

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Carrera de Farmacia. Cátedra de Práctica Profesional Farmacéutica

Estudiante
Victoria Anahí Silva

Ensayo autográfico para la detección rápida de la capacidad antioxidante de extractos de *Acanthospermum australe*

**Tesina presentada para obtener el título de grado
“Farmacéutico”**

Director
Carlos Gustavo Altamirano

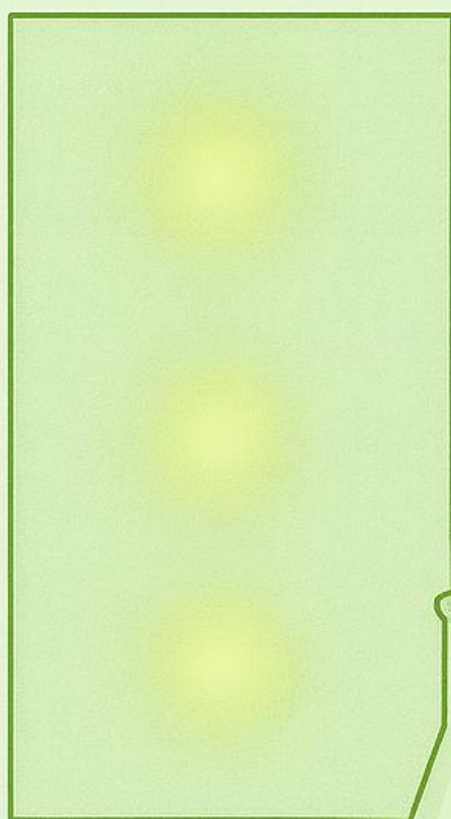
Posadas – Misiones – 2025



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

CARRERA DE FARMACIA
CÁTEDRA DE PRÁCTICA PROFESIONAL FARMACEÚTICA

***“Ensayo autográfico para la detección rápida de
la capacidad antioxidante de extractos de
Acanthospermum australe”***



Autora: Silva Victoria Anahí

Correo: victoria.sil198@gmail.com

Teléfono: 3765034811

Director: Dr. Altamirano, Carlos Gustavo

El presente trabajo de tesina para optar al título de Farmacéutica está enmarcado en el proyecto de investigación “Aislamiento biodirigido de compuestos fenólicos presentes en plantas medicinales pertenecientes a la familia Asteraceae de la provincia de Misiones”. COD 16/Q2399-TI.

Lugar de desarrollo: Laboratorio de Farmacobotánica “Dr. Anibal Amat”. Félix de Azara 1552 – (3300). Posadas, Misiones.

Año: 2025

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este camino académico, han sido muchas las personas que, de diversas formas, me acompañaron, guiaron y sostuvieron, permitiéndome llegar hasta aquí.

En primer lugar, agradezco profundamente a mis abuelos Isabel González y a la memoria de Nery Silva, quienes ocuparon el lugar de mis padres y fueron un pilar fundamental en mi vida. Su amor, apoyo incondicional y ejemplo de esfuerzo me acompañaron siempre.

A mi novio, Miguel, por su paciencia, compañía y por estar presente en cada momento difícil y en cada logro. A mi tía Luján, por su constante apoyo y aliento a lo largo de estos años.

A la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, y a todos los docentes que formaron parte de mi carrera, gracias por compartir sus conocimientos, por su dedicación y por sembrar en mí el amor por esta profesión.

Quiero expresar un agradecimiento especial a la Cátedra de Práctica Profesional Farmacéutica por su acompañamiento en este último tramo de la formación, y a toda la Cátedra de Farmacobotánica y al Laboratorio de Farmacobotánica “Dr. Aníbal Amat”, por brindarme el espacio y el respaldo necesarios para desarrollar esta tesina.

Mi gratitud también está dirigida especialmente al Dr. Carlos Gustavo Altamirano, director de esta tesina, por su guía, compromiso y confianza en mi trabajo.

A mis amigas Virginia, Antonela, Paula Yaniuk, Paula Benítez, Lucrecia, Pamela y Melanie, gracias por compartir tantos momentos, por su amistad sincera y por haber sido parte esencial de este proceso.

