueschke M, Kulczyński B, Gliszczyńska-Świąło, A., Kmieciak, D., Bilka, A., Purłan, M., Wałęsa, L., Ostrowski, M., Filipczuk, M., & Jędrusek-Golińska, A. (2019) Phenolic compounds and multivariate analysis of antiradical properties of red fruits. *J Food Meas Charact* 13:1739-1747. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00091-x>
- Gruneisen PH (1996) La vegetación de Monte en el Yacimiento Aguada de la Pichana. Buenos Aires, TAG/ Servicios editoriales y publicitarios.
- Habig WH, Jakoby WB (1981) Glutathione S-Transferases (Rat and Human). *Methods Enzymol* 77:218-231. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77029-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77029-0)
- Hanna ML, Taylor RT (1985) Growth inhibitory and cytotoxic effects of three arsenic compounds on cultured chinese hamster ovary cells. *J Environ Sci Heal Part A Environ Sci Eng* 20:37-72. <https://doi.org/10.1080/10934528509375209>

- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Hazizul Hasan M (2019) Antioxidant Properties of the Ethyl Acetate Fraction of *Intsia Palembanica* (Merbau, Fabaceae). *Arch Pharm Pharmacol Res* 2:2-9. <https://doi.org/10.33552/appr.2019.01.000541>
- Henríquez C, Escobar B, Figuerola F, Chiffelle I, Speisky H, Estevez AM (2008) Characterization of piñon seed (*Araucaria araucana* (Mol) K. Koch) and the isolated starch from the seed. *Food Chem* 107:592-601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.040>
- Ibrahim M, Arafa N, Aly U (2018) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of plant and callus cultures of *Plectranthus barbatus andrews*. *Egypt Pharm J* 17:32. https://doi.org/10.4103/epj.epj_38_17
- Ighodaro OM, Akinloye OA (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* 54:287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Ionescu-Tucker A, Cotman CW (2021) Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 107:86-95. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014>
- Ituen E, Mkpennie V, Yuanhua L, Singh A (2020) Inhibition of erosion corrosion of pipework steel in descaling solution using 5-hydroxytryptamine-based additives: Empirical and computational studies. *J Mol Struct* 1204:127562. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127562>
- Iturralde C (2022) La Araucaria y la Lengua, dos plantas medicinales del sur austral. In: *Rev. Digit. Montaña del CCAM (Centro Cult. Argentino Montaña)*
- Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW (2013) Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives. *Lancet* 382:260-272. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60687-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60687-X)
- Jørgensen LV, Madsen HL, Thomsen MK, Dragsted LO, Skibsted LH (1999) Regeneration of phenolic antioxidants from phenoxy radicals: An ESR and electrochemical study of antioxidant hierarchy. *Free Radic Res* 30:207-220.

<https://doi.org/10.1080/10715769900300231>

- Kershaw P, Wagstaff B (2001) The southern conifer family Araucariaceae: History, status, and value for paleoenvironmental reconstruction. *Annu Rev Ecol Syst* 32:397-414. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114059>
- Kessel M, Liu SX, Xu A, Santella R, Hei TK (2002) Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mol Cell Biochem* 234-235:301-308. <https://doi.org/10.1023/A:1015927406142>
- Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M (2009) Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age- Related Diseases and Cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 3:73-80. <https://doi.org/10.2174/187221309787158371>
- Khurshid R, Ullah MA, Tungmunnithum D, Drouet S, Shah M, Zaeem A, Hameed S, Hano C, Abbasi BH (2020) Lights triggered differential accumulation of antioxidant and antidiabetic secondary metabolites in callus culture of *Eclipta alba* L. *PLoS One* 15:1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233963>
- Khwairakpam AD, Bordoloi D, Thakur KK, Monisha J, Arfuso F, Sethi G, Mishra S, Kumar AP, Kunnumakkara AB (2018) Possible use of *Punica granatum* (Pomegranate) in cancer therapy. *Pharmacol Res* 133:53-64. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.04.021>
- Ki WL, Hyong JL (2006) The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors* 26:105-121. <https://doi.org/10.1002/biof.5520260202>
- Kim HS, Quon MJ, Kim JA (2014) New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol* 2:187-195. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.022>
- Kocadal K, Alkas FB, Battal D, Saygi S (2020) Cellular pathologies and genotoxic effects arising secondary to heavy metal exposure: A review. *Hum Exp Toxicol* 39:3-13. <https://doi.org/10.1177/0960327119874439>
- Koehnlein EA, Carvajal AES, Koehnlein EM, Coelho-Moreira JD, Inácio FD, Castoldi R, Bracht A, Peralta RM (2012). Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. *African J Food Sci* 6:512-518. <https://doi.org/10.5897/ajfs12.128>
- Konigheim B, Aguilar J, Batallan G, Almiron W, Contigiani M (2009) La flora nativa de Córdoba (Argentina) y su importancia en salud pública. 66:35-41

- Kountouri A, Korakas E, Ikonomidis I, Raptis A, Tentolouris N, Dimitriadis G, Lambadiari V (2021) Type 1 diabetes mellitus in the SARS-CoV-2 pandemic: Oxidative stress as a major pathophysiological mechanism linked to adverse clinical outcomes. *Antioxidants* 10:1-20. <https://doi.org/10.3390/antiox10050752>
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process* 89:217-233. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- Kumar S, Pandey AK (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *TheScientificWorldJournal*, 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kutzing MK, Firestein BL (2008) Altered uric acid levels and disease states. *J Pharmacol Exp Ther* 324:1-7. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.129031>
- Ladio AH, Lozada M (2009) Human ecology, ethnobotany and traditional practices in rural populations inhabiting the Monte region: Resilience and ecological knowledge. *J Arid Environ* 73:222-227. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2008.02.006>
- Leni Z, Künzi L, Geiser M (2020) Air pollution causing oxidative stress. *Curr Opin Toxicol* 20-21:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.02.006>
- Li C, Fan H, Sun Y, Tian W, Ma G (2021) Toxicity of aristolochic acid in a rat model investigated by Fourier transform infrared spectroscopy combined with chemometric analysis: An exploratory study. *Vib Spectrosc* 117:103307. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2021.103307>
- Li X, Liu L, Pischetsrieder M (2017) Pomegranate (*Punica granatum* L.) wine polyphenols affect Nrf2 activation and antioxidant enzyme expression in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y). *J Funct Foods* 38:140-150. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.048>
- Li Y, Kong D, Fu Y, *et al* (2020) The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiol Biochem* 148:80-89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
- Li Y, Zhao S, Zhang W, Sussman MR, Wu H (2011) Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) attenuates FFAs-induced peripheral insulin resistance through AMPK pathway and insulin signaling pathway *in vivo*. *Diabetes Res Clin Pract* 93:205-214. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.03.036>
- Lima EC, Royer B, Vagheti JCP, Brasil JL, Simon NM, dos Santos AA, Pavan FA, Dias

- SLP, Benvenuti EV, Silva EA da (2007) Adsorption of Cu(II) on *Araucaria angustifolia* wastes: Determination of the optimal conditions by statistic design of experiments. *J Hazard Mater* 140:211-220. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.073>
- Liu S, Manson JE, Lee IM, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, Buring JE (2000) Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: The Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* 72:922-928. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.4.922>
- Liu Z, Ren Z, Zhang J, Chuang CC, Kandaswamy E, Zhou T, Zuo L (2018) Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Front Physiol* 9:1-14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00477>
- Lorenzo-cáceres JMS (2022) Las especies del género *Mandevilla* Lindl. (Apocynaceae) cultivadas en España. <https://arbolesornamentales.es/Mandevilla.pdf>
- Lorenzo ME, Gomez PE, Segovia AF, Quiroga A, Figueroa LC, Baroni MV (2019) Phenolic content and antioxidant activity of ethanolic extracts of *Larrea divaricata* Cav., *Larrea cuneifolia* Cav. and *Sarcophalus mistol* (Griseb.) Hauenschild, coming from different areas of the Catamarca central valley. 20:31-51.
- Lorenzo ME, Sabatino E, Gómez PE Segovia AF, Figueroa LC, Quiroga A, Baroni MV (2021) Phenolic profile and antioxidant activity of ethanolic extract of *Larrea cuneifolia* Cav leaves. *MDPI Proceedings* 70(1):37
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Ma Q, He X (2012) Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: Promises and perils of Nrf2. *Pharmacol Rev* 64:1055-1081. <https://doi.org/10.1124/pr.110.004333>
- Mahajan M, Kuiry R, Pal PK (2020) Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. *J Appl Res Med Aromat Plants* 18:100255. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100255>
- Mardirosian MN, Lascano CI, Ferrari A, Bongiovanni GA, Venturino A (2015) Acute toxicity of arsenic and oxidative stress responses in the embryonic development of the common South American toad *Rhinella arenarum*. *Environ Toxicol Chem* 34:1009-1014. <https://doi.org/10.1002/etc.2856>
- Marzorati S, Verotta L, Trasatti SP (2019) Green corrosion inhibitors from natural sources

- and biomass wastes. *Molecules* 24:.. <https://doi.org/10.3390/molecules24010048>
- Mazzeo MA, Linares JA, Campos ML, Busamia BE, Dubersarsky C, Lavarda M, Jarchum G, Finkelberg AB (2009) Oral signs of intravenous chemotherapy with 5- fluorouracil and leucovorin calcium in colon cancer treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14:1-6
- Medda N, De SK, Maiti S (2021) Different mechanisms of arsenic related signaling in cellular proliferation, apoptosis and neo-plastic transformation. *Ecotoxicol Environ Saf* 208:111752. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111752>
- Michael HN, Awad HM, El-Sayed NH, Paré PW (2010) Chemical and antioxidant investigations: Norfolk pine needles (*Araucaria excelsa*). *Pharm Biol* 48:534-538. <https://doi.org/10.3109/13880200903177503>
- Michelon F, S. Branco C, Calloni C, Giazzon I, Agostini F, Spada PKW, Salvador M (2012) *Araucaria Angustifolia*: A Potential Nutraceutical with Antioxidant and Antimutagenic Activities. *Curr Nutr Food Sci* 8:155-159. <https://doi.org/10.2174/157340112802651103>
- Milevskaya V V., Prasad S, Temerdashev ZA (2019) Extraction and chromatographic determination of phenolic compounds from medicinal herbs in the Lamiaceae and Hypericaceae families: A review. *Microchem J* 145:1036-1049. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.11.041>
- Minatel BC, Sage AP, Anderson C, Hubaux R, Marshall EA, Lam WL, Martinez VD (2018) Environmental arsenic exposure: From genetic susceptibility to pathogenesis. *Environ Int* 112:183-197. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.017>
- Abdul KS, Jayasinghe SS, Chandana EP, Jayasumana C, De Silva P (2015) Arsenic and human health effects: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 40:828-846. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.09.016>
- Moreno MA, Córdoba S, Zampini IC, Mercado MI, Ponessa G, Sayago JE, Ramos LL, Schmeda-Hirschmann G, Isla MI (2018) Argentinean larrea dry extracts with potential use in vaginal candidiasis. *Nat Prod Commun* 13:171-174. <https://doi.org/10.1177/1934578x1801300215>
- Moreno MA, Zampini IC, Isla MI (2020) Antifungal, anti-inflammatory and antioxidant activity of bi-herbal mixtures with medicinal plants from Argentinean highlands. *J Ethnopharmacol* 253:112642. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112642>
- Mota GST da, Arantes AB, Sacchetti G, Spagnoletti A, Ziosi P, Scalambra E, Vertuani S,

- Manfredini S (2014) Antioxidant Activity of Cosmetic Formulations Based on Novel Extracts from Seeds of Brazilian *Araucaria angustifolia* (Bertoll) Kuntze. *J Cosmet Dermatological Sci Appl* 04:190-202. <https://doi.org/10.4236/jcdsa.2014.43027>
- Muiño WA (2011) La etnobotánica médica del área de transición pampeano cuyana. *Bonplandia* 20:353. <https://doi.org/10.30972/bon.2021419>
- Murakami A (2022) Novel mechanisms underlying bioactivities of polyphenols via hormesis. *Curr Opin Toxicol* 30:100337. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2022.02.010>
- Musaubach MG, Plos A (2015) Las plantas de los cazadores-recolectores de la Pampa Occidental Argentina. Base de datos de recursos vegetales potencialmente utilizados. *Comechingonia Rev Arqueol* 19:257-280. <https://doi.org/10.37603/2250.7728.v19.n2.18141>
- National Research Council (2000) Nutrient Requirements of Beef Cattle
- Nunes C, Barreto Arantes M, Menezes de Faria Pereira S, Leandro da Cruz L, de Souza Passos M, Pereira de Moraes L, Vieira I, Barros de Oliveira D (2020). Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(16), 3726. <https://doi.org/10.3390/molecules25163726>
- O'Flaherty C (2020) Reactive Oxygen Species and Male Fertility. *Antioxidants* 9:287. <https://doi.org/10.3390/antiox9040287>
- Oliveira RF, Gonçalves GA, Inácio FD, Koehnlein EA, de Souza CG, Bracht A, Peralta RM (2015) Inhibition of pancreatic lipase and triacylglycerol intestinal absorption by a Pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Nutrients* 7:5601-5614. <https://doi.org/10.3390/nu7075242>
- Oronsky B, Goyal S, Kim MM, Cabrales P, Lybeck M, Caroen S, Oronsky N, Burbano E, Carter C, Oronsky A (2018) A Review of Clinical Radioprotection and Chemoprotection for Oral Mucositis. *Transl Oncol* 11:771-778. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.03.014>
- Oyagbemi AA, Omobowale TO, Asenuga ER, Afolabib JM, Adejumobib OA, Adedapod AA, Yakubuet MA (2017) Effect of arsenic acid withdrawal on hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defense system. *Toxicol Reports* 4:521-529. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.09.006>
- Oyenihi AB, Smith C (2019) Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anti-

- cancer success? J Ethnopharmacol 229:54-72. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.037>
- Paissoni MA, Bitelli G, Vilanova M, Montanini C, Río Segade S, Rolle L, Giacosa S (2022) Relative impact of oenological tannins in model solutions and red wine according to phenolic, antioxidant, and sensory traits. Food Res Int 157:111203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111203>
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: An overview. J Nutr Sci 5: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev 2:270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Pena-Pereira F, Kloskowski A, Namieśnik J (2015) Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: A framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives. Green Chem 17:3687-3705. <https://doi.org/10.1039/c5gc00611b>
- Peralta RM, Koehnlein EA, Oliveira RF, Correa VG, Corrêa RCG, Bertonha L, Bracht A, Ferreira ICFR (2016) Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. Trends Food Sci Technol 54:85-93. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.013>
- Peter A, Obot IB, Sharma SK (2015) Use of natural gums as green corrosion inhibitors: an overview. Int J Ind Chem 6:153-164. <https://doi.org/10.1007/s40090-015-0040-1>
- Peters A, Nawrot TS, Baccarelli AA (2021) Hallmarks of environmental insults. Cell 184:1455-1468. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.043>
- Phang CW, Malek SNA, Ibrahim H, Wahab NA (2011) Antioxidant properties of crude and fractionated extracts of *Alpinia mutica* rhizomes and their total phenolic content. African J Pharm Pharmacol 5:842-852
- Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI (2021) Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. Eur J Med Chem 209:112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>
- Premoli A, Quiroga P, Gardner M (2013) *Araucaria araucana* : Monkey Puzzle Tree 1. 8235:1-2. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T31355A2805113.en>
- Pukacka S, Ratajczak E (2007) Age-related biochemical changes during storage of beech

- (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Seed Sci Res* 17:45-53.
<https://doi.org/10.1017/S0960258507629432>
- Rajasekaran S, Rajasekar N, Sivanantham A (2021) Therapeutic potential of plant-derived tannins in non-malignant respiratory diseases. *J Nutr Biochem* 94:108632.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108632>
- Ramos Elizagaray SI, Quiroga PL, Pérez RD, Sosa C, Pérez CA, Bongiovanni GA, Soria EA (2019) Effect of the Aqueous Extract of *Lantana grisebachii* Stuck Against Bioaccumulated Arsenic-Induced Oxidative and Lipid Dysfunction in Rat Splenocytes. *J Diet Suppl* 16:401-407. <https://doi.org/10.1080/19390211.2018.1470124>
- Reis MS dos, Ladio A, Peroni N (2014) Landscapes with *Araucaria* in South America: evidence for a cultural dimension. *Ecol Soc* 19:art43. <https://doi.org/10.5751/ES-06163-190243>
- Ribeiro RV, Mariano DB, Arunachalam K, Soares I M, Aguiar RW de S, Ascêncio SD, Marlon R, Colodel EM, Martins DT de O (2019) Chemical characterization and toxicological assessment of hydroethanolic extract of *Mandevilla velame xylopodium*. *Rev Bras Farmacogn* 29:605-612. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.05.002>
- Ricco RA, Agudelo IJ, Wagner ML (2015) Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa* 52:161-174
- Royer B, Cardoso NF, Lima EC, Vagheti JCP, Simon NM, Calvete T, Cataluna Veses R (2009) Applications of Brazilian pine-fruit shell in natural and carbonized forms as adsorbents to removal of methylene blue from aqueous solutions-Kinetic and equilibrium study. *J Hazard Mater* 164:1213-1222. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.028>
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto A. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 76:270-276
- Sanchita, Sharma A (2018) *Gene Expression Analysis in Medicinal Plants Under Abiotic Stress Conditions*. Elsevier Inc.
- Sanguinetti J (2014) Producción de semillas de *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch durante 15 años en diferentes poblaciones del Parque Nacional Lanín (Neuquén-Argentina). *Ecol Austral* 24:265-275. <https://doi.org/10.25260/ea.15.24.3.0.3>
- Santos-Buelga, C. and Scalbert, A. (2000), Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*,

80: 1094-1117. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1)

Sapoznikow A, Reeves C, Degogue G, Sessa G, de la Reta M (2002) Flora de la Estepa. Área Educ Ambient - Fund Patagon Nat 36

Schmeda-Hirschmann G, Antileo-Laurie J, Theoduloz C, Jimenez-Aspee F, Avila F, Burgos-Edwards A, Olate-Olave V (2021) Phenolic composition, antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity of raw and boiled Chilean *Araucaria araucana* kernels. Food Chem 350:.. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129241>

Schmeda-Hirschmann G, Astudillo L, Sepúlveda B, Rodríguez JA, Theoduloz C, Yanez T, Palenzuela JA (2005) Gastroprotective effect and cytotoxicity of natural and semisynthetic labdane diterpenes from *Araucaria araucana* resin. Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci 60:511-522. <https://doi.org/10.1515/znc-2005-7-801>

Scuto M, Ontario ML, Salinaro AT, Caligiuri I, Rampulla F, Zimbone V, Modafferi S, Rizzolio F, Canzonieri V, Calabrese EJ, Calabrese V (2022). Redox modulation by plant polyphenols targeting vitagenes for chemoprevention and therapy: Relevance to novel anti-cancer interventions and mini-brain organoid technology. Free radical biology & medicine, 179, 59–75. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.267>

Sedrez dos Reis M, Ladio A, Peroni N (2014) Landscapes with Araucaria in South America: Evidence for a cultural dimension. Ecol Soc 19:.. <https://doi.org/10.5751/ES-06163-190243>

Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA (2018) Catalase and its mysteries. Prog Biophys Mol Biol 140:5-12. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001>

Shahidi F, Ambigaipalan P (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. J Funct Foods 18:820-897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>

Sharapin N, Machado Rocha L, Souza Carvalho E, Rocha de Albuquerque Lucio EM, Valverde Macedo dos Santos E, Lopes de Almeida JM (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Bogotá: Ed. Roberto Pinzón. ISBN:9789586980012

Sharma S, Rana S, Patial V, Gupta M, Bhushan S, Padwad YS (2016) Antioxidant and hepatoprotective effect of polyphenols from apple pomace extract via apoptosis

- inhibition and Nrf2 activation in mice. *Hum Exp Toxicol* 35:1264-1275.
<https://doi.org/10.1177/0960327115627689>
- Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, Selverstone Valentine J (2014) Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem Rev* 114:3854-3918.
<https://doi.org/10.1021/cr4005296>
- Shohael AM, Chakrabarty D, Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Lee HL, Paek KY (2006) Enhancement of eleutherosides production in embryogenic cultures of *Eleutherococcus sessiliflorus* in response to sucrose-induced osmotic stress. *Process Biochem* 41:512-518.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.09.005>
- Shukla AS, Jha AK, Kumari R, Rawat K, Syeda S, Shrivastava A (2018) Role of Catechins in Chemosensitization, 1.^a edn. Elsevier Inc.
- Shukla Y, Singh M (2007) Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food Chem Toxicol* 45:683-690. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.11.002>
- Sicaire AG, Vian M, Fine F, Joffre F, Carré P, Tostain S, Chemat F (2015) Alternative bio-based solvents for extraction of fat and oils: Solubility prediction, global yield, extraction kinetics, chemical composition and cost of manufacturing. *Int J Mol Sci* 16:8430-8453.
<https://doi.org/10.3390/ijms16048430>
- Sies H, Jones DP (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:363-383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Singh K, Bhorji M, Kasu YA, Bhat G, Marar T (2018) Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – Exploring the armoury of obscurity. *Saudi Pharm J* 26:177-190. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.12.013>
- Singh R, Singh S, Kumar S, Arora S (2007) Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Food Chem Toxicol* 45:1216-1223. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.01.002>
- Singhal SS, Singh SP, Singhal P, Horne D, Singhal JS, Awasth S (2015) Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 289:361-370.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.10.006>
- Singleton VL, Rossi JAJ (1965) Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid

reagents. *Am J Enol Vinic* 16:144-58

Soria E, Goleniowski M, Cantero J, Bongiovanni G (2007a) Actividad protectora de extractos de plantas nativas de Córdoba (Argentina) en células VERO expuestas a arsenito. En: XVI Congreso de la Societa' Italo-latino Americana di Etnomedicina (SILAE)

Soria EA, Bongiovanni GA, Díaz Luján C, Eynard AR (2015) Effect of arsenite on nitrosative stress in human breast cancer cells and its modulation by flavonoids. *Nutr Cancer* 67:659-663. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1019637>

Soria EA, Eynard AR, Bongiovanni GA (2010a) Modulation of early stress-related biomarkers in cytoplasm by the antioxidants silymarin and quercetin using a cellular model of acute arsenic poisoning. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 107:982-987. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00615.x>

Soria EA, Eynard AR, Bongiovanni GA (2010b) Cytoprotective effects of silymarin on epithelial cells against arsenic-induced apoptosis in contrast with quercetin cytotoxicity. *Life Sci* 87:309-315. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.07.007>

Soria EA, Eynard AR, Quiroga PL, Bongiovanni GA (2007b) Differential effects of quercetin and silymarin on arsenite-induced cytotoxicity in two human breast adenocarcinoma cell lines. *Life Sci* 81:1397-1402. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.09.008>

Soria EA, Goleniowski ME, Cantero JJ, Bongiovanni GA (2008) Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. *Hum Exp Toxicol* 27:341-346. <https://doi.org/10.1177/0960327108092192>

Soria EA, Quiroga PL, Albrecht C, Ramos Elizagaray SI, Cantero JJ, Bongiovanni GA (2014) Development of an Antioxidant Phytoextract of *Lantana grisebachii* with lymphoprotective activity against *in vitro* arsenic toxicity. *Adv Pharmacol Sci* 2014:1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/416761>

Souza MO, Branco CS, Sene J, DallAgnol R, Agostini F, Moura S, Salvador M (2014) Antioxidant and antigenotoxic activities of the Brazilian pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) o. kuntze. *Antioxidants* 3:24-37. <https://doi.org/10.3390/antiox3010024>

Sreerama YN, Sashikala VB, Pratape VM (2010) Variability in the distribution of phenolic compounds in milled fractions of chickpea and horse gram: Evaluation of their antioxidant properties. *J Agric Food Chem* 58:8322-8330. <https://doi.org/10.1021/jf101335r>

- Sun C, Liu Y, Zhan L, Rayat GR, Xiao J, Jiang H, Li X, Chen K (2020) Anti-diabetic effects of natural antioxidants from fruits. *Trends Food Sci Technol*.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.024>
- Sun Y, Yolitz J, Alberico T, Sun X, Zou S (2014) Lifespan extension by cranberry supplementation partially requires SOD2 and is life stage independent. *Exp Gerontol* 50:57-63. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.020>
- Taha E, Casanova G, Navarro R (2010) Resultados y Lecciones en Productos a partir del Piñón
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Udensi UK, Pacurari M, Stevens JJ, Patlolla AK, Noubissi F, Kumar S (2019) State of the science review of the health effects of inorganic arsenic: Perspectives for future research. *Environ Toxicol* 34:188-202.
<https://doi.org/10.1002/tox.22673>
- Tomasi IT, Machado CA, Boaventura RAR, Botelho CMS, Santos SCR (2022) Tannin-based coagulants: Current development and prospects on synthesis and uses. *Sci Total Environ* 822:. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153454>
- Tóthová L, Kamodyová N, Červenka T, Celec P (2015) Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 5:.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00073>
- Truong VL, Jeong WS (2022) Antioxidant and anti-inflammatory roles of tea polyphenols in inflammatory bowel diseases. *Food Sci Hum Wellness* 11:502-511.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.12.008>
- Uddin MS, Hossain MF, Mamun A Al, Shah MA, Hasana S, Bulbul IJ, Sarwar MS, Mansouri RA, Ashraf GM, Rauf A, Abdel-Daim MM, Bin-Jumah MN (2020) Exploring the multimodal role of phytochemicals in the modulation of cellular signaling pathways to combat age-related neurodegeneration. *Sci Total Environ* 725:138313.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138313>
- van der Ham RWJM, Jagt JWM, Renkens S, van Konijnenburg-van Cittert JHA (2010) Seed-cone scales from the upper Maastrichtian document the last occurrence in Europe of the Southern Hemisphere conifer family Araucariaceae. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 291:469-473. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.03.017>
- Varoni EM, Vitalini S, Contino D, Lodi G, Simonetti P, Gardana C, Sardella A, Carrassi A,

- Iriti M (2013) Effects of red wine intake on human salivary antiradical capacity and total polyphenol content. *Food Chem Toxicol* 58:289-294.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.04.047>
- Vatner SF, Zhang J, Oydanich M, Berkman T, Naftalovich R, Vatner DE (2020). Healthful aging mediated by inhibition of oxidative stress. *Ageing research reviews*, 64, 101194.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101194>
- Ventura-Lima J, Bogo MR, Monserrat JM (2011) Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:211-218.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.11.002>
- Verma C, Ebenso EE, Bahadur I, Quraishi MA (2018) An overview on plant extracts as environmental sustainable and green corrosion inhibitors for metals and alloys in aggressive corrosive media. *J Mol Liq* 266:577-590.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.110>
- Vomhof-DeKrey EE, Picklo MJ (2012) The Nrf2-antioxidant response element pathway: A target for regulating energy metabolism. *J Nutr Biochem* 23:1201-1206.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.005>
- Vuolo MM, Lima VS, Maróstica Junior MR (2018) *Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power*. Elsevier Inc.
- Wan QL, Fu X, Dai W, Yang J, Luo Z, Meng X, Liu X, Zhong R, Yang H, Zhou Q (2020) Uric acid induces stress resistance and extends the life span through activating the stress response factor DAF-16/FOXO and SKN-1/NRF2. *Aging (Albany NY)* 12:2840-2856.
<https://doi.org/10.18632/aging.102781>
- Wang C, Niu Q, Ma R, Song G, Hu Y, Xu S, Li Y, Wang H, Li S, Ding Y (2019) The Variable Regulatory Effect of Arsenic on Nrf2 Signaling Pathway in Mouse: a Systematic Review and Meta-analysis. *Biol Trace Elem Res* 190:362-383.
<https://doi.org/10.1007/s12011-018-1549-x>
- Warraich U e. A, Hussain F, Kayani HUR (2020) Aging - Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon* 6:e04107.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04107>
- Xu Z, Zhou G, Shimizu H (2010) Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signal Behav* 5:649-654. <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11398>

- Zacaría Herrera E, Casanova Andrello A, Appoloni CR (2019) Study of *Araucaria angustifolia* nuts by Gamma-ray and X-Rays Fluorescence spectrometry. Rev la Soc Científica del Paraguay 24:262-273. <https://doi.org/10.32480/rscp.2019-24-2.262-273>
- Zajaczkowską R, Kocot-Kępska M, Leppert W, Wrzosek A, Mika J, Wordliczek J (2019) Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Int J Mol Sci 20:. <https://doi.org/10.3390/ijms20061451>
- Zavala JA, Ravetta DA (2001) Allocation of photoassimilates to biomass, resin and carbohydrates in *Grindelia chiloensis* as affected by light intensity. F Crop Res 69:143-149. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(00\)00136-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(00)00136-2)
- Zhang Z, Pan T, Liu C, Shan X, Xu Z, Hong H, Lin H, Chen J, Sun H (2021) Cyclophosphamide induced physiological and biochemical changes in mice with an emphasis on sensitivity analysis. Ecotoxicol Environ Saf 211:111889. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111889>
- Zheng F, Gonçalves FM, Abiko Y, Lia H, Kumagaic Y, Aschner M (2020) Redox toxicology of environmental chemicals causing oxidative stress. Redox Biol 34:101475. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101475>
- Zuloaga FO, Belgrano MJ (2015) The catalogue of vascular plants of the southern cone and the Flora of Argentina: Their contribution to the World Flora. Rodriguesia 66:989-1024. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566405>
- Zuloaga FO, Belgrano MJ, Zanotti CA (2019) An update of the catalogue of the vascular plants of the Southern cone. Darwiniana 7:208-278. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2019.72.861>

BIBLIOGRAFÍA GENERADA COMO RESULTADO DE LA TESIS

- Echeverri Del Sarto J; Gallia MC; Ferrari A, Bongiovanni GA (2016). Tissue plant culture as a novel industrial strategy to produce biopharmaceuticals from endangered plants. En: Proceedings of 24th International Academic Conference, Barcelona. International Institute of Social and Economic Sciences, Prague-Vokovice, República Checa 113-121 <http://iises.net/proceedings/international-academic-conference-proceedings>
- Gallia MC; Bachmeier E; Ferrari A; Queralt M; Mazzeo A, Bongiovanni GA (2020). Pehuén

(*Araucaria araucana*) seed residues are a valuable source of natural antioxidants with nutraceutical, chemoprotective and metal corrosion-inhibiting properties. *Bioorganic chemistry* 104. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104175>

Gallia MC, Echeverri Del Sarto J, Bongiovanni GA (2021). Sustainable and efficient protocols for *in vitro* germination and antioxidants production from seeds of the endangered species *Araucaria araucana*. *J Genet Eng Biotechnol* 19, 181. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00280-6>

Silva S, Gallia MC, Luz J, Rezende AA, Bongiovanni GA, Araujo-Silva G, Almeida M (2022). Antioxidant Effect of Coenzyme Q10 in the Prevention of Oxidative Stress in Arsenic-Treated CHO-K1 Cells and Possible Participation of Zinc as a Pro-Oxidant Agent. *Nutrients* 14(16), 3265. <https://doi.org/10.3390/nu14163265>

Gallia MC, Ferrari A, Bongiovanni GA. Antioxidant activity and phenolic content of teas from native plants with traditional medicinal uses in Argentina. *Plant Foods for Human Nutrition*. En redacción.



Pehuén (*Araucaria araucana*) seed residues are a valuable source of natural antioxidants with nutraceutical, chemoprotective and metal corrosion-inhibiting properties

María C. Gallia^{a,b}, Evelin Bachmeier^c, Ana Ferrari^{a,b}, Ignasi Queralt^d, Marcelo A. Mazzeo^c, Guillermina A. Bongiovanni^{a,e,*}

^a Institute of Research and Development in Process Engineering, Biotechnology and Alternative Energies (PROBIEN, CONICET-UNCo), Neuquén, Argentina

^b School of Medicine, Comahue National University, Argentina

^c School of Odontology, Córdoba National University, Córdoba, Argentina

^d Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Barcelona, Spain

^e School of Agricultural Sciences, Comahue National University, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Natural product
Cyclophosphamide
Corrosive inhibitor
Anticorrosive
Tannins
Quercetin
EDXRF
Waste
Green chemistry
Circular economy

ABSTRACT

In the last decade, green chemistry has been attracting great interest in many contexts, including, among others, natural antioxidants. However, only a few works deal with natural residue extracts and biowaste, which could be an efficient, economical and environmentally friendly source for the production of useful compounds. In this study, we look for antioxidant activity in *Araucaria araucana* seeds, an iconic pine species of the Argentine and Chilean Patagonia commonly known as “pehuén”. Piñones are the edible pehuén seeds, and it is estimated that approximately 40 tons of piñones are harvested annually in Argentina and Chile. The chemical composition, antioxidants, metal corrosion-inhibiting properties and biological activity of edible and discarded piñón tissues were determined. Acute toxicity was discarded by *in vitro* testing and double fluorescent staining. Biological activity was evaluated *in vivo* by determining redox markers in salivary glands from rats treated with Cyclophosphamide (an oncological drug). All piñón tissues had antioxidants and antioxidant activity, with the coats showing the highest levels (up to 404 µg ascorbic acid equivalent per mg). The coats, in particular, had high gallic acid, catechin, quercetin and tannin contents, and more antioxidant activity, polyphenols and flavonoids than berries from the region. Results by X-ray fluorescence spectrometry showed that Na, Mg, P, S, Cl, K, and Ca were majority elements in the coat, embryo and endosperm. Furthermore, coat extract also showed significant anti-corrosion activity and *in vivo* protection against oxidative damage. The results indicate that piñón biowaste is a low-cost attractive source of natural antioxidants with potential nutraceutical, medical and metal corrosion protection applications.

1. Introduction

When free radicals are increased by cellular aerobic metabolism or exogenous factors, such as solar radiation, electromagnetic fields, pharmacological drugs or cigarette smoke (among others), an increase in antioxidants is required to maintain redox balance in the human body [1–3]. Otherwise, oxidative stress is promoted, causing structural and functional alterations in essential biomolecules of living organisms. Since oxidative stress plays an important role in many human diseases, the characterization of a new source of antioxidants has attracted increasing interest. In particular, vegetable sources are being intensely

studied for their preventive and therapeutic uses in cancer, Parkinson's, Alzheimer's, atherosclerosis, liver injury, rheumatoid arthritis, type 2 diabetes, neurodegeneration, kidney failure and aging, and also as chemoprotective agents in cancer therapy [4–8]. In addition, these compounds have increased industrial applications; for example, they are used as ingredients in the formulation of dietary supplements, as preservatives for food and cosmetics, and to prevent the degradation of rubber and oil-derived compounds [9,10]. Furthermore, many vegetable antioxidants are being investigated as green inhibitors for corrosion protection of metals and alloys [11,12].

In the context of a circular economy, working with biological waste

* Corresponding autor at: PROBIEN (Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas), CONICET - Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400, CP 8300 Neuquén Capital, Patagonia, Argentina.

E-mail address: guillermina.bongiovanni@probien.gob.ar (G.A. Bongiovanni).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104175>

Received 10 June 2020; Received in revised form 2 August 2020; Accepted 11 August 2020

Available online 29 August 2020

0045-2068/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

(biowaste) is crucial, because using such bioactive waste provides an efficient, economical and environmentally friendly source for the production of useful compounds. In this regard, high antioxidant content has been described in several species of the genus *Araucaria* [13–18]. However, only a few works deal with its residue extracts and biowaste, which are usually released into the environment [19–22].