A todos mis compañeros, gracias por cada instante compartido, por las alegrías y el compañerismo que hicieron de estos años una etapa inolvidable.

Finalmente, agradezco a Dios, por haberme dado la fortaleza, la salud y la perseverancia necesarias para transitar este camino. Por haber iluminado mis pasos, incluso en los momentos más difíciles, y sostenerme siempre con su amor y su gracia.

RESUMEN

El *Acanthospermum australe* es un arbusto nativo perteneciente a la familia Asteraceae, es ampliamente utilizado en medicina tradicional por sus propiedades tópicas y en forma de tisanas, entre otros. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad antioxidante de extractos metanólicos de *A. australe* mediante un ensayo autográfico. Para ello, se realizó una combinación de técnicas cromatográficas (TLC y Columna) con la finalidad de separar los componentes del extracto crudo y analizar su composición cualitativa. Se obtuvo el extracto metanólico por maceración, se pusieron a punto las condiciones experimentales de la TLC y posteriormente el extracto fue fraccionado mediante cromatografía en columna con Sephadex LH-20 utilizando metanol como fase móvil. Luego el extracto crudo y las fracciones se analizaron en placas de TLC a modo comparativo. Se observaron bajo luz UV (254 y 365 nm), luego se aplicó NP/PEG para la detección de flavonoides y posteriormente en otro experimento de iguales condiciones se reveló con ABTS^{•+} a fin de evaluar la actividad antioxidante y poder realizar un análisis comparativo relacionado con el contenido fitoquímico obtenido anteriormente.

De las 23 fracciones analizadas, varias presentaron un perfil cromatográfico semejante al extracto metanólico crudo y evidenciaron capacidad antioxidante. Entre ellas, las fracciones 11, 12, 14 y 15 destacaron por exhibir fluorescencia característica tras revelado con NP/PEG, además de mostrar zonas de decoloración intensas frente al radical catiónico ABTS^{•+}, lo que las señaló como las más relevantes. La fracción 13 mostró evidencia secundaria, mientras que las fracciones 16 y 17 también decoloraron el radical catiónico ABTS^{•+}, aunque sin características típicas de flavonoides, lo que sugiere la participación de otros metabolitos antioxidantes.

En conclusión, *Acanthospermum australe* puede considerarse una fuente promisoría de metabolitos antioxidantes, y el ensayo autográfico en TLC con ABTS se mostró como un método rápido, económico y confiable para la detección de actividad antioxidante en extractos vegetales.

Este estudio constituye un aporte inicial y sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a profundizar en el potencial bioactivo de la especie.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	4
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos específicos	4
2.3. Hipótesis.....	4
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1. Historia y uso de las plantas medicinales.....	5
3.2. Uso de plantas medicinales en Argentina y su importancia en Misiones..	6
3.3. Flavonoides	7
3.3.1. Clasificación de los flavonoides	8
3.3.2. Biosíntesis de los flavonoides.....	9
3.3.3. Funciones fisiológicas y ecológicas en las plantas	10
3.3.4. Capacidad antioxidante y relevancia terapéutica.....	10
3.4. <i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze.....	12
3.4.1. Descripción botánica.....	12
3.4.2. Distribución y hábitat.....	13
3.4.3. Nombres comunes y usos tradicionales	14
3.4.4. Clasificación taxonómica.....	14
3.4.5. Fitoquímica del <i>Acanthospermum australe</i>	14
3.5. Ensayos cromatográficos	15
3.5.1. Cromatografía en capa delgada TLC	15
3.5.2. Cromatografía en columna.....	16
3.6. Revelados	16
3.6.1. Revelado físico	17
3.6.2. Revelado químico	17
3.7. Ensayo ABTS para la determinación de la actividad antioxidante	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Recolección y acondicionamiento del material vegetal	19
4.2. Obtención del extracto vegetal.....	20