In this work, we looked for antioxidant activity in the discarded coats of *Araucaria araucana* seeds, an iconic pine species of Patagonia. As a matter of fact, the residual coat of seeds from *Araucaria angustifolia*, a similar species present in southern Brazil and northern Argentina, has been described as rich in phenolic compounds and antioxidant capacity [17,18]. *Araucaria* is one of the three genera that belong to the Araucariaceae family, occupying a unique position among conifers, now restricted to the South American and Southwest Asia-Western Pacific region despite their extensive distribution in both hemispheres during the Mesozoic [23,24]. Therefore, most, if not all, of the current Araucarian taxa have evolved since the early Tertiary Period, suggesting that the success of these conifers may be governed by their ability to survive for long periods under adverse climatic conditions, such as drought, cold, fire, low fertility soil, or destructive volcanic disturbance. Perhaps for these reasons, *Araucaria araucana* (common name “pehuén”, Fig. 1) has been successful in the volcanic environment of the Argentine and Chilean Patagonia, with trees more than 1000 years old [23–26]. Pehuén forest occupies a total area of approximately 450,000 ha, of which 263,525 ha belong to Chile and 179,289 ha to Argentina [27]. The pehuén is considered a prehistoric tree, and is protected by law in both countries. Pehuén seeds, locally called “piñones” (singular “piñón”), have been used for food and for medicinal and religious purposes since ancient times. Nowadays, piñones also have great value for gastronomic tourism in some Patagonian localities. According to published data, approximately 90 kg/ha and 273 kg/ha of piñones are harvested annually in Argentina and Chile, respectively [27,28]. Piñón pulp (mean weight 1.8 g per piñón) consists of endosperm and embryo, and is the edible part of the seed (Fig. 1). As a by-product of food preparation, piñón coat, which weighs approximately 0.7 g, is usually discarded and takes considerable time to decompose. Whole piñones are light yellow in color, covered by an adherent membrane (thin coat) and encased in a very resistant reddish-brown coat (thick coat). Piñones are fleshy and have an ovate-oblong shape, measuring 4–5 cm in length and 1.5–2.0 cm in width, and weighing approximately 2.5 g (Fig. 1). Our previous results indicate that both the edible part of piñones and the biotechnologically obtained callus of piñón embryos show antioxidant capacity [29,30]. Therefore, the piñón coat from *A. araucana* (biowaste) could be a valuable source of natural antioxidants that has not yet been explored.

Given the enormous scientific, medicinal and industrial interest surrounding natural antioxidants, the objective of this study was to analyze and compare the chemical composition and antioxidant properties of the edible and discarded parts from piñones, seeking better properties in the residues. Considering that antioxidants obtained from biowaste are environmentally and ecologically friendly, inexpensive and readily available, we advanced in the study of possible applications for piñón coat extract as a therapeutic agent and green corrosive inhibitor.

2. Material and methods

2.1. Chemical reagents

Dulbecco modified essential medium (DMEM), antibiotics, reagents, and standards for HPLC were purchased from Sigma-Aldrich. HPLC grade solvents were purchased from Fisher Scientific Co. Fetal bovine serum was purchased from Natocor (www.natocor.com.ar). The RANSOD kit (SD 125) for superoxide dismutase activity (SOD) determination was from RANDOX Laboratories Ltd. Malondialdehyde (MDA) Assay Kit (ab118970) to detect lipid peroxidation was from

Abcam Laboratory. Uricostat enzimático AA (Cod. 1840107) from Wiener lab was used for uric acid determinations. MilliQ water was used in all of the experiments. PES 0.22- μ m sterile filter units were from GVS, USA. Cyclophosphamide 1000 as a lyophilized powder (catalogue number: 120105-04) was from LKM Laboratory (<http://www.lkmsa.com/>).

2.2. Vegetable material

Pehuén seeds (piñones, Fig. 1) were collected in 2017, 2018 and 2019, during the autumn, around Villa Pehuénia, located in the mid-west of the Neuquén province, at the foot of the Patagonian Andes of Argentina (38°50'02.3"S 71°12'24.1"W). Material collection was performed with the permission of the Villa Pehuénia-Moquehue authority. The collection site was located in an open forest dominated by pehuén trees. The regional climate is dry with distinct seasons, warm summers (average temperature 18.9 °C) and cold winters (average temperature –2.4 °C). Rainfall occurs mainly in the cold period, from April to September, with a snowfall of up to 792 mm (official data contributed by AIC; www.aic.gov.ar). Healthy seeds were selected, washed, and immediately transported to the laboratory to prepare the extracts. Piñón flour and piñón coffee were provided by NOUS, a food company from Villa Pehuénia, Neuquén, Argentina. The piñones were baked at 150 °C for 24 and 72 h to obtain flour and coffee, respectively.

2.3. Preparation of piñón extracts

Under normal cooking conditions (whole piñón, including coats), the seeds were divided into three groups and subjected to different treatments before the extracting procedures. The first group was untreated (fresh or control group), the second (120 g) was boiled in 1500 ml of distilled water at 100 °C for 10 min (boiled group), and the third was baked at 150 °C for 72 h (baked group). Then, each group was separated into coat and pulp. Thin and thick coats were obtained from the coat, while endosperm and embryo were obtained from the pulp. The flour and coffee contained endosperm, embryo and around 1% thin coat as contaminant. The fresh and boiled tissues were lyophilized. Water obtained from the boiled treatment was stored at –20 °C until use. The other samples were milled into a fine powder and stored at room temperature in hermetic bags. In order to obtain the extracts, an eco-friendly procedure was applied: 12 g of each dried sample were extracted with 150 ml of distilled water at 100 °C (this procedure was more efficient than extraction at room temperature, data not shown), and then kept in the dark overnight at 20 °C. Extracts were filtered through a 10 μ m pore nylon filter and stored at –20 °C until use. To determine *in vivo* protective effects, extract was prepared daily as follows: 40 g of dried and milled whole fresh piñón coat [thin coat + thick coat] were extracted with 2 L of potable water at 100 °C, kept in the dark for 60 min, and then filtered through a 10 μ m pore nylon filter. After that, 50 ml of extract were placed in water bottles for feeding individual rats at the laboratory.

2.4. Analysis of antioxidant properties of piñón extracts

2.4.1. Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

The reducing ability of the extracts was estimated by the FRAP assay [31] according to Echeverri Del Sarto *et al.* [30], using ascorbic acid as reference.

2.4.2. Free radical scavenging capacity (DPPH assay)

The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was used, following the procedure of Brand-Williams *et al.* [32]. The radical scavenging activity of the extracts was monitored over 300 s. Results were compared with a reference curve of 0.1 mg/ml ascorbic acid solution. According to these results (Fig. S1 in supplementary material), the extracts' radical scavenging activity was expressed as percentage



Fig. 1. Photograph of *Araucaria araucana*, seeds (piñones) and its different tissues.

inhibition at 5 s of incubation, and calculated using the following formula: % inhibition = $[(AB - AS) / AB] \times 100$, where (AB) = blank absorbance value (reaction mixture without sample and incubation), and (AS) = sample absorbance value at 5 s.

2.5. Chemical characterization of piñón extracts

2.5.1. Determination of total phenolic, tannin and flavonoid contents

Total phenolic content in the extracts was determined following the Folin-Ciocalteu colorimetric method [33] according to Soria *et al.* [34] using gallic acid as reference. The tannin content estimate was based on their property of co-precipitating with proteins [35]. Tannins were measured in fresh whole piñón coat extract. To do so, phenolic content was determined before and after incubation with bovine serum albumin (1 mg/ml protein). The percentage of precipitated polyphenols was considered as a percentage of total tannins. Flavonoid content was measured by the aluminum chloride colorimetric assay [36], according to Soria *et al.* [34], using quercetin as reference.

2.5.2. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography (HPLC)

First, fresh piñón coat extract was dried in a rotary evaporator, and then the residue was re-dissolved in ultra-pure methanol. All samples, in triplicate, were filtered through a 0.22 μm filter unit before injection. The phenolic profile was determined by an HPLC system (Agilent 1260, Quat Pump VL, ALS, TCC, DAD, and RID, with openLAB Chem Station Software) equipped with a reversed-phase ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (4.6 \times 100 mm; 3.5 μm , Agilent). Two different column temperatures (25 $^{\circ}\text{C}$ and 40 $^{\circ}\text{C}$) were used to achieve chromatographic separation, using gradient elution with solvents, 1% formic acid in water (A) and acetonitrile (B) in both methods. Peak identification was carried out by comparison of their retention times with those obtained by injecting the following standards in the same conditions: gallic acid, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, quercetin, rutin and ferulic acid.

2.5.3. Multielemental analysis by energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF)

For the quantitative multielemental analysis of the samples, a touch-control S2 Ranger EDXRF system (Bruker AXS GmbH, Germany) with a Pd X-ray tube and XFlash® Silicon Drift Detector (SDD) was used. Piñón samples were prepared for analysis following the methodology and procedures detailed in previous work [37,38]. Spectral data were obtained at four different voltages (10, 20, 40, and 50 KV) to properly excite and determine elemental composition from sodium ($n = 11$) to lead ($n = 82$). Evaluation of EDXRF spectra and calculation of elemental concentrations were performed using the software supplied with the equipment. Instrumental setup and calibration curves were carried out using a set of 14 vegetal certified reference materials according to Gallardo *et al.* [37]. Each sample was measured three times, and mean value and standard deviation were calculated.

2.6. Analysis of biological activities of piñón extracts

2.6.1. Early effects on cell viability

The adverse effects of the coat extract on cell viability were analyzed according to a model previously developed by us to screen for toxic, cytoprotective and antioxidant plant extracts [39–42]. Accordingly, VERO cells (kidney epithelial cells from African green monkey; European Collection of Cell Cultures) were seeded onto 96-well tissue culture test plates, incubated for 24 h, and then exposed for 2 h in fresh medium containing different extract concentrations. Next, early effects on cell viability were tested by crystal violet staining or using a double-fluorescence staining technique (DMEM containing 2 µg/mL propidium iodide or 10 µg/mL fluorescein diacetate (FDA), 15 min at 37 °C in the dark).

2.6.2. Determination of the chemoprotective activity of piñón waste

The experiment included 28 12-week-old male albino Wistar rats housed in individual metabolic cages according to procedures described in Mazzeo *et al.* [43]. The proper care and use of animals followed the International Protocol for the Care and Treatment of Animals (NIH) and were approved by the Bioethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of the National University of Córdoba, Argentina (33620180100414CB). Each rat had free access to food and water or fresh piñón coat extract (50 ml per day per rat). Fresh whole coat extract was prepared daily as described in section 2.3. This treatment provides an antioxidant power equivalent to 40 mg of ascorbic acid per day, according to the FRAP assay. The animals were divided into four experimental groups (7 per group):

C) Control group: non-treated rats

CP) Cyclophosphamide-treated group: at the fifth and sixth day, each animal was treated with 50 mg/kg body weight of CP i.p. daily

AO) Antioxidant-treated group: the rats drank piñón coat extract throughout the experiment

CP + AO) Cyclophosphamide + Antioxidant-treated group: idem to CP, but the rats drank piñón coat extract throughout the experiment

On the seventh day, the food was removed, but the rats kept drinking water or extract, as appropriate. On the eighth day, the rats were anesthetized with a combined dose of ketamine and xylazine (80 and 12.8 mg / Kg, respectively), and the submandibular glands (SMG) were dissected. After the surgical procedure, the animals were euthanized according to approved procedures, described in Mazzeo *et al.* [43]. Immediately after extraction, 10 mg of SMG were homogenized in buffer, centrifuged at 13000 rpm for 30 min at 4°C, and then SOD (superoxide dismutase activity), MDA (Malondialdehyde content) and uric acid content were determined in the supernatant following the manufacturer's instructions. All determinations were performed in triplicate.

2.7. Analysis of corrosion-inhibiting properties of piñón waste

Corrosion was evaluated by measuring weight loss following the ASTM G 31-72 (2004) method for corrosion testing of metals [44], according to Boujakhrou *et al.* [45]. Fresh piñón coat extract was dried in a rotary evaporator, and then the residue was re-dissolved in methanol. Steel flat washers of 2.45 cm² were polished with sandpaper, weighed accurately and immersed in a 60 ml beaker containing 20 ml of 1.0 M HCl (control) or 1.0 M HCl with different concentrations of piñón coat extract. Although 6 h were used in Boujakhrou's work, our results showed that, after 5 h of exposure, the 1 M HCl solution significantly decreased the steel washers' weight and that this time was enough to evaluate the anticorrosive properties of antioxidant piñón coat extract. Therefore, after 5 h of acid immersion, the washers were removed, washed, dried and weighed accurately. The corrosion inhibition efficiency ($\eta_{WL}\%$) was calculated as follows: $\eta_{WL}\% = (1 - w_1/w_0) \times 100$, and the corrosion rate (C_R) as follows: $C_R = (W_b - W_a) / At$, where w_0 and w_1 are the values of corrosion weight losses of steel washers in uninhibited and inhibited (with extract) solutions, W_b and W_a are the sample weight before and after immersion in the tested solution, respectively, A is the total area of the steel washer (cm²), and t is the exposure time (h) [45].

2.8. Statistical analysis

All the results are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis of the data was performed by Student's *t*-test, and *P* value < 0.05 was considered statistically significant with respect to control.

3. Results and discussion

In order to identify the contributions of separate piñón components to the overall antioxidant activity and chemical composition, Fig. 2 summarizes the results regarding antioxidant capacity, and the phenolic and flavonoid content of the different tissues from one dried fresh seed. The most relevant result was that 97% of antioxidant power, 93% of total phenols and 75% of flavonoids of the piñón were found in the coat, which represents 27% of the seed (w/w) and is discarded as waste. Therefore, the results in Fig. 2 show that pulp would provide flavonoids to the diet. The following sections describe the antioxidant, nutritional, pharmacological and metal corrosion-inhibiting properties of piñón extract from different tissues and under different treatments.

3.1. Antioxidant properties of piñón extracts

3.1.1. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Fig. 3 shows antioxidant capacity per milligram of each dried piñón tissue. Under all treatments, thin coat proved to be the tissue with the highest antioxidant capacity. Although the antioxidant power of the seeds decreased after boiling (20.2 vs. 23.3 µg AAeq per mg of dried seed) and after baking (19.5 vs. 23.3 µg AAeq per mg of dried seed) with respect to control, those decreases were not statistically significant. However, a significant reduction of antioxidant capacity was observed for the boiled coat, which was accompanied by the appearance of antioxidants in water (10.8 µg AAeq per mg of dried coat, or 3.1 µg AAeq per mg of dried total seed). This result suggests a migration of antioxidants from coat to water; thus, the antioxidant power in the water shows a reduction in boiled coats (Fig. 3). Migration could be favored by the breakdown of cell wall compounds embedded into the seed and by the destruction of cell walls during heating. In addition, embryo and endosperm antioxidant power was not affected by boiling (Fig. 3). Thus, piñón pulp would not be receiving antioxidants from the coat during boiling either, unlike Brazilian piñones (*A. angustifolia* seeds) [17]. On the other hand, antioxidant capacity in flour and coffee (baked pulp) was higher than in the fresh pulp. These results could be explained by the presence of thin coat residues in these foods, which are

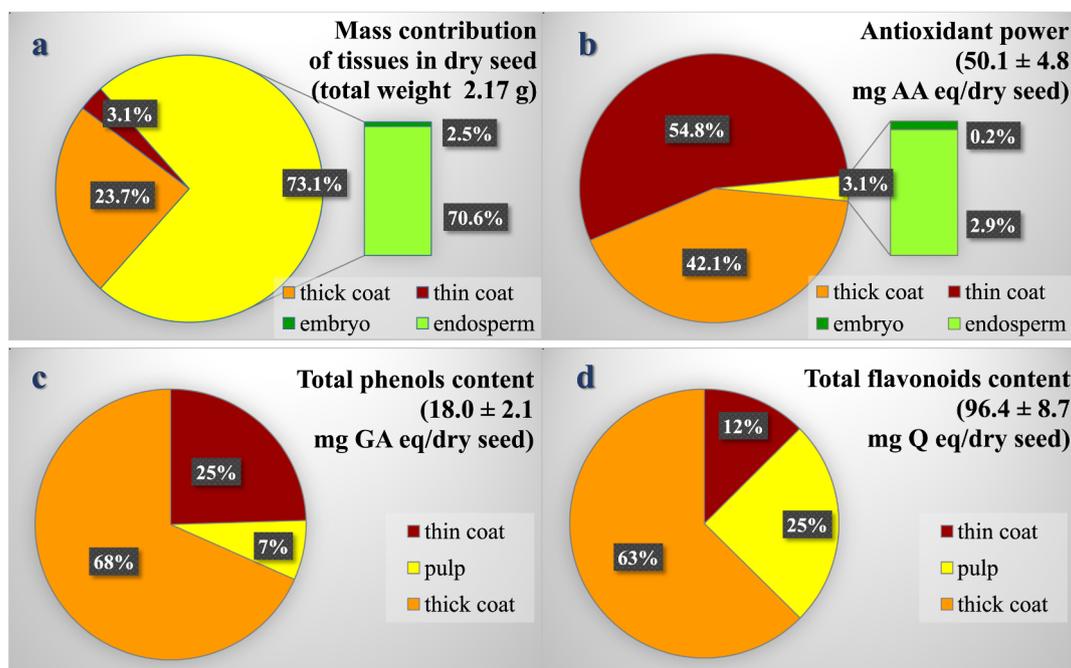


Fig. 2. Mass contribution of tissues (a), antioxidant power (b), phenolic (c) and flavonoid content (d) of the different tissues from one dried fresh seed. The values are expressed as mean ± SD of four independent experiments.

difficult to remove after baking and could contribute antioxidants (Fig. 3). In short, one seed contains 50.1 mg AAeq, but only 1.5 mg are used in food form, and the rest (coat) is discarded. Thus, people are actually discarding material with more antioxidant content (83 µg AAeq per mg of dried fresh piñón coat) than regional antioxidant fruits (Argentine and Chilean berries), such as *Luma chequen* or chequén, *Ugni molinae* or murta, *Amomyrtus meli* or meli, and *Luma apiculata* or arrayán (19, 20, 22 and 23 µg AAeq per mg of dried fruit, respectively, taking into account conversion factors) [46].

3.1.2. Free radical scavenging activity

Piñón antioxidant activity was also determined by measuring the free radical scavenging activity of piñón extracts at different incubation

times (curves in Fig. S1, in the supplementary material), and then 5 s of incubation were chosen to compare extract activity. Results showed that thin coat extracts were more active because they exhibited a higher inhibiting percentage of the initial DPPH radical concentration (Fig. 4). Free radical scavenging activity was significantly decreased by heating both coats at 150 °C. Decreased activity in boiled thick coat was consistent with the activity found in water, while the activity of the pulp was not altered. These results were consistent with those obtained by FRAP assay, reinforcing previous speculations.

3.2. Phytochemical analysis of piñón extracts

As occurs in several vegetable foods, polyphenol content is highly

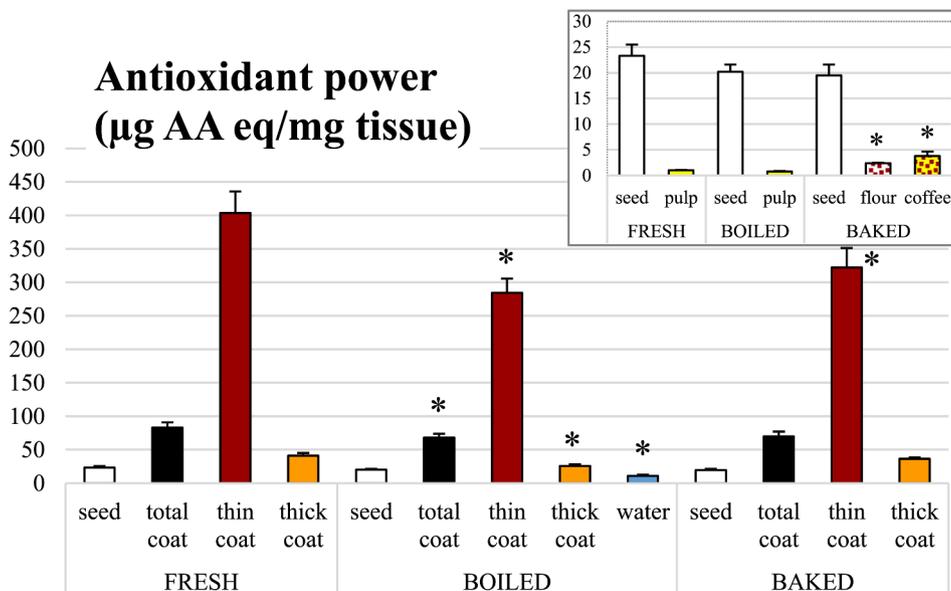


Fig. 3. Antioxidant power of extracts obtained from tissues of fresh, boiled and baked piñones, food derivatives and water obtained in boiled treatment (µg AAeq/mg tissue). The values are expressed as mean ± SD of four independent experiments. *: Significant differences with control.

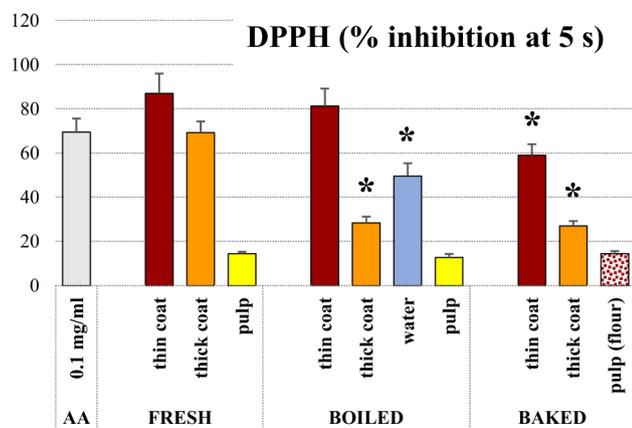


Fig. 4. Percentage inhibition of DPPH radical at 5 s by extracts obtained from tissues of fresh, boiled and baked piñones and water obtained in boiled treatment (all diluted 10 folds), compared to ascorbic acid (0.1 mg/ml). The values are expressed as mean \pm SD of two independent experiments. *: Significant differences with control.

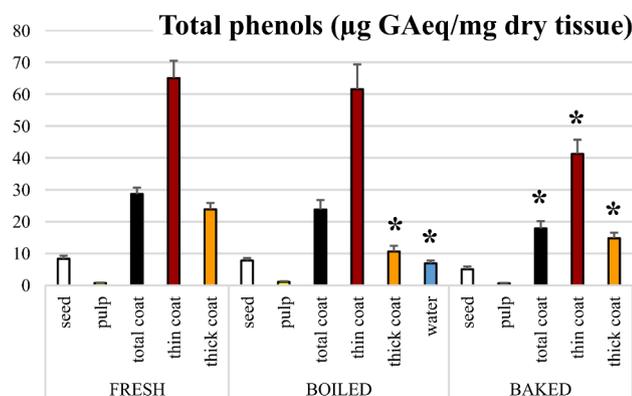


Fig. 5. Total phenolic content in extracts obtained from tissues of fresh, boiled and baked piñones, and water obtained in boiled treatment ($\mu\text{g GAEq/mg dry tissue}$). The values are expressed as mean \pm SD of two independent experiments. *: Significant differences with control.

related to antioxidant activity (Fig. 2). Indeed, coat provides more phenolic compounds than pulp. Additionally, the results in Fig. 5 suggest that thin coat is the tissue with most phenol content and that part of the phenolic compounds migrated from thick coat to water during boiling. Considering that several tannins are thermo-labile (hydrolysable tannins) and that small phenolic compounds can be produced by their partial degradation/hydrolysis, the migration of such compounds could explain the decreased phenolic content in thick coat and its appearance in the water. In fact, 76.5% of polyphenols in fresh coat coprecipitated with BSA (results not shown), suggesting a high proportion of tannins in this tissue (2.2% w/w). This concentration is consistent with the results described for Brazilian piñones (*A. angustifolia*) [17,47].

Although it was not statistically significant, an increase in phenolic content was found in boiled pulp with respect to control (1.14 vs. 0.81 $\mu\text{g GAEq per mg of dried pulp}$), suggesting that a minimal migration of phenols from coat to pulp could be occurring. Additionally, part of the coat phenols would be lost by heating. In this regard, phenol content (as $\mu\text{g GAEq per mg of dried whole coat}$) decreased 16% and 36% after boiling and baking, respectively, with respect to control (Fig. 5). The results shown in Fig. 5 were in agreement with the reductions in polyphenol levels and antioxidant activity observed in other vegetables after cooking [48,49]. Despite this fact, fresh piñón residues (28.7 $\mu\text{g GAEq per mg of dry coat}$) and heated residues (23.8 and 17.9 $\mu\text{g GAEq per mg of dried boiled and baked coat}$, respectively) were a rich source of phenols when compared with Argentine and Chilean

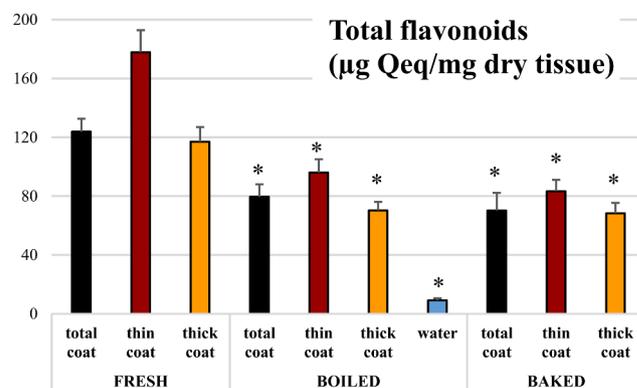


Fig. 6. Total flavonoid content in extracts obtained from tissues of fresh, boiled and baked piñones, and water obtained in boiled treatment ($\mu\text{g Qeq/mg dry tissue}$). The values are expressed as mean \pm SD of two independent experiments. *: Significant differences with control.

berries: *Luma chequen* or chequén, *Ugni molinae* or murta, *Amomyrtus meli* or meli and *Luma apiculata* or arrayán (5.11, 9.24, 17.52 and 27.61 $\mu\text{g GAEq per mg of dried fruit}$, respectively) [46]. On the other hand, phenol content in the thin coat (around 25% of phenols in seed, Fig. 2) does not account for the high proportion of antioxidant power in this tissue (around 55% seed activity, Fig. 2). This may suggest the presence of other antioxidant compounds in piñón coat, but this is an interesting assumption that has not yet been studied.

Similarly, the coat provided the greatest portion of seed flavonoids (Fig. 2). Again, thin coats contained more flavonoids than thick ones (Fig. 6). However, both coats lost flavonoids in a similar proportion (around 40%) after heat treatment, except for boiled piñones, which additionally lost 9% of flavonoids probably due to migration from thick coat to water (Fig. 6). As previously reported, fresh, boiled and baked piñón waste (whole coats) contained more flavonoids (123.8, 79.5 and 70.1 $\mu\text{g Qeq per mg of dried coat}$, respectively) than the Argentine and Chilean berries mentioned above: *Luma chequen* or chequén, *Ugni molinae* or murta, *Amomyrtus meli* or meli and *Luma apiculata* or arrayán (2.57, 5.54, 11.76 and 12.80 $\mu\text{g Qeq per mg of dried fruit}$, respectively) [46].

In short, the piñón coat contains more antioxidant power and higher phenolic and flavonoid content than other seed tissues, and some of those antioxidants could migrate from coat to water during boiling. Thus, all the waste obtained during cooking procedures was also rich in antioxidants.

The phenol and flavonoid content in fresh whole coat was analyzed by HPLC. Considerable peaks were observed in the analysis at 25 °C where gallic acid, with a 31.3% proportion, was the highest, while catechin represented 15.8% of the spectrogram area. Analysis at 40 °C revealed three substantial peaks, where quercetin, with a 67.6% proportion, was the main component. These results were consistent with those reported for Brazilian piñón coat, which contained mainly proanthocyanidins (chains of catechin, epicatechin, and their gallic acid esters), phenolic acids, flavonols and flavones [47,50,51]. To extend the chemical characterization of piñón tissues, including their nutritional valorization, their elemental composition was determined by EDXRF (Table 1). Piñón endosperm composition (97% w/w of edible pulp) was similar to that described for Brazilian piñones [52]. In this regard, one serving of piñones (14 pulps from fresh piñones) contains essential elements, such as P, K, Mn, Fe, Cu, and Zn, in significant nutritional concentrations, as well as Rb [53]. Furthermore, piñón coat (biowaste) contains higher concentrations of Ca, Cr, and Fe than pulp, and a significant concentration of elements such as Cu, Zn, Mn, Fe, which participate in the endogenous antioxidant systems. Regarding Cr, speciation will be required to determine its toxicity. On the other hand, only Cl and K decreased significantly after heating. The results also suggest

Table 1
Elemental composition of tissue of piñones by EDXRF ($\mu\text{g/g}$).

	LLD	RDA	FRESH						BOILED				BAKED					
			(%)	embryo		endosperm		total coat		thin coat		thick coat		thin coat		thick coat		
Na	152	2.7	4600	\pm 300	4100	\pm 300	4033	\pm 337	4800	\pm 600	4500	\pm 100	4000	\pm 300	6100	\pm 600	5000	\pm 400
Mg	38	1.8	555	\pm 40	490	\pm 33	540	\pm 200	4000	\pm 300	3500	\pm 100	3300	\pm 300	4000	\pm 200	4200	\pm 100
P	9	6.7	4000	\pm 100	2100	\pm 200	3000	\pm 200	4000	\pm 100	4500	\pm 100	3600	\pm 400	5100	\pm 200	3600	\pm 25
S	1.3		1415	\pm 60	895	\pm 55	820	\pm 96	700	\pm 100	600	\pm 100	1700	\pm 100	700	\pm 100	1400	\pm 25
Cl	8.6	1.6	3100	\pm 200	2800	\pm 200	2345	\pm 138	208	\pm 14	165	\pm 8	331	\pm 12	195	\pm 22	230	\pm 13
K	61	4.6	13,600	\pm 100	10,700	\pm 1100	3680	\pm 218	235	\pm 16	265	\pm 30	265	\pm 24	260	\pm 25	145	\pm 18
Ca	45	0.4	305	\pm 24	206	\pm 25	951	\pm 195	860	\pm 24	870	\pm 35	750	\pm 35	860	\pm 25	710	\pm 30
Cr	1.7	0	ND		ND		15	\pm 3	12	\pm 5	15	\pm 3	14	\pm 5	11	\pm 4	8	\pm 2
Mn	1.1	15.3	26	\pm 3	11	\pm 4	18	\pm 4	11	\pm 3	9	\pm 2	15	\pm 3	16	\pm 3	20	\pm 3
Fe	0.3	8.3	99	\pm 2	22	\pm 4	67	\pm 6	37	\pm 3	42	\pm 3	47	\pm 8	45	\pm 4	45	\pm 6
Cu	0.4	19.6	15	\pm 2	12	\pm 4	18	\pm 2	13	\pm 2	12	\pm 2	10	\pm 3	13	\pm 2	9	\pm 2
Zn	0.2	7.1	54	\pm 4	14	\pm 2	16	\pm 3	8	\pm 1	8	\pm 1	16	\pm 1	8	\pm 2	9	\pm 2
Br	0.3		6	\pm 1	4	\pm 1	4	\pm 1	ND		ND		ND		3	\pm 1	3	\pm 1
Rb	0.2	138	47	\pm 3	35	\pm 4	19	\pm 2	4	\pm 2	7	\pm 0	9	\pm 2	22	\pm 3	11	\pm 2
Sr	0.5		3	\pm 1	3	\pm 1	14	\pm 3	11	\pm 4	16	\pm 1	16	\pm 5	13	\pm 2	13	\pm 1

The values represent the concentration of elements as $\mu\text{g/g}$ of dry tissue. LLD: Low Limit of Detection. % RDA: correspond to percentage of element provided by one serving of piñones (calculated with endosperm data, 97% w/w of edible part) with respect to recommended dietary allowances. One serving equals 25 g (14 pulps from fresh piñones) and has 16% moisture. ND: not detected.

Antioxidant profile in salivary glands

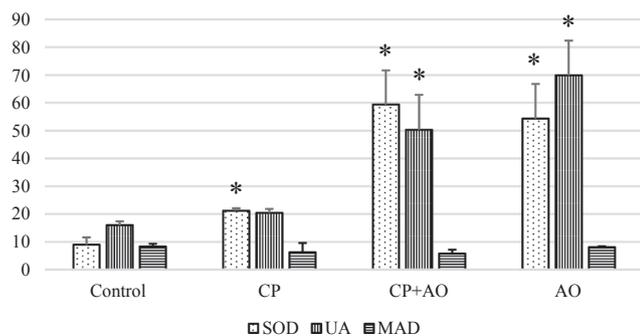


Fig. 7. Effect of fresh total coat extract (AO), cyclophosphamide (CP), and co-treatment (CP + AO) on superoxide dismutase activity (SOD; units/g), uric acid (UA; mg/g) and malondialdehyde (MDA; M/g) contents in submandibular glands of Wistar rats. Control: non-treated rats. *: Significant differences with control.

that piñón coat (fresh or cooked) could be also used for animal nutrition since it covers the mineral requirements for beef cattle [54].

In fact, the results shown in this study indicate that the piñón coat has high antioxidant power, high tannin content, quercetin, and gallic acid, as well as essential elements. Since these properties have nutritional, medical, and industrial relevance, the biological activity and corrosion-inhibiting properties of the piñón coat were studied.

3.3. Biological activities of piñón extracts

3.3.1. Early effects on cell viability

In order to rule out any toxic tissue effects, VERO cell viability was studied. It was found that aqueous extracts of embryo, endosperm and coat did not decrease cell viability at any of the concentrations used after 2 h of incubation. In addition, apoptotic phenotype was ruled out by propidium iodide exclusion, indicating plasma membrane integrity, and by intracellular green fluorescence, indicating fluorescein diacetate endocytosis followed by hydrolysis (viability) (Fig. S2 in the supplementary materials). Although the incubation time was relatively short for toxicological conclusions, these results are consistent with the historical medicinal and nutritional uses of these seeds by regional communities [55], mainly because the whole seed (pulp with coat) is processed to obtain foods and medicines. On the other hand, since the coat

is usually discarded after processing, this is the first study that evaluates its effect on cell viability. That is why it is important to point out that these preliminary results did not show any cytotoxic effect of piñón waste (including water, result not shown).