4.3.	Puesta a punto de la cromatografía en capa fina (TLC).....	21
4.3.1.	Determinación del coeficiente de relación de frentes (Rf)	24
4.3.2.	Revelados del cromatograma preliminar	24
4.3.3.	Ensayo preliminar de detección antioxidante con ABTS	25
4.4.	Cromatografía en columna	25
4.5.	Cromatografía en capa fina (TLC) definitiva.....	27
4.5.1.	Determinación del coeficiente de relación de frentes (Rf)	30
4.5.2.	Revelados cromatográficos definitivos.....	31
4.5.3.	Ensayo autográfico definitivo de capacidad antioxidante con ABTS	32
5.	RESULTADOS.....	33
5.1.	Obtención del extracto seco y rendimiento del proceso de extracción ...	33
5.2.	Puesta a punto de la cromatografía en capa fina (TLC).....	33
5.2.1.	Determinación de los valores de Rf en fase móvil seleccionada	35
5.2.2.	Ensayo preliminar de capacidad antioxidante del extracto con ABTS	35
5.3.	Cromatografía en columna	36
5.4.	Cromatografía en capa fina (TLC) definitiva.....	37
5.4.1.	Ensayo autográfico definitivo de capacidad antioxidante con ABTS	42
6.	DISCUSIÓN.....	44
7.	CONCLUSIÓN	49
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Material vegetal " <i>Acanthospermum australe</i> "	19
Figura 2. Proceso de trituración del material vegetal con mortero y pilón.....	19
Figura 3. Maceración del material vegetal con metanol en agitador magnético. .	20
Figura 4. Filtración del extracto metanólico.....	21
Figura 5. Extracto metanólico antes de ser colocados en la estufa.....	21
Figura 6. Obtención de Extracto seco.....	21
Figura 7. Siembra del patrón y el extracto en placas de cromatografía en capa fina (TLC).	23
Figura 8. Corrida cromatográfica en fase móvil 1.....	24
Figura 9. Separación cromatográfica del extracto mediante cromatografía en columna.....	26
Figura 10. Fracciones obtenidas tras la elución cromatográfica, ordenadas según su recolección secuencial (1 a 23).	27
Figura 11. Fracciones en proceso de evaporación del solvente, tras su recolección por cromatografía en columna.	27
Figura 12. Reconstitución de las fracciones secas con metanol.	28
Figura 13 (a). Siembra del extracto patrón y fracciones F1-F12 en placas de TLC.	29
Figura 14. Placas cromatográficas en proceso de secado en estufa después de la siembra.....	29
Figura 15. Reactivos y material utilizado para la preparación de la fase móvil...	30
Figura 16. Corrida cromatográfica de las muestras en cámara de desarrollo saturada.	30

Figura 17. Lámpara de luz ultravioleta CAMAG utilizada para la observación de las placas cromatográficas a 254 nm y 366 nm.....	31
Figura 18. Placas cromatográficas con fase móvil 1, observadas bajo luz visible.	34
Figura 19. Revelado físico bajo luz UV a 254 nm (fase móvil 1).	34
Figura 20. Revelado con NP/PEG bajo luz UV a 365 nm (fase móvil 1).	34
Figura 21. Fase móvil 2 bajo luz visible.....	34
Figura 22. Fase móvil 2 bajo UV a 254 nm.	34
Figura 23. Fase móvil 2 a 365 nm sin revelado químico.	34
Figura 24. Fase móvil 2 revelada con NP/PEG a 365 nm.	34
Figura 25. Fase móvil 3 bajo luz visible.....	35
Figura 26. Fase móvil 3 bajo UV a 254 nm.....	35
Figura 27. Fase móvil 3 a 365 nm sin revelado químico.....	35
Figura 28. Fase móvil 3 revelada con NP/PEG a 365 nm.	35
Figura 29. Revelado con ABTS sobre placa cromatográfica desarrollada con fase móvil 1.	35
Figura 30. Distribución de la masa seca obtenida en las fracciones F1–F23	37
Figura 31. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 1–12, observada bajo luz UV a 254 nm, sin revelado químico (placa 1).....	38
Figura 32. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 13–23, observada bajo luz UV a 254 nm, sin revelado químico (placa 2).....	39
Figura 33. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 1-12, observada bajo luz UV a 365 nm, sin revelado químico (placa 1).	39
Figura 34. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 13–23, observada bajo luz UV a 365 nm, sin revelado químico (placa 2).....	40