3.3.2. Protective activity of piñón coat extract in chemotherapy

The cytostatic drug cyclophosphamide (CP) generates reactive oxygen species (ROS), which, among other effects, promote clinical and histological alterations in oral mucosa and periodontal tissues, as well as dysfunctions in the salivary glands and changes in saliva, in both humans and rats [56,57]. It is well known that the proper functioning of salivary glands is essential in maintaining oral health. Superoxide dismutase (SOD) and uric acid secreted by salivary glands are primarily responsible for the antioxidant potential of saliva and have displayed a positive correlation to oral health. Uric acid is a natural antioxidant that may assist in the removal of superoxide by preventing the degradation of SOD, the enzyme responsible for clearing superoxide from cells [58]. In addition, SOD and uric acid induce stress resistance and may extend lifespan [59,60]. Taking this into consideration, the present study was designed to examine the effect of piñón coat extract on SOD activity, uric acid content and lipoperoxidation (MDA) in the submandibular glands of CP-treated rats. Fig. 7 shows that the salivary glands of the control Wistar rats have a balance between antioxidant agents SOD and uric acid, and oxidative marker MAD content in a 1.1:1.9:1 ratio (units:mg:M per gram of fresh glandular tissue, respectively). In agreement with previous reports [56], a significant increase in SOD activity (235%) was observed in CP-treated animals with respect to control (100%). Since an increase in lipoperoxidation in CP-treated rats was not detected, we speculate that the SOD increase would be enough to maintain redox balance in the salivary glands. Indeed, in patients under cyclophosphamide-containing chemotherapy, salivary SOD activity increases as a defense mechanism against oxidative stress produced by the treatment [56]. A significant increment of endogenous antioxidants (605 and 436%, SOD and uric acid, respectively) was observed in the glands of rats treated with an exogenous antioxidant (piñón coat extract, AO group) with respect to control (100%); suggesting a greater free radical scavenging activity. Similar results were observed in rats under CP and antioxidant co-treatment (CP + AO group), which indicates the presence of enough endogenous antioxidants to maintain redox balance and protect against oxidative damage. In this regard, uric acid was found to provide significant protection against cyclophosphamide-induced bone marrow depression and micronucleated polychromatic erythrocytes in mice [61].

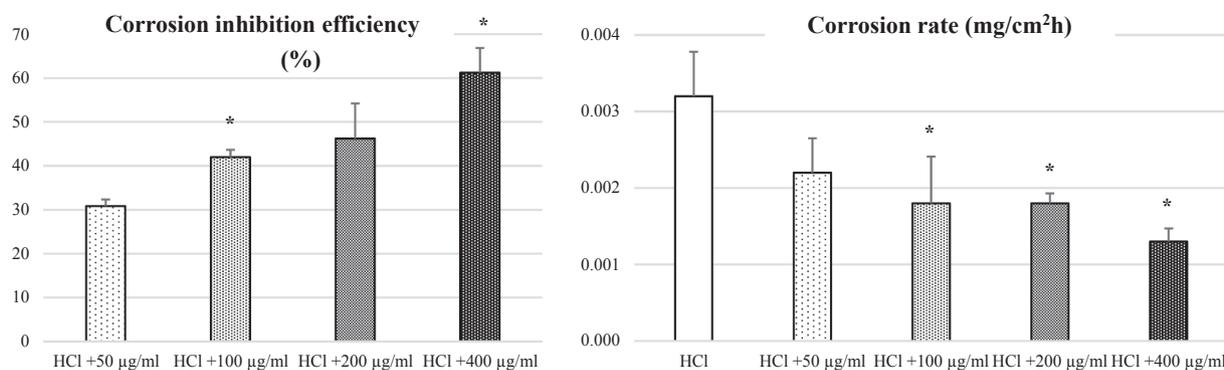


Fig. 8. Effect of fresh total coat extract at different concentrations (50, 100, 200 and 400 µg of dried coat per ml of incubation volume) on steel corrosion in HCl 1.0 M. left: corrosion inhibition efficiency (%), right: corrosion rate (mg/cm²h). The values are expressed as mean ± SD of two independent experiments. *: Significant differences with control.

Additionally, a histological examination has shown that antioxidant vitamin E displayed salivary gland acinar protection in rats treated with CP [62]. Overall, present results indicate that piñón coat extract, which contains a wide variety of antioxidant compounds such as flavonoids and polyphenols, SOD cofactors such as Cu, Zn, Mn, Fe, and salivary antioxidant enhancers, could be an appropriate candidate for study as a chemoprotective agent against adverse effects produced on the oral cavity by oncological drugs such as cyclophosphamide.

3.4. Corrosion test

Stainless steel is widely used in various fields of modern industrial society because of its good corrosion and oxidation resistance. However, it is still susceptible to corrosion in some industrial processes, such as oil well acidizing, acid cleaning and acid descaling. The corrosion of metals and alloys, particularly in acidic media, is an important industrial problem. Based on environmental consequences, the use of non-toxic and natural products as corrosion inhibitors has become important because of their advantages: environmentally friendly and biodegradable, readily available and obtained at a relatively low cost. In this context, the corrosion-inhibiting property of piñón waste extract (coat) was evaluated. Our results show that after 5 h of exposure, piñón coat extract showed an inhibition efficiency that increased proportionally to extract concentration, up to 61% at a concentration of 400 µg dried coat per ml of HCl (Fig. 8, left). On the other hand, the corrosion rate decreased significantly by adding piñón coat extract from 100 µg/mL of HCl (Fig. 8, right). This inhibitory activity was similar to that described for solid biowaste from fresh banana leaves, sugarcane, and watermelon rind [12]. Several studies have attributed anti-corrosion capacity to the presence of molecules with polar functional groups with S, O, and N atoms, in alkaloids, polyphenols, tannins and flavonoids, which form a protective film that adheres with more resistance to the surface of the steel resulting in a barrier for the oxidizing agent such as HCl or others [11,12,63,64]. When piñón coat extract antioxidants were analyzed, a high content of tannins (2% w/w) and flavonoids (up to 124 µg Qeq/ mg of dry weight) was found, with a high proportion of quercetin. This composition is consistent with others described as green corrosive inhibitors [12,63]. Overall results suggest that piñón waste (piñón coat) could be a suitable material to produce new green corrosion inhibitors.

4. Conclusion

The results shown here indicate that the piñón coat, which is discarded as waste (biowaste), has very high antioxidant power. Hence, residues from the piñón food industry are rich in valuable phytochemicals such as tannins, quercetin and gallic acid, as well as significant nutritional elements and other not yet identified components,

which contribute to their nutritive and free radical scavenging activity. Furthermore, these properties are responsible, at least in part, for inducing a significant increase in the endogenous antioxidant defenses of saliva, which may provide high protection against oxidative injury states. This activity may be particularly relevant to the development of adjunctive treatments to help prevent pain, odynodysphagia, dysgeusia, dehydration, malnutrition and systemic infections associated with treatment-related oral mucositis seen in over 500,000 cancer patients each year [65].

In addition, the antioxidant properties of piñón coat extract could be improved for use in the wide-ranging field of degradation of metallic materials in the future. Therefore, the results shown in the present study indicate that piñón coat extract would be a valuable and advantageous source of nutraceutical compounds, chemoprotective agents or green inhibitor of metal corrosion, due to its high antioxidant power, oligo-element content, non-toxic nature, low cost and environmental benefits.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the FONCyT (PICT 2013-0458-2014/2018), the CONICET (PIP0239-2016/2019, PUE0067-2017-2021), the National University of Comahue (PIN04/N025-2015/2019), and the Ministry of Education of Argentina (VT12-UNCOMA4094-2016/2017), SeCyT-UNC (33620180100930CB). Elemental analysis work was developed in the framework of activities of the CEX2018-000794-S project (Spanish Ministry of Science and Innovation). The authors thank Nelda B. Gaydou, CT, American Translators Association Member No 5328, for proofreading the manuscript, and Ing. René Valero, Dra. Carmen Maturano, Bioq. Jorge A. Linares, Od. María M. López, Ing. Leonardo Bajda and Qca. Marcela Amaro for their technical assistance during sample preparation and HPLC determinations. The authors also appreciate the kind collaboration of Yanina and Norma from NOUS in Villa Pehuena, Neuquén, the Villa Pehuena municipal authorities, and the AIC (Interjurisdictional Authority of the Limay, Neuquén and Negro River Basins) for the meteorological data provided.

Declaration of Interest statement

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104175>.

References

- [1] A.L. Petrou, A. Terzidaki, A meta-analysis and review examining a possible role for oxidative stress and singlet oxygen in diverse diseases, *Biochem. J.* 474 (2017) 2713–2731, <https://doi.org/10.1042/BCJ20161058>.
- [2] E. Kivrak, K. Yurt, A. Kaplan, I. Alkan, G. Altun, Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system, *J. Microsc. Ultrastruct.* 5 (2017) 167, <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2017.07.003>.
- [3] Q. Guo, F. Li, Y. Duan, C. Wen, W. Wang, L. Zhang, R. Huang, Y. Yin, Oxidative stress, nutritional antioxidants and beyond, *Sci. China Life Sci.* 63 (2020) 866–874, <https://doi.org/10.1007/s11427-019-9591-5>.
- [4] A. Kajal, R. Singh, An allied approach for in vitro modulation of aldose reductase, sorbitol accumulation and advanced glycation end products by fl avonoid rich extract of *Coriandrum sativum* L. seeds, *Toxicol. Reports.* 5 (2018) 800–807, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.08.001>.
- [5] F.F. de Araújo, D. de Paulo Farias, I.A. Neri-Numa, G.M. Pastore, Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential, *Food Chem.* (2020) 127535, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>.
- [6] F. Oppedisano, J. Maiuolo, M. Gliozzi, V. Musolino, C. Carresi, S. Nucera, M. Scicchitano, F. Scarano, F. Bosco, R. Macri, S. Ruga, M.C. Zito, E. Palma, C. Muscoli, V. Mollace, The Potential for Natural Antioxidant Supplementation in the Early Stages of Neurodegenerative Disorders, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 2618, <https://doi.org/10.3390/ijms21072618>.
- [7] Q. Ma, R. Wei, Z. Sang, J. Dong, Structural characterization, neuroprotective and hepatoprotective activities of flavonoids from the bulbs of *Heleocharis dulcis*, *Bioorg. Chem.* 96 (2020) 103630, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103630>.
- [8] H. ur Rashid, Y. Xu, N. Ahmad, Y. Muhammad, L. Wang, Promising anti-inflammatory effects of chalcones via inhibition of cyclooxygenase, prostaglandin E₂, inducible NO synthase and nuclear factor kb activities, *Bioorg. Chem.* 87 (2019) 335–365, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.033>.
- [9] Y.C. Boo, Emerging strategies to protect the skin from ultraviolet rays using plant-derived materials, *Antioxidants.* 9 (2020) 637, <https://doi.org/10.3390/antiox9070637>.
- [10] Z. Khounani, H. Hosseinzadeh-Bandbafha, A.-S. Nizami, A. Sulaiman, S.A.H. Goli, E. Tavassoli-Kafrani, A. Ghaffari, M.A. Rajaeifar, K.-H. Kim, A.F. Talebi, M. Aghbashlo, M. Tabatabaei, Data on environmental analysis of natural antioxidant production from walnut husk by a solar photovoltaic-driven system as a replacement for potentially carcinogenic synthetic antioxidants, *Data Br.* 28 (2020) 335–365, <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104933>.
- [11] C. Verma, E.E. Ebenso, I. Bahadur, M.A. Quraishi, An overview on plant extracts as environmental sustainable and green corrosion inhibitors for metals and alloys in aggressive corrosive media, *J. Mol. Liq.* 266 (2018) 577–590, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.110>.
- [12] S. Marzorati, L. Verotta, S.P. Trasatti, Green corrosion inhibitors from natural sources and biomass wastes, *Molecules* 24 (2019), <https://doi.org/10.3390/molecules24010048>.
- [13] A.N. Talaat, S.S. Ebada, R.M. Labib, A. Esmat, F.S. Youssef, A.N.B. Singab, Verification of the anti-inflammatory activity of the polyphenolic-rich fraction of *Araucaria bidwillii* Hook. using phytohaemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear cells and virtual screening, *J. Ethnopharmacol.* 226 (2018) 44–47, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.026>.
- [14] V. Gautam, D. Kapoor, S. Arora, R. Bhardwaj, Characterization and antioxidant activity of oil extract of a gymnosperm - *araucaria cunninghamii* aiton ex D. don, *Res. J. Pharm. Technol.* 9 (2016) 875–879, <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2016.00166.9>.
- [15] A. Venditti, C. Frezza, F. Sciubba, S. Foddai, M. Serafini, A. Bianco, Terpenoids and more polar compounds from the male cones of *wollemia nobilis*, *Chem. Biodivers.* 14 (2017) e1600332, <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600332>.
- [16] C.H.K. Santos, M.R. Baqueta, A. Coqueiro, M.I. Dias, L. Barros, M.F. Barreiro, I.C.F.R. Ferreira, O.H. Gonçalves, E. Bona, M.V. da Silva, F.V. Leimann, Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (*araucaria angustifolia* (bertol.) Kuntze) coat, *Food Chem.* 261 (2018) 216–223, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.057>.
- [17] E. Angélica Koehnlein, A. Elise Santos Carvajal, E. Marcela Koehnlein, J.da S. Coelho-Moreira, F. Dorneles Inácio, R. Castoldi, A. Bracht, R.M. Peralta, Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds, *African, J. Food Sci.* 6 (2012) 512–518, <https://doi.org/10.5897/AJFS12.128>.
- [18] C.S. Branco, T.S. Rodrigues, Chemical constituents and biological activities of *araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze: a review, *J. Org Inorg. Chem.* 2 (2016) 1–10.
- [19] T.B.V. da Silva, T.F.M. Moreira, A. de Oliveira, A.P. Bilck, O.H. Gonçalves, I.C.F.R. Ferreira, L. Barros, M.-F. Barreiro, F. Yamashita, M.A. Shirai, F.V. Leimann, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze extract as a source of phenolic compounds in TPS/PBAT active films, *Food Funct.* 10 (2019) 7697–7706, <https://doi.org/10.1039/C9FO01315F>.
- [20] C.S. Branco, A. Duong, A.K. Machado, A. Wu, G. Scola, A.C. Andrezza, M. Salvador, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze has neuroprotective action through mitochondrial modulation in dopaminergic SH-SY5Y cells, *Mol. Biol. Rep.* 46 (2019) 6013–6025, <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05037-6>.
- [21] S. Banerjee, A. Das, P. Chakrabort, K. Suthindhir, M.A. Jayasri, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Araucaria cookii* and *Brassaia actinophylla*, *Pakistan J. Biol. Sci.* 17 (2014) 715–719, <https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.715.719>.
- [22] P.K. Patial, D.S. Cannoo, Phytochemical profile, antioxidant potential and DFT study of *Araucaria columnaris* (G. Forst.) Hook. Branch extracts, *Nat. Prod. Res.* (2019) 1–5, <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1696330>.
- [23] P. Kershaw, B. Wagstaff, The Southern Conifer Family *Araucariaceae*: History, Status, and Value for Paleoenvironmental Reconstruction, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32 (2001) 397–414, <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114059>.
- [24] R.W.J.M. van der Ham, J.W.M. Jagt, S. Renkens, J.H.A. van Konijnenburg-van Cittert, Seed-cone scales from the upper Maastrichtian document the last occurrence in Europe of the Southern Hemisphere conifer family *Araucariaceae*, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 291 (2010) 469–473, <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.03.017>.
- [25] P.A. Lamela, R.D. Pérez, C.A. Pérez, G.A. Bongiovanni, Use of synchrotron radiation X-ray fluorescence and X-ray absorption spectroscopy to investigate bioaccumulation, molecular target, and biotransformation of volcanic elements, X-Ray Spectrom. (2018), <https://doi.org/10.1002/xrs.2843>.
- [26] I.H. Escapa, S.A. Catalano, Phylogenetic analysis of *araucariaceae*: integrating molecules, morphology, and fossils, *Int. J. Plant Sci.* 174 (2013) 1153–1170, <https://doi.org/10.1086/672369>.
- [27] J. Sanguinetti, Producción de semillas de *araucaria araucana* (Molina) K. Koch durante 15 años en diferentes poblaciones del Parque Nacional Lanín (Neuquén-Argentina), *Ecol. Austral.* 24 (2014) 265–275.
- [28] C.G. y N.R. Taha Esteban, Resultados y Lecciones en Producción, técnicas de cosecha y desarrollo de productos a partir del piñón. Proyecto de Innovación en la VIII Región del Biobío y IX Región de La Araucanía. Valorización a abril de 2010., Ser. Exp. Innovación Para El Emprend. Agrar. Fund. Para La Innovación Agrar. Regist. Prop. Intelect. No 205.017. ISBN No 978-956-328-093-7. (2010). https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75594_archivo_01.pdf.
- [29] V. Sotomayor, G.A. Bongiovanni, C.S. Roldán, I. Queralt, Plant extracts as biopharmaceutical products and analysis of their activity against arsenicosis, in: M.I. Litter, H.B. Nicolli, M. Meichtry, N. Quici (Eds.), *One Century Discov. Arsenicosis Lat. Am. As 2014 - Proc. 5th Int. Congr. Arsen.* Environ. <https://doi.org/10.1201/B16767>, London, CRC Press, London, 2014: pp. 637–639.
- [30] J. Echeverri Del Sarto, M. Gallia, A. Ferrari, G. Bongiovanni, Tissue plant culture as a novel industrial strategy to produce biopharmaceuticals from endangered plants, 24th Int. Acad. Conf. Barcelona. (2016). <http://www.iies.net/proceedings/24th-international-academic-conference-barcelona/front-page>.
- [31] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70–76, <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- [32] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Sci. Technol.* 28 (1995) 25–30, [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [33] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in (1999) 152–178, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- [34] E.A. Soria, P.L. Quiroga, C. Albrecht, S.I. Ramos Elizagaray, J.J. Cantero, G.A. Bongiovanni, Development of an antioxidant phytoextract of *lantana grisebachii* with lymphoprotective activity against in vitro arsenic toxicity, *Adv. Pharmacol. Sci.* (2014), <https://doi.org/10.1155/2014/416761>.
- [35] A.E. Hagerman, L.G. Butler, Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins, *J. Agric. Food Chem.* 26 (1978) 809–812, <https://doi.org/10.1021/jf60218a027>.
- [36] A.M. Shohaie, M.B. Ali, K.W. Yu, E.J. Hahn, R. Islam, K.Y. Paek, Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor, *Process Biochem.* 41 (2006) 1179–1185, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.015>.
- [37] H. Gallardo, I. Queralt, J. Tapias, M. Guerra, M.L. Carvalho, E. Marguá, Possibilities of low-power X-ray fluorescence spectrometry methods for rapid multielemental analysis and imaging of vegetal foodstuffs, *J. Food Compos. Anal.* 50 (2016) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.04.007>.
- [38] E. Marguá, I. Queralt, M. Hidalgo, Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material, *TRAC Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 362–372, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.11.011>.
- [39] E.A. Soria, M.E. Goleniowski, J.J. Cantero, G.A. Bongiovanni, Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells, *Hum. Exp. Toxicol.* 27 (2008) 341–346, <https://doi.org/10.1177/0960327108092192>.
- [40] G. Bongiovanni, J. Cantero, A. Eynard, M. Goleniowski, Organic extracts of *Larrea divaricata* Cav. induced apoptosis on tumoral MCF7 cells with a higher cytotoxicity than nordihydroguaiaretic acid or paclitaxel, *J. Exp. Ther. Oncol.* 7 (2008) 1–7.
- [41] E.A. Soria, Modulación del efecto citotóxico del arsénico por moléculas bioactivas, (2009). <http://hdl.handle.net/11086/217>.
- [42] E.A. Soria, A.R. Eynard, G.A. Bongiovanni, Cytoprotective effects of silymarin on epithelial cells against arsenic-induced apoptosis in contrast with quercetin cytotoxicity, 87 (2010) 309–315, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.07.007>.
- [43] M.A. Mazzeo, J.A. Linares, M.M. López, R.V. Gallará, E. Bachmeier, F.M. Wietz, A.B. Finkelberg, *Acta odontologica latinoamericana* : international journal of applied and basic dental research; official journal of the Argentine Division of the International Association for Dental Research, *Acta Odontológica Latinoam.* 25 (2005) 262–268 http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-48342012000300003.
- [44] ASTM International, ASTM G31-72(2004), Standard Practice for Laboratory

- Immersion Corrosion Testing of Metals, West Conshohocken, PA. (2004). <https://doi.org/10.1520/G0031-72R04>.
- [45] A. Boujakhrouf, I. Hamdani, N. Chahboun, A. Bouyanzer, R.V. Santana, A. Zarrouk, Antioxidant activity and corrosion inhibitive behavior of *Garcinia cola* seeds on mild steel in hydrochloric medium, *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (2015) 3655–3666.
- [46] A. Brito, C. Areche, B. Sepúlveda, E. Kennelly, M. Simirgiotis, Anthocyanin Characterization, Total Phenolic Quantification and Antioxidant Features of Some Chilean Edible Berry Extracts, *Molecules* 19 (2014) 10936–10955, <https://doi.org/10.3390/molecules190810936>.
- [47] S.M. da Silva, E.A. Koehnlein, A. Bracht, R. Castoldi, G.R. de Moraes, M.L. Baesso, R.A. Peralta, C.G.M. de Souza, A.B. de Sá-Nakanishi, R.M. Peralta, Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin, *Food Res. Int.* 56 (2014) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.004>.
- [48] C. Zhao, Y. Liu, S. Lai, H. Cao, Y. Guan, W. San Cheang, B. Liu, K. Zhao, S. Miao, C. Riviere, E. Capanoglu, J. Xiao, Effects of domestic cooking process on the chemical and biological properties of dietary phytochemicals, *Trends Food Sci. Technol.* 85 (2019) 55–66, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.004>.
- [49] H.B. Rashmi, P.S. Negi, Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits, *Food Res. Int.* 136 (2020) 109298, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109298>.
- [50] B.R. Cordenunsi, E.W. De Menezes, M.I. Genovese, C. Colli, A. Gonçalves De Souza, F.M. Lajolo, Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3412–3416, <https://doi.org/10.1021/jf034814l>.
- [51] M. Souza, C. Branco, J. Sene, R. Dallagnol, F. Agostini, S. Moura, M. Salvador, Antioxidant and Antigenotoxic Activities of the Brazilian Pine *Araucaria angustifolia* (Bert.), O. Kuntze, *Antioxidants* 3 (2014) 24–37, <https://doi.org/10.3390/antiox3010024>.
- [52] J.Z. Barbosa, C.R. dos Santos Domingues, G.C. Poggere, A.C.V. Motta, A.R. dos Reis, M.F. de Moraes, S.A. Prior, Elemental composition and nutritional value of *Araucaria angustifolia* seeds from subtropical Brazil, *J. Food Sci. Technol.* 56 (2019) 1073–1077, <https://doi.org/10.1007/s13197-018-03555-y>.
- [53] S.A. Manfred Anke, Ljubomir Angelow, Ralf Müller, Recent progress in exploring the essentiality of the ultratrace element rubidium to the nutrition of animals and man, *Biomed. Res. Trace Elem.* 16 (2005) 203–207.
- [54] Nutrient Requirements of Beef Cattle, National Academies Press, Washington, D.C., 2000. <https://doi.org/10.17226/9791>.
- [55] M. Sedrez dos Reis, A. Ladio, N. Peroni, Landscapes with *Araucaria* in South America: Evidence for a cultural dimension, *Ecol. Soc.* 19 (2014), <https://doi.org/10.5751/ES-06163-190243>.
- [56] E. Bachmeier, M.A. Mazzeo, M.M. López, J.A. Linares, G. Jarchum, F.M. Wietz, A.B. Finkelberg, Mucositis and salivary antioxidants in patients undergoing bone marrow transplantation (BMT), *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 19 (2014) e444–e450, <https://doi.org/10.4317/medoral.19062>.
- [57] E. Bachmeier, M.M. López, J.A. Linares, M.N. Brunotto, M.A. Mazzeo, 5-Fluorouracil and Cyclophosphamide Modify Functional Activity in Submandibular Gland of Rats, *J. Oral Res.* 8 (2019) 363–369, <https://doi.org/10.17126/joralres.2019.056>.
- [58] M.K. Kutzung, B.L. Firestein, Altered Uric Acid Levels and Disease States, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324 (2008) 1–7, <https://doi.org/10.1124/jpet.107.129031>.
- [59] Y. Sun, J. Yolitz, T. Alberico, X. Sun, S. Zou, Lifespan extension by cranberry supplementation partially requires SOD2 and is life stage independent, *Exp. Gerontol.* 50 (2014) 57–63, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.020>.
- [60] Q.-L. Wan, X. Fu, W. Dai, J. Yang, Z. Luo, X. Meng, X. Liu, R. Zhong, H. Yang, Q. Zhou, Uric acid induces stress resistance and extends the life span through activating the stress response factor DAF-16/FOXO and SKN-1/NRF2, *Aging (Albany, NY)* 12 (2020) 2840–2856.
- [61] A.M. Al-Bekairi, S. Qureshi, M. Asgher Chaudhry, A.H. Shah, Uric acid as an inhibitor of cyclophosphamide-induced micronuclei in mice, *Mutat. Res. Lett.* 262 (1991) 115–118, [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(91\)90116-L](https://doi.org/10.1016/0165-7992(91)90116-L).
- [62] L.J. Mazzeo MA, Bachmeier E, López MM, F.I. Samar ME, Finkelberg AB, Cambios histológicos en Glándula Submandibular de ratas tratadas con ciclofosfamida y vitaminas antioxidantes. Estudio preliminar, *Rev. La Fac. Odontol. - Univ. Nac. Córdoba.* 27 (2017) 15–18. <https://doi.org/10.25014/RevFacOdont27166>.
- [63] Y.P. Asmara, T. Kurniawan, A.G.E. Sutjipto, J. Jafar, Application of Plants Extracts as Green Corrosion Inhibitors for Steel in Concrete - A review, *Indones. J. Sci. Technol.* 3 (2018) 158, <https://doi.org/10.17509/ijost.v3i2.12760>.
- [64] E. Ituen, A. Singh, L. Yuanhua, R. Li, Synthesis and evaluation of anticorrosion properties of onion mesocarp-nickel nanocomposites on X80 steel in acidic cleaning solution, *J. Mater. Res. Technol.* 9 (2020) 2832–2845, <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.01.017>.
- [65] B. Oronsky, S. Goyal, M.M. Kim, P. Cabrales, M. Lybeck, S. Caroen, N. Oronsky, E. Burbano, C. Carter, A. Oronsky, A Review of Clinical Radioprotection and Chemoprotection for Oral Mucositis, *Transl. Oncol.* 11 (2018) 771–778, <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.03.014>.

RESEARCH

Open Access



Sustainable and efficient protocols for in vitro germination and antioxidants production from seeds of the endangered species *Araucaria araucana*

María C. Gallia^{1,2*} , Julieta Echeverri Del Sarto¹ and Guillermina A. Bongiovanni^{1,3}

Abstract

Background: The Pehuén or Monkey puzzle tree (*Araucaria araucana*) is an evergreen coniferous tree, which has been historically used for social, medicinal, and nutritional purposes. We have recently showed the value of *A. araucana* seeds as a rich source of micronutrients and antioxidants. This endemic species present in a reduced area in Argentina and Chile is endangered because of the low germination rate and the overexploitation of its edible seeds. Thus, the massive extraction of its seeds is ecologically non-viable resulting in limited availability of its active metabolites. However, biotechnological approaches are attractive strategies of production of valuable metabolites and healthy specimens of endangered plants. The aim of this work was to develop a protocol for in vitro production of antioxidants derived from *A. araucana* seeds and to obtain healthy plants by optimized seed germination.

Results: Calli of Pehuén seeds were induced in Murashige and Skoog medium with different combinations of auxins and cytokinins, in light and dark conditions. Callus from embryonic axes developed in medium with 1 mg/l α -naphthaleneacetic acid and 1.5 mg/l 6-benzylaminopurine in light conditions had efficient biomass production, antioxidant activity, high phenolic, and flavonoid content and no cytotoxicity on mammalian cells. Additionally, 100 % germination was obtained in vitro and healthy plants were acclimatized to non-sterile conditions.

Conclusion: In conclusion, in vitro culture of *A. araucana* could provide new and sustainable options for production of its valuable metabolites with possible therapeutic and nutritional uses. Also, optimized plant germination and acclimatization of endangered species can contribute to the preservation of pristine environments.

Keywords: Plant cell culture, Biotechnology, Conservation, Antioxidants, Medicinal plants

Background

A large number of published studies have confirmed that increases of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) can bind DNA, lipids, and proteins to attain stability, thereby turning a physiological condition into a pathological state. Thus, reactive oxidizers cause oxidative stress and are associated

to development of several diseases in humans, including type 2 diabetes, arthritis, cancer, infertility, ischemia, neurodegeneration, and liver diseases, among others [1, 2]. In this context, experimental and epidemiological data have shown that a diet rich in antioxidants can reduce the risk of the diseases by reducing oxidant-mediated cellular injury and improving human health [1, 2]. The consumption of natural or synthetic antioxidants can mitigate oxidative damage to cells by inhibiting the propagation of oxidative chain reactions [3, 4]. However, synthetic antioxidants have been reported to have negative effects on consumer health, so research on antioxidants from

*Correspondence: celeste.gallia@probien.gob.ar

² School of Medicine, National University of Comahue, Luis Toschi Avenue and Arrayanes street, Cipolletti, Río Negro, Argentina
Full list of author information is available at the end of the article

natural resources has now gained considerable attention, mainly plant derived bioactive compounds, such as polyphenols, carotenoids, and vitamins. Polyphenols are synthesized by plants as secondary metabolites and have been extensively studied for their capacity to improve human health. Historically, the beneficial effects of polyphenols have been attributed primarily to their antioxidant capacity and their ability to modulate cellular antioxidant defense mechanisms by inducing the synthesis of detoxification enzymes. Thus, plant extracts with high level of polyphenols can be incorporated in functional foods or as food supplements designed to benefit human health [5, 6].

It is now known that functional foods play an important role in the modern food industry. They represent a promising innovation as they add natural antioxidants to prevent the rancidity caused by oxidation of unsaturated fats, to conserve the nutritive value of food, to improve shelf-life stability of meat products, and to prevent oxidation processes and chronic diseases related to oxidative stress in human [6, 7]. However, the plant species can be driven to extinction due to commercial overexploitation. This overexploitation is accentuated by the climatic change combined with increasing anthropogenic pressures (urbanization sprawl, waste dumping in natural areas, etc.). In this context, the search for efficient methods to produce polyphenols and for sustainable strategies of multiplication of vulnerable plant species is indispensable. Biotechnological production of specialized metabolites in plant cell cultures provides obvious advantages: biomass production is generally quicker than for the whole plant, plant media composition and plant growth conditions can be easily controlled, over-collection of endangered species is avoided, and can be performed in any place. Indeed, in the last decades, huge efforts have been made to develop plant biofactories at an industrial level for the production of bioactive compounds by cultures of undifferentiated cells [8–10]. Furthermore, biotechnological production based on plant cell and organ cultures help not only for the commercial production of several bioactive compounds but also contribute significantly to conservation of medicinal and aromatic plant species, including the anticancer drug paclitaxel (Taxol[®]; obtained from *Taxus brevifolia*, *T. baccata* and other *Taxus* spp.) (<https://phytonbiotech.com/>) [11].

Among the various medicinal plant species, *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch (Spanish name “Pehuén”, English name “Monkey Puzzle”; family Araucariaceae) has gained considerable relevance in the recent past. This evergreen coniferous tree is endemic of Argentina and Chile and holds strong cultural and spiritual significance for the people who have coexisted with it, historically using it with social, medicinal, and nutritional

purposes [12]. Nowadays, humans intensively use *A. araucana* seeds (piñones) because of their nutritional composition and culinary applications in a wide range of regional foods, which are greatly appreciated by tourists. It is estimated that approximately 90 kg/ha and 273 kg/ha of piñones are harvested annually in Argentina and Chile, respectively [13]. However, plants need from 25 to 30 years for optimal development and sexual maturity, although in xeric environment as Argentinian Patagonia sexual differentiation would occur at 75–100 years of age [14]. Piñones are eaten raw, boiled, and toasted and contain antioxidants, polyphenols, flavonoids, and oligoelements like P, K, Mn, Fe, Cu, and Zn [15]. In view of this and many other reasons, *A. araucana* populations have suffered unsustainable exploitation and significant reduction in their distribution area. Pehuén populations continue to be threatened by logging, fires, and extensive livestock use [16, 17]. Additionally, the limited regeneration of Pehuén trees (principally asexual by sprouting from roots) and its low passive dispersion and minor regeneration from seeds produce slow recovery of their populations facing an extremely high risk of extinction in the wild [14, 16]. Furthermore, government programs for conservation purposes that have attempted to obtain seedlings in greenhouses and to improve the dispersal of piñones and the establishment of plantlets in the forest have not yielded efficient results (personal communication). As a consequence of all this, Pehuén is listed as “endangered” species on the Red Data List of the International Union for Conservation of Nature in the category B2ab (ii,iii,v) [16]; it is considered of high conservation value, and it is protected on both sides of the Andes Mountains.

In view of the above reasons and to take advantage of beneficial properties of *A. araucana*, and at the same time promoting conservation of this endangered species, it is important to develop efficient protocols for its multiplication and sustainable methods for obtaining its bioactive metabolites. In this regard, biotechnological tools provide complementary options for production of metabolites from piñones and use of cellular and/or tissue culture techniques for faster multiplication and obtaining highly valued products, such as antioxidants and other bioactive metabolites. In addition, quality plants regenerated in vitro and subsequently acclimated could be used in different forest restoration programs. These biotechnological techniques ensure continuous production of biomass, regardless of seasonal and geographical conditions, without a negative impact on biodiversity [8–10].

In preliminary studies, we noticed the possibility of producing antioxidants from callus of piñones as a sustainable source of its antioxidants [18]. The present work analyses the optimum combination of auxins and

cytokinins to obtain high antioxidant content from *A. araucana* seed callus, as an eco-friendly approach to use this valuable resource. Furthermore, the seed germination protocol was optimized to obtain healthy plants of this endangered species.

Methods

Chemical reagents

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), antibiotics, reagents, and standards were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Saint Louis, MO, USA (Argentina office). Solvents HPLC grade were from Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA. Fetal bovine serum was purchased from Natocor, Córdoba, Argentina. MilliQ water was used in all experiments. Sterile 0.22- μ m PES filters were from GVS Filter Technology, Bologna, Italy. Auxins, cytokinins, Agar, D-Sucrose, and Murashige & Skoog Basal Medium with Vitamins & MES were from PhytoTechnology Laboratories L.L.C, Lenexa, KS, USA. Gibberellic acid GIBERELINA GA₃ KA[®] was from S. ANDO Y CÍA SA Buenos Aires, Argentina.

Vegetable material

Pehuén seeds were harvested from 10 adult trees randomly chosen (mean height 25–35 m and mean DBH 1.0–1.5 m) located in Pehuén forest, near Villa Pehuénia in Neuquén province, Argentina (38° 50' 02.3" S 71° 12' 24.1" W), in April 2017 and 2018. Full and plump piñones were transported to the laboratory. Selected seeds (mean seed length 4–5 cm, mean seed width 1.5–2.0 cm, and mean seed weight 2.3–2.7 g, as shown in Fig. 1A) were kept in plastic bags and stored in a refrigerator at 6°C, to maintain homogeneous temperature and moisture. In preliminaries experiments [18], callus formation capacity of piñones was tested at different times post-harvesting. Accordingly, all experiments were performed with seeds up to 12 weeks after collection.

In vitro methodology: callus induction

Seeds were cultured in two forms: slices containing both endosperm and embryo tissues, and entire embryos only. Previously, piñón coat had been removed and both materials (naked seeds and embryos) were separated and disinfected to introduce them in vitro. The sterilization process consisted in submerging the naked seeds or embryos for 2 min in a 70% ethanol solution and then in commercial sodium hypochlorite solution (1.5% active chlorine) for 15 min. Intermediate and final washings were performed with sterile distilled water. Naked seeds were sliced in 5 pieces of 2 mm thickness while embryos were cultured complete.