Figura 35. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 1–12 revelada con NP/PEG y observada bajo luz UV a 365 nm (placa 1).	40
Figura 36. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 13–23 revelada con NP/PEG y observada bajo luz UV a 365 nm (placa 2).	41
Figura 37. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 1–12 reveladas con ABTS (placa 1).....	42
Figura 38. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 13–23 reveladas con ABTS (placa 2).....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Acanthospermum australe</i>	14
Tabla 2. Valores de Rf determinados para el patrón rutina y el extracto metanólico de <i>Acanthospermum australe</i> en fase móvil 1	35
Tabla 3. Masa seca de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna ...	36
Tabla 4. Valores de Rf y número de bandas obtenidas para el extracto patrón y las fracciones seleccionadas en ambas placas cromatográficas.	41

1. INTRODUCCIÓN

Durante su evolución, las plantas terrestres desarrollaron complejas rutas biosintéticas para sintetizar una amplia variedad de compuestos, como los flavonoides, alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos y fenoles, entre ellos, polímeros como las ligninas y los taninos. Estos compuestos, clasificados principalmente como metabolitos secundarios, confieren a las plantas ventajas adaptativas fundamentales para su supervivencia frente a organismos invasores y condiciones ambientales adversas (Leicach et al., 2009, "Prefacio").

Los metabolitos secundarios desempeñan un papel crucial en la defensa de las plantas frente a organismos dañinos, como herbívoros, hongos, bacterias, virus, otras especies vegetales y malezas. Además, forman parte del complejo sistema de comunicación química entre seres vivos que se estudia dentro del campo de la ecología química. En este contexto, la alelopatía constituye una rama específica de dicha disciplina, encargada de analizar e interpretar el lenguaje químico que interviene en las interacciones entre plantas, el cual ha evolucionado y adquirido mayor complejidad a lo largo del tiempo (Leicach et al., 2009, "Prefacio").

Las relaciones entre organismos vivos, tanto benéficas como perjudiciales, son conocidas por el ser humano desde mucho antes de la formalización de la ecología como ciencia. Con el desarrollo de la ecología química, se comprendió que estas interacciones están mediadas por señales químicas o biomoléculas. Esta disciplina busca interpretar ese lenguaje químico, cuya variabilidad y evolución responde a la complejidad de los sistemas biológicos. Entre sus objetos de estudio se encuentran los aleloquímicos, especialmente aquellos involucrados en la interacción entre plantas (Leicach et al., 2009, p. 1).

Entre los metabolitos vegetales más relevantes en las estrategias de defensa se destacan los terpenoides, alcaloides, glucósidos cianogénicos, flavonoides y otros compuestos fenólicos, además de polímeros como ligninas y taninos. Microorganismos y plantas emiten miles de compuestos orgánicos que pueden alterar el crecimiento o la fisiología de otras plantas. La presencia de estos compuestos en el ambiente influye en fenómenos ecológicos y agrícolas, como la sucesión vegetal, la distribución de especies, la fatiga del suelo o la proliferación de malezas agresivas (Leicach et al., 2009, p. 1).

El estudio de los aleloquímicos no solo aporta conocimiento ecológico, sino que también ofrece herramientas para preservar la biodiversidad, controlar enfermedades y desarrollar estrategias sostenibles para el manejo de malezas (Leicach et al., 2009, p. 2).

Los radicales libres, especies químicas altamente reactivas con electrones desapareados, se generan en procesos celulares como la fosforilación oxidativa y también por factores externos como radiación UV, contaminación o fármacos. Su acción provoca daño molecular a lípidos, proteínas y ADN, y cuando superan las defensas antioxidantes del organismo, originan estrés oxidativo (Challem & Block, 2008).

Frente a ello, el organismo cuenta con sistemas antioxidantes endógenos y puede obtener antioxidantes exógenos a través de la dieta, como los flavonoides. Estos metabolitos secundarios derivados del ácido shiquímico abundan en frutas, verduras, hojas y flores. Neutralizan radicales libres al donar electrones, quelan metales prooxidantes y modulan enzimas antioxidantes (Challem & Block, 2008).