Callus cultures were established in 60 mm Petri dishes with Murashige and Skoog (MS) medium [19] supplemented with 30 g/l sucrose and 8 g/l agarose, adjusting pH to 5.6 ± 0.2 . The medium was fortified with different combinations of auxins and cytokinins in order to select the best conditions for callus growth and antioxidant production. Murashige and Skoog medium with various combinations and concentrations of dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or α -naphthaleneacetic acid (NAA) used alone or combined with 6-benzylaminopurine (BAP) and gibberellic acid GA₃ in light (L) and dark conditions (D) was tested. Cultures were kept in a growth chamber at 23°C under a 16/8 h light/dark photoperiod (white, blue, and red LED lights in a proportion 1:1:2) or in darkness in order to produce callus, which were subcultured every 4 weeks. Each Petri dish contained 3–5 embryos or slides and each treatment was replicated five times. The percentage of callus formation at 70 d in each treatment was calculated using the following formula: % callus formation = number of explants with callus/total number of explants cultured*100.

Sample preparation

Freeze-dried calli were milled into a fine powder and 1 g of each dried sample were extracted in 12 ml ultrapure water and then kept in the dark for 12 h at 20°C. In general, dry weight was 7 to 8 times less than fresh weight and no significant differences between treatments were observed. The extracts were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and supernatants were filtered through a 10- μ m pore nylon filter and stored at -20°C until analysis. For comparative purposes, freeze-dried embryo extracts were also obtained.

Selection of optimum culture conditions

In order to select optimum culture conditions, the following parameters were determined: percentage of callus formation, biomass production, antioxidant power analyzed by FRAP and DPPH assays, total phenolic, and flavonoid contents. Calli obtained under culture conditions resulting in a major percentage of callus formation and biomass production were used to evaluate antioxidant power, phenol, and flavonoid content. For comparative purposes, embryo extracts were also analyzed.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

Benzie and Strain [20] protocol with minor modifications was employed to study FRAP activity of callus and embryo extracts. An extract aliquot of 50 μ l was added to 950 μ l of FRAP reagent. FRAP reagent was prepared by mixing 2.5 ml of 10 mM TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine) solution in 40 mM hydrochloric acid with 2.5 ml of 20 mM FeCl₃·6H₂O and 25 ml of 300 mM sodium acetate

buffer pH3.6. The reaction mixture was incubated at 37°C in the dark for 7 min. After that, the absorbance was measured at 595 nm in a T60UV-Visible Spectrophotometer (PG Instruments Limited), and the results were expressed as ascorbic acid equivalents per milligram of callus and embryo ($\mu\text{g AAE}/\text{mg DW}$).

Free radical scavenging capacity (DPPH assay)

Free radical scavenging ability of the extracts was tested by DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical scavenging assay, based on method as described by Krishnan et al. [21], with some modifications. DPPH radical (0.8 mM) solution in 95% ethanol was prepared. DPPH assay was performed to the best callus induction condition extract. For comparative purposes, embryo extract and ascorbic acid 0.1 mg/ml were also analyzed. An aliquot of 50 μl was mixed with 125 μl of 96% ethanol solution and 625 μl of 1:1 distilled water and ethanol solution. The mix was shaken vigorously and the absorbance was recorded against a blank of ethanol without DPPH.

Kinetics of reactions was monitored at 515 nm on spectrophotometer until no further decrease in absorbance was observed. The percentage of inhibition of DPPH was calculated according to the expression: $DP = [(A_0 - A_t)/A_0] * 100$ where A_0 is the initial absorbance of DPPH (0% inhibition), and A_t the time “t” absorbance after extract mixture has been produced. This time (60 s) was chosen within the interval in which all extracts decay between 35 and 85%.

Determination of total phenolic content

Total phenolic contents (TPC) of piñón callus and embryo extracts were measured by the Folin–Ciocalteu method according to Soria et al. [22]. Briefly, 50 μl of extract was mixed with 625 μl sodium carbonate (20%, w/v), 200 μl ultrapure water, and 125 μl Folin–Ciocalteu reagent (1 N). After 30 min in the dark, the absorbance was measured at 760 nm in a spectrophotometer. TPC was expressed as μg of gallic acid equivalents per milligrams of dry weight ($\mu\text{g GAE}/\text{mg DW}$).

Determination of total flavonoids

Total flavonoid contents (TFC) of piñón callus and embryo extracts were determined by the aluminum chloride colorimetric method according to Soria et al. [22]. The extracts (50 μl) were mixed with a solution containing 30 μl of 10% sodium nitrite, 60 μl of 20% aluminum chloride hexahydrate, 200 μl of 1 N NaOH, and 660 μl of water. The absorbance of each sample was recorded at 510 nm on spectrophotometer and compared with those obtained from a standard curve made from quercetin.

TFC was expressed as quercetin equivalents per milligram of dry weight ($\mu\text{g QE}/\text{mg DW}$).

Analysis of biological interaction of extracts: early effects on cell viability

Cell culture

African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) kidney cells (VERO cell line ATCC n° CCL-81) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) completed with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin-G, and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin sulfate, incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere [15].

Cellular viability

VERO cells were seeded onto 96-well tissue culture test plates at 6000 cells per well. After 24 h post-seeding, the medium was replaced with a fresh one containing callus extract (from the optimum medium chosen) at final concentration of 50, 100, 150, 200, or 400 $\mu\text{g DW}/\text{ml}$ of medium or with fresh medium only (control). Viable cells were stained with 0.5% crystal violet in 50% methanol in water solution, for 15 min. After being washed with 50% methanol three times, the stained cells were solubilized with a solution containing 0.1 M sodium citrate, pH5.4, and 20% methanol. The absorbance of each well was read at 630 nm with a Rayto RT-2100C microElisa reader (Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd. China). The viability percentage was defined as the relative absorbance of treated versus untreated control cells (100%), and represents the mean \pm SD of two independent experiments.

In vitro germination and plantlets acclimatization

Germination

In order to evaluate germination, two types of piñones were used: piñones with whole coat and peeled piñones. After washing them, they were left to soak 12 h in water. Then, disinfection was performed with 70% (v/v) ethanol for 2 min, followed by 1.5% (w/v) sodium hypochlorite for 15 min and washed three times with sterile distilled water. Seeds were incubated in agarized (0.8% w/v) MS medium with 3% (w/v) sucrose, at pH5.6. Cultures were maintained at $23 \pm 2^\circ\text{C}$, under 16/8 h light/dark photoperiod using LED lights (white, blue and red in a proportion 1:1:2). The experiment was carried out with fifteen randomly selected seeds per treatment and was repeated five times.

Acclimatization

Plantlets (2 month-old) were carefully removed from the glass culture vessels; roots were washed with sterile water to remove medium and then transferred into sterile pots filled with sterilized soil and sand (2:1 v/v). Soil from Pehuén forest, previously collected in Villa Pehuena ($38^\circ 51'40.140'' \text{S}$ $71^\circ 3' 51.264'' \text{W}$) was used. Plantlets were acclimated for 7

weeks under culture room conditions. In the first 2 weeks, each pot was covered with a polyethylene bag, which was perforated in the third week to allow air exchange. Plantlets were grown for 1 week with the polyethylene bag perforated. Then, polyethylene bags were removed and plantlets were watered every 2 days for 2 weeks with distilled water and with tap water for the next 2 weeks. Later, plants were moved to a greenhouse in 16-cm-wide polypropylene pots filled with soil from Pehuén forest. Thirty days after transplanting the plantlets to the greenhouse, the percentage of seedling survival was evaluated.

Statistical analysis

All experiments were conducted at least two times. For statistical analysis, all assays were performed in triplicate, and quantitative data were expressed as mean of two experiments \pm standard deviation. Data were analyzed with InfoStat version 2020. Student's *t* tests were carried out to determinate differences between treatments, where *P* value < 0.05 was considered statistically different.

Results

Selection of optimum culture conditions

In vitro callus induction from piñón

For piñón callus induction, different combinations of the auxins NAA and 2,4-D with BAP and GA₃ were tested.

Callus cultures from piñones developed after 10–14 days, only in the embryonic axis, not in cotyledons or endosperm. Figure 1B (up) shows that the slide containing embryonic axes (a) developed callus in this tissue, contrary to what happened with those slides containing parts of cotyledons and endosperm (b and c). This observation can be clearly seen also in Fig. 1B (down), when isolated embryos were cultured. Then, embryos were used to callus induction. The results showed callus formation when the auxin NAA was used under light or dark conditions while there was low or null callus formation using 2,4-D (Table 1). The best conditions of piñón callus induction was in MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 1.5 mg/l BAP, grown in light conditions with 57.1% of callus formation (Table 1, treatment 7). A decreased biomass production was detected when GA₃ was added to the best induction condition. Calli developed in 2 mg/l 2,4-D and 1 mg/l BAP, and 1 mg/l NAA and 2 mg/l BAP in light conditions (Table 1, treatment 6 and 9, respectively) showed low percentage of formation and weight (12.6 and 3.5 mg per callus, respectively), so they were not taken into account for the next measurements.

In vitro production of antioxidants

In this work, we analyzed antioxidant activity of piñón callus extracts by FRAP assays. Additionally, DPPH

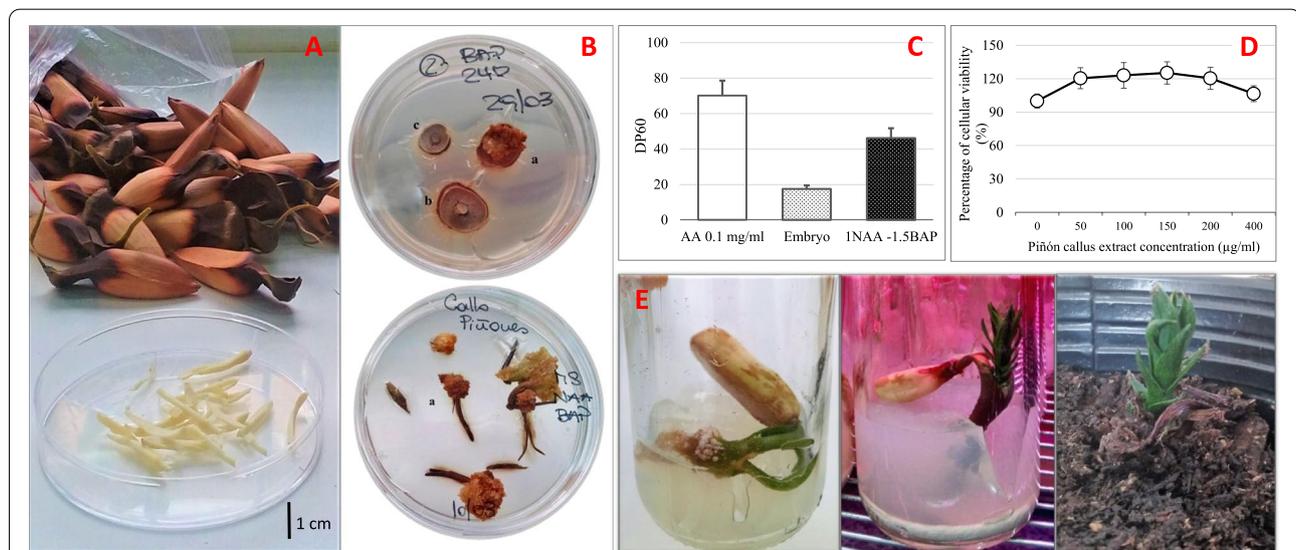


Fig. 1 **A** Healthy piñones collected from adults trees located near Villa Pehuénia (Neuquén Province, Argentina) and entire embryos separated used for *in vitro* culture. **B** Callus formation in piñón slides (up) and isolated embryos (down); where **a** are callus grown in embryonic axis, **b** and **c** are slides of cotyledons and endosperm with no callus formation. Photos correspond to callus 45 days old in 60 mm Petri dishes. **C** Antioxidant capacity of ascorbic acid solution, embryo, and callus obtained in MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 1.5 mg/l BAP, in light conditions. Results obtained by DPPH assay are expressed as percentage inhibition of DPPH radical at 60 s (DP₆₀). Different letters indicate statistically significant differences. **D** Effect of different concentrations of callus extract (grown in MS medium with 1.5 mg/l BAP and 1 mg/l NAA in light conditions) on VERO cells viability. Values are expressed as % with respect to control cells (100%). **E** Representative photos of stages of *in vitro* germination (left), establishment (middle) and acclimatization (right) of *A. araucana* seedlings

Table 1 Effect of different combinations and concentrations of growth regulators in light (L) and dark (D) conditions on callus formation from piñón embryo

Treatment	2,4-D mg/l	NAA mg/l	BAP mg/l	GA ₃ mg/l	% callus	DW ^a (mg)	FRAP µg AAE/mg DW	TPC µg GAE/mg DW	TFC µg QE/mg DW	FRAP 100 [§] µg AAE	TPC 100 [§] µg GAE	TFC 100 [§] µg QE
Light												
1	1	0	0	0	ND							
2	2	0	0	0	ND							
3	0	0	1	0	ND							
4	0	1	1	0	ND							
5	1	0	1	0	ND							
6	2	0	1	0	6	12.60 ^b						
7	0	1	1.5	0	57	40.60	10.50*	9.67*	12.00*	20828.63*	19175.57*	23804.15*
8	0	1	1.5	0.5	44	19.60	10.17*	9.33*	12.17*	7515.50*	6899.48	8993.96*
9	0	1	2	0	15	3.50 ^b						
10	0	2	2	0	ND							
11	1	0	2	0	ND							
12	2	0	2	0	ND							
Dark												
13	1	0	0	0	ND							
14	2	0	0	0	ND							
15	0	0	1	0	33	19.90	9.50*	6.50*	6.50*	5078.90*	3475.04*	3475.04*
16	0	1	1	0	ND							
17	1	0	1	0	ND							
18	2	0	1	0	ND							
19	0	1	1.5	0	38	14.70	8.50*	9.00*	23.17*	4069.96*	4309.37	11092.64*
20	0	1	1.5	0.5	33	6.02	3.33 ± 1.34	5.83*	15.50	567.62*	993.34*	2639.45*
21	0	1	2	0	25	35.70	5.50*	14.33*	8.50*	4207.67*	10965.44*	6502.76*
22	0	2	2	0	ND							
23	1	0	2	0	ND							
24	2	0	2	0	ND							
None	Embryo					54	1.8 ± 0.2	0.98 ± 0.27	16.07 ± 1.03	9720	5292	86778

Values represent the mean of three independent experiment performed in duplicate ± SD. a: mean dry weight of each embryo or callus. b: not analyzed samples since low callus induction. *Significant differences P ≤ 0.05. For a better visualization of the results, the SDs were not included for all the values in the table. However, all SDs were less than 15%, except for FRAP of treatment 20. Bold values: increased efficiency with respect to embryo. §: calculated value to 100 embryos

assay was performed to the best callus induction condition (Table 1, treatment 7). The results showed that callus developed in both light and dark conditions had higher antioxidant capacity compared to embryo, except those obtained in MS medium supplemented with 1 mg/l NAA, 1.5 mg/l BAP, and 0.5 mg/l GA₃, in dark conditions (Table 1, treatment 20). Callus obtained in MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 1.5 mg/l BAP in light conditions had 10.5 µg AAE/mg DW and 43% of inhibition of radical DPPH (DP₆₀ in Fig. 1C), while embryo had significantly lower antioxidant power (1.2 µg AAE/mg DW and 17 % inhibition of radical DPPH (Fig. 1C).

Determination of total phenolic and flavonoid contents

It has been suggested that in optimization of metabolite production, the first stage consists in choosing the appropriate culture conditions to obtain higher percentage of induction and maintenance [23]. For this reason, embryos under treatments that induced major callus formation were selected to continue the studies and compare antioxidant activity.

The callus extracts that were selected (treatment 6 and 9 were discarded) had significantly more TPC than embryo extracts, between 5 and 14 times. Extracts of piñón embryo had 0.98 µg GAE/mg DW while callus under the best induction condition had 9.67 µg GAE/mg DW.

Under our cell culture conditions, callus grown in similar medium had lower TPC in the dark than those grown in light conditions. On the other hand, piñón callus grown in dark conditions had significantly higher TFC than those obtained in light. In this regard, when TFC of callus is compared with that of the whole embryo, only treatment 19 showed significantly higher values (23.17 vs. 16.07 µg QE/mg DW, Table 1). Additionally, the antioxidant efficiency was determined by comparing antioxidant production of 100 embryos with antioxidant production of calli from 100 embryos. So, only treatment 7 (1 mg/l NAA and 1.5 mg/l BAP, in light conditions) was highly efficient.

Biological test for callus extracts

Early effects on VERO cells viability were evaluated in order to discard toxic effects. It was found that extract from callus grown in the optimum medium chosen (MS medium with 1 mg/l NAA and 1.5 mg/l BAP in light conditions) did not decrease cellular viability at any of the concentrations used after 2 hours of incubation (Fig. 1D). As a result, in vitro culture of piñón embryo cells in these conditions would not add any toxic substance that could decrease VERO cells viability.

In vitro germination and acclimatization

In this work, piñón germination was improved with a previous imbibition treatment, by pulling off the piñón coat and with incubation at 23 °C. Thus, a 100% in vitro germination was achieved at 6 d and healthy plants were obtained (Fig. 1E). Piñón scarification allowed water to enter and it unchained metabolic and physiological mechanism of germination. Accordingly, piñón-soaking pretreatment combined with efficient and maintained disinfection could be the main factor to obtain 100% of germination because imbibition triggers metabolic and physiological mechanisms of germination.

Plantlets removed from the culture medium and washed with sterile water were well acclimated to new substrate. Furthermore, all the plantlets acclimatized in the greenhouse in non-sterile conditions with soil collected from Pehuén forest showed development of new leaves after 2 weeks (Fig. 1E).

Discussion

A. araucana is an evergreen coniferous tree, which has been historically used for social, medicinal and nutritional purposes [12]. It is an endemic species of high conservation value, present within a reduced area in Argentina and Chile and protected by both countries. Nowadays, the intensive use of its seeds due its nutritional composition, the reduction of its distribution area for agricultural and forestry use, and the limited regeneration from seeds produce slow recovery of their populations facing an extremely high risk of extinction in the wild [14, 16]. Thus, germination and production of its valuable metabolites through in vitro culture are recognized as possible alternatives for the multiplication, conservation, and utilization of endangered species [9, 24, 25].

To obtain secondary metabolites, we developed non-embryogenic calli with homogenous and dedifferentiated cells, according to Cardemil and Jordan [26], who observed that only embryonic cells of *A. araucana* had the capacity to form callus and to induce callus in the megagametophyte.

In this regard, it is well known that plant hormones can act as elicitors through interaction with specific target tissues, inducing genetic and physiological responses in plants. In particular, auxins and cytokinins signaling pathways have been related to promotion of callus induction [9]. This study revealed that the MS medium enriched with 1 mg/l NAA and 1.5 mg/l BAP was observed to be optimal for the induction and growth of callus, in light conditions. Compared to the antioxidant activity found in the embryo, this biomass produced 2.14 times higher antioxidant activity than one embryo. This result suggests that the biomass of piñones produced

in vitro would be an interesting nutraceutical candidate for human consumption. Additionally, our previous results [15] showed that pulp (edible part composed by embryo and endosperm; mean weight 1.8 g per piñón) of one piñón contains 1.55 mg AAE, while 0.208 mg AAE can be provided from callus of one embryo. However, 540 days (18 months) are necessary to obtain one matured seed, while in vitro production is continuous (24/7). Therefore, although plant in vitro (tissue culture) techniques are time-consuming because several parameters have to be tested to obtain an optimum system for metabolite production, the overall production time was significantly shorter than the growth cycle of a whole plant. Certainly, plant cell cultures have been described to be more efficient in antioxidants extraction than plant collection from nature, so they represent alternative sources for the easy and scalable production of secondary metabolites [10, 27]. In that way, this in vitro method, independent of climatic and geographical conditions, could provide continuous, sustainable, and viable production of natural antioxidants derived from *A. araucana*. Furthermore, in vitro plant cultures offer the possibility to increase the synthesis of selected secondary metabolites by using elicitors, by manipulation of metabolic pathways and metabolic engineering, as well as by biotransformation. In addition, production can be scaled up in bioreactors [10, 27]. As it occurs in several vegetable foods, polyphenol content is highly related to antioxidant activity, and it is well known that light is a physical factor, which stimulates the secondary metabolites biosynthesis, including phenolic compounds, in vivo and in vitro conditions. Additionally, phenolic content and antioxidant activity in cell cultures varies largely, depending upon light wavelength, plant species, and culture type [28, 29]. Our results suggest that polyphenol content increased during in vitro culture conditions, mainly under light conditions. An increase in the production of polyphenols was also described in callus obtained from seeds of other species [30]. These results can be explained by the occurrence of more phenolic content in the embryonic axes (from which we obtained piñón callus) than in cotyledons, as it occurs in several seeds [31, 32]. Indeed, the presence of polyphenols in embryonic axes has been closely related to seed viability because of their role in scavenging ROS and preventing aging processes [33]. Contrarily, flavonoid content of callus was lower or similar (mainly in dark conditions) when compared with that of the whole embryo. Therefore, results suggest that the greater antioxidant power of callus compared to that of embryos may be related to a higher synthesis of non-flavonoids polyphenolic compounds under in vitro conditions, mainly in light. Thus, the combination of 1 mg/l auxin NAA and 1.5 mg/l

cytokinin BAP promoted the initiation and maintenance of in vitro culture of piñón embryo cells and stimulated biosynthetic pathways for the production of high-value metabolites for nutrition and health. Thus, this biotechnological method, based on in vitro culture, is currently being applied at the industrial level for the production of several phytochemicals with similar or superior yields to those of plants crops. Furthermore, plant cell culture is the only economically viable way of producing some high-value metabolites from endangered plants. Some examples include arbutin, berberine, and shikonin manufactured by Mitsui Chemicals, Inc., ginseng by Nitto Denko Corporation, and paclitaxel by Phyton Biotech Inc. [11].

Considering the nutraceutical potential of piñón callus, cytotoxicity of the extract was determined. As expected, no early cytotoxic effects were found in VERO cells exposed to piñón callus extract, such as it was reported by Gallia et al. [15] with piñón embryo, endosperm, and coat. This results agree with the historical medicinal and nutritional uses of these seeds by regional communities [12] and other research about cytoprotective effects of phenolic extracts of species of the genus *Araucaria* [34, 35].

Indeed, socio-cultural factors (ancient and actual) have also contributed, together with environmental factors, both to the preservation of these living fossils and to their current state of degradation and fragmentation. Sexual reproduction of *A. araucana* occurs mainly in areas with better state of conservation, as observed in protected areas such as the Lanin National Park (<https://www.argentina.gob.ar/parquesnacionales/lanin>). In contrast, in those populations that inhabit areas with disturbances, such as livestock and human pressures, asexual reproduction by root suckering predominates [35]. This behavior could decrease genetic variability, distribution area, and adaptability to new environmental conditions. Some authors have suggested that modern technologies like in vitro production of planting material and secondary metabolites could be used for faster multiplication and large scale production [24, 25]. Therefore, various approaches can be taken to protect *A. araucana* through in vitro culture. For example, the planting material could be used for reforestation of areas that have been exploited for agricultural-livestock use in which the density of trees has decreased. This idea is in keeping with the fact that following seed germination and raising nursery, transplantation of such seedlings within and outside the forest range carried out by local communities has been one of the reasons of community involvement in conservation of the target species [12]. Furthermore, native plantations for economic purposes in nearby areas could mitigate the effect of habitat loss

and fragmentation. This will ensure conservation of other native species and at the same time allow sustainable harvesting of the relevant species, as has been demonstrated in *A. angustifolia* plantations [36].

In *A. araucana* seeds, the embryo keeps its metabolic activity throughout ontogeny and if the environmental conditions are optimum, they could germinate rapidly after dispersion event [14]. However, piñones are recalcitrant seeds and have an impermeable seminal tegument that prevents water entering, and it generates mechanic resistance to embryo growth, so the germination event has some limitations. In this study, after 6 days, 100% in vitro germination was achieved with a previous imbibition treatment, scarification, and incubation at 23 °C. In natural conditions, scarification could be caused by the knock of piñones onto the rocky soil, the grazing by animals, fungi and bacteria, or water and snow dispersion [14, 26], and germination could occur during the wet season. A previous study has reported that imbibition treatment effectively enhance germination rate and percentage in seeds of *A. araucana* [14]. However, in that study, the germination percentage did not exceed 50% germination (just obtained after 15 days) because no sterile culture conditions were used and seeds quickly rotted. Our results show that the in vitro germination protocol developed in this study, despite being more expensive and less simple, is efficient. Furthermore, such in vitro germinated plants could be further used for micropropagation and/or directly planted into its natural habitat; such strategies have been successfully reported for numerous endangered species with medicinal use [25, 37, 38].

Conclusions

The present research provides a conservationist protocol for use and multiplication of endangered species *Araucaria araucana*. Secondary metabolites of great interest for health and vigorous plants can be obtained preserving this species and its environment. Callus developed in the embryonic axes of piñón produced high values of antioxidant activity, phenolic and flavonoid content, with non-toxic effect in mammalian cells. This work is the first step towards obtaining valuable secondary metabolites from *A. araucana*, with possible therapeutic and nutritional uses following a sustainable, efficient, and reliable procedure. In addition, in vitro germination of piñones is considered a promising strategy for the regeneration of the species.

Abbreviations

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; BAP: 6-Benzylaminopurine; NAA: Naphthalene acetic acid; 2,4-D: Dichlorophenoxyacetic acid; GA₃: Gibberellic acid; GAE: Gallic acid equivalents; AAE: Ascorbic acid equivalents; QE:

Quercetin equivalents; DW: Dry weight; TPC: Total phenolic content; TFC: Total flavonoid content.

Acknowledgments

The authors are thankful to the FONCyT, National University of Comahue, and National Ministry of Education of Argentina for the financial assistance. The authors also thank Ms. Luciana Di Pascuale from MED Mundis Medical English (Argentina) for manuscript proofreading.

Permissions

We had the municipal and provincial authorizations to collect Pehuén seeds (VT12-UNCOMA4094).

Authors' contributions

MCG: investigation, data curation, writing—review and editing, visualization. JEDS: investigation, methodology. GAB: science director, supervision, review and editing. All authors have read and approved the manuscript.

Funding

This work was financially supported by FONCyT (PICT 0458 2014–2018), CONICET (PIP 0239 2016–2020, PUE 0067 2017–2021), National University of Comahue (PIN 04N037 2020–2022), and National Ministry of Education (VT12 UNCOMA 4094 2016–2017), Argentina.

Availability of data and materials

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Institute of Research and Development in Process Engineering, Biotechnology and Alternative Energies (PROBIEN, CONICET-UNCo), Buenos Aires 1400, CP 8300 Neuquén, Neuquén Capital, Argentina. ²School of Medicine, National University of Comahue, Luis Toschi Avenue and Arrayanes street, Cipolletti, Río Negro, Argentina. ³School of Agricultural Sciences, National University of Comahue, Route 151 km 12.5, Cinco Saltos, Río Negro, Argentina.

Received: 19 April 2021 Accepted: 26 November 2021

Published online: 09 December 2021

References

- Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H (2020) Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* 152:116–141. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>
- Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI (2021) Oxidative stress mitigation by antioxidants - an overview on their chemistry and influences on health status. *Eur J Med Chem* 209:112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>
- Soria EA, Bongiovanni GA, Díaz Luján C, Eynard AR (2015) Effect of arsenite on nitrosative stress in human breast cancer cells and its modulation by flavonoids. *Nutr Cancer* 67:659–663. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1019637>
- Warraich UEA, Hussain F, Kayani HUR (2020) Aging - oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon* 6:e04107. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04107>
- Habtemariam S (2019) Modulation of reactive oxygen species in health and disease. *Antioxidants* 8:10–13. <https://doi.org/10.3390/antiox8110513>

6. de Araújo FF, de Paulo FD, Neri-Numa IA, Pastore GM (2021) Polyphenols and their applications: an approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chem* 338:127535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>
7. Boo YC (2020) Emerging strategies to protect the skin from ultraviolet rays using plant-derived materials. *Antioxidants* 9:1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox9070637>
8. Giri CC, Zaheer M (2016) Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 126. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0985-6>
9. Chandran H, Meena M, Barupal T, Sharma K (2020) Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol Rep* 26:e00450. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>
10. Rawat V, Ghildiyal A, Singh L, Jugran AK, Bhatt ID, Nandi SK, Pande V (2020) Methyl jasmonate induced polyphenols and antioxidant production in callus suspension culture of *Nardostachys jatamansi*. *Plant Biosyst* 154:851–859. <https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1701124>
11. Hidalgo D, Sanchez R, Lalaleo L, Bonfill M, Corchete P, Palazon J (2018) Biotechnological production of pharmaceuticals and biopharmaceuticals in plant cell and organ cultures. *Curr Med Chem* 25:3577–3596. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180309124317>
12. dos Reis MS, Ladio A, Peroni N (2014) Landscapes with *Araucaria* in South America: evidence for a cultural dimension. *Ecol Soc* 19:43. <https://doi.org/10.5751/ES-06163-190243>
13. Sanguinetti J (2014) Producción de semillas de *araucaria araucana* (Molina) K. Koch durante 15 años en diferentes poblaciones del Parque Nacional Lanín (Neuquén-Argentina). *Ecol Austral* 24:265–275. <https://doi.org/10.25260/ea.15.24.3.0.3>
14. Duplancic MA, Carretero EM, Cavagnaro B, Moratta MH, Romero ALN (2015) Factores que inciden en la germinación de *Araucaria araucana* (Araucariaceae) del bosque xérico. *Rev La Fac Ciencias Agrar* 47:71–82
15. Gallia MC, Bachmeier E, Ferrari A, Queralt I, Mazzeo MA, Bongiovanni GA (2020) Pehuén (*Araucaria araucana*) seed residues are a valuable source of natural antioxidants with nutraceutical, chemoprotective and metal corrosion-inhibiting properties. *Bioorg Chem* 104:104175. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104175>
16. Premoli A, Quiroga P, Gardner M (2013) *Araucaria araucana*: Monkey Puzzle Tree. 8235:1–2. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T3135.5A2805113.en>
17. González ME, Lara A (2015) Large fires in the Andean *Araucaria* forests: when a natural ecological process becomes a threat. *Oryx* 49:394–394. <https://doi.org/10.1017/S0030605315000599>
18. Echeverri Del Sarto J, Gallia MC, Ferrari A, Bongiovanni GA (2017, 2016) Tissue plant culture as a novel industrial strategy to produce biopharmaceuticals from endangered plants. In: International Institute of Social and Economic Sciences (eds) Proc. 24th Int. Acad. Conf, Barcelona, pp 113–121. <https://doi.org/10.20472/IAC.2016.024.030>
19. Murashige T, Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:26
20. Benzies IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
21. Krishnan V, Ahmad S, Mahmood M (2015) Antioxidant potential in different parts and callus of *Gynura procumbens* and different parts of *Gynura bicolor*. *Biomed Res Int* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/147909>
22. Soria EA, Quiroga PL, Albrecht C, Ramos Elizagaray SI, Cantero JJ, Bongiovanni GA (2014) Development of an antioxidant phytoextract of *Lantana grisebachii* with lymphoprotective activity against in vitro arsenic toxicity. *Adv Pharmacol Sci* 2014:1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/416761>
23. Matkowski A (2008) Plant in vitro culture for the production of antioxidants - a review. *Biotechnol Adv* 26:548–560. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.001>
24. Negi VS, Kewlani P, Pathak R, Bhatt D, Bhatt ID, Rawal RS, Sundriyal RC, Nandi SK (2018) Criteria and indicators for promoting cultivation and conservation of medicinal and aromatic plants in Western Himalaya, India. *Ecol Indic* 93:434–446. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.03.032>
25. Nandi SK, Palni LMS, Pandey H, Chandra B, Nadeem M (2016) Selection of elites and in vitro propagation of selected Himalayan medicinal herbs for sustainable utilization and conservation. In: Anis M, Ahmad N (eds) *Plant tissue culture: Propagation, conservation and crop improvement*. Springer Science & Business Media, Singapore, pp 15–44 ISBN 978-981-10-1916-6; 621
26. Cardemil L, Jordan M (1982) Light and electron microscopic study of in vitro cultured female gametophyte of *Araucaria araucaria* (Mol.) Koch. *Z Pflanzenphysiol* 107:329–338. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(82\)80199-2](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(82)80199-2)
27. Efferth T (2019) Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering* 5:50–59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
28. Shoja AA, Cheniary M, Ganjeali A (2021) Stimulation of phenolic compounds accumulation and antioxidant activity in in vitro culture of *Salvia tebesana* Bunge in response to nano-TiO₂ and methyl jasmonate elicitors. *Res Square*:1–24. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-686528/v1>
29. Khurshid R, Ullah MA, Tungmunnithum D, Drouet S, Shah M, Zaeem A, Hameed S, Hanold C, Abbasi BH (2020) Lights triggered differential accumulation of antioxidant and antidiabetic secondary metabolites in callus culture of *Eclipta alba* L. *PLoS One* 15:1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233963>
30. Vichit W, Saewan N (2019) In vitro antioxidant activities and cytotoxicity of peanut callus. *Extract Food Appl Biosci* 7:142–151
31. Pukacka S, Ratajczak E (2007) Age-related biochemical changes during storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Seed Sci Res* 17:45–53. <https://doi.org/10.1017/S0960258507629432>
32. Sreerama YN, Sashikala VB, Pratapa VM (2010) Variability in the distribution of phenolic compounds in milled fractions of chickpea and horse gram: evaluation of their antioxidant properties. *J Agric Food Chem* 58:8322–8330. <https://doi.org/10.1021/jf101335r>
33. Corso M, Perreau F, Mouille G, Lepiniec L (2020) Specialized phenolic compounds in seeds: structures, functions, and regulations. *Plant Sci* 296:110471. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110471>
34. Aslam M, Choudhary B, Uzair M, Ijaz A (2013) Phytochemical and ethnopharmacological review of the genus *Araucaria* – review. *Trop J Pharm Res* 12:651–659. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i4.31>
35. Sanguinetti J (2016) Climate change, wildfires and non-native granivores interactions in *Araucaria araucana* forests. Informe Técnico del área de conservación, Parque Nacional Lanín, Argentina. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1094.9527>
36. Pietrek AG, Branch LC (2011) Native plantations as an important element for biodiversity in vanishing forested landscapes: a study of the near threatened *araucaria tit spinetail* (*Leptasthenura setaria*, Furnariidae). *Austral Ecol* 36:109–116. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2010.02129.x>
37. Adsul AA, Chavan JJ, Gaikwad NB, Gurav RV, Dixit GB, Yadav SR (2019) In vitro regeneration approaches for restoration of *Ceropegia mohandarii*—an endemic and critically endangered asclepiad. *J Genet Eng Biotechnol* 17:2. <https://doi.org/10.1186/s43141-019-0003-6>
38. Abdelsalam A, Mahran E, Chowdhury K, Boroujerdi A (2021) Metabolic profiling, in vitro propagation, and genetic assessment of the endangered rare plant *Anarrhinum pubescens*. *J Genet Eng Biotechnol* 19:108. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00210-6>

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.