El exceso de radicales libres contribuye al desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles. En enfermedades cardiovasculares, promueven la oxidación de LDL favoreciendo la aterosclerosis. En el cáncer, inducen mutaciones en el ADN, y en patologías neurodegenerativas como el Alzheimer dañan estructuras neuronales. Por ello, los flavonoides no solo previenen estas condiciones, sino que también pueden ralentizar su progreso mediante la reducción del estrés oxidativo y la modulación de procesos inflamatorios (Challem & Block, 2008).

Desde tiempos remotos, las plantas medicinales han sido empleadas para tratar enfermedades. Su conocimiento ha sido transmitido a lo largo de generaciones mediante prácticas tradicionales, constituyendo la base de muchas medicinas ancestrales. Actualmente, se consideran un patrimonio valioso que debe ser conservado y valorizado (Sabini et al., 2019).

Acanthospermum australe (Loeffl.) O. Kuntze (Asteraceae) es una especie herbácea conocida como “tapecué” en Argentina y Paraguay, y “carrapichinho” en Brasil. Se encuentra comúnmente en suelos agrícolas, campos y baldíos, y suele considerarse una planta invasora. Se caracteriza por sus tallos ramificados y pubescentes, hojas opuestas con bordes aserrados, flores amarillas dimorfas y frutos cubiertos de cerdas ganchudas. Tradicionalmente, se emplean sus partes aéreas en

infusiones para tratar heridas, fiebre, diarreas, parásitos, infecciones y anemia (Altamirano, 2019).

Además, se la emplea como antiséptico, antiinflamatorio y diurético en la medicina popular (Bardón et al., 2009).

El análisis de los componentes bioactivos en extractos hidroalcohólicos de plantas como *A. australe* puede explicar su potencial antioxidante, el cual se relaciona con la prevención de enfermedades crónicas. Estos extractos actúan frente al daño inducido por radicales libres que oxidan macromoléculas celulares, más allá de lo que pueden neutralizar las defensas endógenas del organismo. Por ello, los antioxidantes vegetales resultan beneficiosos frente a infecciones, enfermedades inflamatorias, diabetes y otras patologías (Soro et al., 2021).

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general

Realizar un ensayo autográfico para la detección rápida de la capacidad antioxidante de extractos de *Acanthospermum australe*, mediante cromatografía en capa delgada, con revelado posterior mediante el sistema ABTS.

2.2. Objetivos específicos

- Obtener un extracto crudo de la droga vegetal.
- Separar el extracto crudo por medio de cromatografía en columna.
- Caracterizar el extracto mediante cromatografía en capa delgada.
- Analizar la actividad antioxidante del extracto crudo y sus correspondientes fracciones por medio de cromatografía en capa delgada utilizando un sistema con ABTS.
- Realizar comparaciones entre los cromatogramas correspondientes a los extractos crudos y sus fracciones.

2.3. Hipótesis

El extracto de *Acanthospermum australe* presenta capacidad antioxidante detectable mediante un ensayo autográfico en cromatografía en capa delgada con ABTS, cuya implementación permitirá una detección rápida, económica, confiable y repetible, evidenciando la bioactividad asociada a los metabolitos secundarios presentes en el extracto.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Historia y uso de las plantas medicinales

Desde tiempos antiguos, las plantas medicinales han sido utilizadas por distintas civilizaciones como recurso terapéutico para prevenir o tratar enfermedades. El conocimiento sobre sus usos fue transmitido de manera oral de generación en generación, lo que permitió conservar estos saberes a lo largo del tiempo. Ya en la Prehistoria, las plantas se usaban no solo como alimento, sino también para curar heridas, aliviar dolores o mejorar el estado de ánimo. Estas prácticas surgieron a partir de la observación del entorno natural y del comportamiento de los animales (Sabini et al., 2019).

A lo largo de la historia, culturas como la sumeria, asiria, egipcia, hindú, china, griega y árabe documentaron y organizaron el uso de especies vegetales con fines medicinales. En la Antigua Grecia, Teofrasto elaboró la primera clasificación botánica con fines terapéuticos, mientras que Hipócrates propuso un uso racional de las plantas, desvinculado de creencias mágicas. Más adelante, durante el Renacimiento, la invención de la imprenta permitió que el conocimiento sobre plantas medicinales se difundiera de forma más amplia y accesible mediante documentos escritos (Sabini et al., 2019).

En América, pueblos originarios como los mayas, aztecas y guaraníes desarrollaron complejos sistemas de curación basados en el uso de plantas nativas. Tras la colonización, muchas de estas especies fueron incorporadas al conocimiento europeo, ampliando las posibilidades terapéuticas. En Argentina, la diversidad ambiental y cultural favoreció el desarrollo de la medicina popular, especialmente en regiones donde los saberes indígenas se mantuvieron vivos (Sabini et al., 2019).

Aunque el desarrollo de la medicina moderna y la aparición de medicamentos sintéticos desplazaron en parte el uso tradicional de las plantas, los efectos secundarios de muchos fármacos impulsaron un renovado interés por los compuestos naturales. A pesar de los avances científicos, gran parte del reino vegetal aún no ha sido estudiado, y la pérdida de biodiversidad amenaza con hacer desaparecer posibles recursos terapéuticos valiosos (Sabini et al., 2019).

3.2. Uso de plantas medicinales en Argentina y su importancia en Misiones

El uso de plantas medicinales constituye una práctica ancestral en diversas culturas del mundo y sigue vigente en la actualidad como parte esencial de la atención primaria de salud. Se estima que cerca del 80 % de la población mundial recurre a plantas con propiedades terapéuticas, ya sea por motivos culturales, económicos o por la eficacia demostrada de sus compuestos bioactivos (Barboza et al., 2009). En este contexto, se considera planta medicinal a toda especie que contiene en uno o más de sus órganos sustancias con propiedades terapéuticas o precursoras de fármacos (OMS, 2002). Estas sustancias, denominadas principios activos, son compuestos químicos naturales responsables de la acción terapéutica de la planta (Farmacopea Argentina, 2013).

Argentina posee una flora medicinal particularmente rica y diversa, con 1.529 taxones de plantas vasculares con usos terapéuticos registrados, lo que representa aproximadamente el 15 % de su flora nativa. La mayoría de estas especies pertenecen a la clase de las dicotiledóneas, siendo la familia Asteraceae la más representada entre las especies medicinales, tanto en cantidad como en variedad de aplicaciones. Este grupo es especialmente valorado por sus efectos antiinflamatorios, digestivos, cicatrizantes, antisépticos y antioxidantes (Barboza et al., 2009).

En cuanto a su distribución geográfica, las regiones del Noroeste y Noreste argentino concentran la mayor diversidad de plantas medicinales. La provincia de Misiones, por su clima subtropical y su biodiversidad característica de la selva paranaense, representa uno de los territorios más relevantes en cuanto a riqueza de especies, muchas de ellas utilizadas tradicionalmente por comunidades rurales y guaraníes. El conocimiento popular transmitido de generación en generación ha permitido conservar prácticas terapéuticas basadas en el uso de infusiones, decocciones y preparados locales (Barboza et al., 2009).

A pesar de este valioso patrimonio natural y cultural, una gran proporción de estas plantas no ha sido aún investigada en profundidad. Más del 45 % de las especies medicinales no han sido analizadas químicamente, y el 58 % carece de estudios biológicos documentados, lo cual representa una oportunidad para futuras

investigaciones en fitoquímica, farmacología y conservación de la biodiversidad (Barboza et al., 2009).

3.3. Flavonoides

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios de las plantas, caracterizados por la presencia de al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, donde cumplen funciones esenciales relacionadas con la defensa frente a patógenos, la adaptación a condiciones ambientales adversas y la atracción de polinizadores. Además, poseen un notable interés en el ámbito farmacológico y alimentario, debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Dentro de este grupo se incluyen clases relevantes como los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, lignanos y estilbenos, cuya diversidad estructural explica la variedad de actividades biológicas que presentan (Panche et al., 2016).

Entre ellos, los flavonoides son una amplia familia de compuestos polifenólicos naturales derivados de plantas, caracterizados por una estructura básica compuesta por quince átomos de carbono dispuestos en un esqueleto C6–C3–C6. Esta configuración consiste en dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una cadena de tres carbonos que generalmente forma un anillo heterocíclico central (C). Las distintas formas de sustitución en los anillos A, B y C originan subclases como flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Zhou, 2015).

Los flavonoides representan uno de los grupos más versátiles de metabolitos secundarios. Cumplen funciones esenciales en las plantas, como la protección frente a la radiación ultravioleta, la atracción de polinizadores y la defensa contra patógenos. Su notable diversidad estructural y funcional también ha sido objeto de estudio por su potencial uso farmacológico (Harborne, 1984).

Estos compuestos están presentes en un gran número de especies vegetales, especialmente en plantas superiores, donde se concentran principalmente en las partes aéreas como las hojas, flores y frutos. Entre las familias botánicas con mayor contenido de estos compuestos se destacan las Rutáceas, Polygonáceas, Umbelíferas y Asteráceas (Kuklinski, 2006). Asimismo, se documenta que la diversidad

estructural de estos compuestos es particularmente elevada en las angiospermas, y que aproximadamente treinta tipos se han identificado en la familia Asteraceae (Bruneton, 2001). Este hecho refuerza el interés por el estudio fitoquímico de especies pertenecientes a dicha familia, como *Acanthospermum australe*, en relación con su potencial antioxidante, dado su reconocido papel en la neutralización de radicales libres y en la protección frente al daño celular oxidativo (Khan et al., 2023).

3.3.1. Clasificación de los flavonoides

Los flavonoides pueden clasificarse en distintos subgrupos según el grado de oxidación y saturación del anillo central (C), así como por la posición del anillo B y los tipos de sustituciones químicas. Estas diferencias estructurales determinan tanto sus propiedades físico-químicas como sus funciones biológicas (Harborne, 1984).

Las principales clases de flavonoides son:

- Flavonas: compuestos incoloros que actúan como copigmentos en la expresión del color de las antocianinas. Presentan un doble enlace entre C2 y C3, una cetona en C4 y carecen de grupo hidroxilo en C3. Se encuentran comúnmente como O- o C-glucósidos. Ejemplos: apigenina y luteolina (Harborne, 1984).
- Flavonoles: derivados de las flavonas, con un grupo OH adicional en C3, lo que aumenta su polaridad y capacidad antioxidante. Ejemplos: kaempferol, quercetina y miricetina (Harborne, 1984).
- Flavanonas: poseen un anillo heterocíclico saturado, sin doble enlace entre C2 y C3. Ejemplos: naringenina y su glucósido naringina (Harborne, 1984).
- Isoflavonas: se caracterizan por la reubicación del anillo B a la posición 3 del anillo central, en lugar de la 2. Son típicas de las leguminosas y presentan actividad estrogénica débil. Ejemplos: genisteína y daidzeína (Harborne, 1984).
- Chalconas y Auronas: son isómeros estructurales de las flavanonas. Las chalconas presentan un anillo C abierto y lineal, mientras que las auronas poseen un anillo heterocíclico de cinco miembros. Ambas clases están presentes en la familia Asteraceae (Harborne, 1984).

- Antocianidinas: pigmentos intensamente coloreados (rojos, violetas, azules) con estructura de catión flavilio conjugado. Son responsables de la coloración de flores y frutos. En su forma glicosilada se denominan antocianinas (Harborne, 1984).
- Biflavonoides: compuestos formados por la unión de dos unidades flavonoides mediante enlaces C-C o C-O-C. Ejemplo representativo: kyaflavona (Harborne, 1984).

3.3.2. Biosíntesis de los flavonoides

La biosíntesis de los flavonoides en las plantas sigue una vía mixta, que integra dos rutas metabólicas primarias: la vía del ácido shikímico y la vía del acetato/malonato. Esta convergencia metabólica permite la formación del esqueleto C₆-C₃-C₆, característico de los flavonoides, y sustenta su gran diversidad estructural. La primera fase comienza con la fenilalanina, un aminoácido derivado del ácido shikímico, que es transformada en ácido cinámico por acción de la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL). A partir de allí, mediante una hidroxilación, se forma el ácido p-cumárico, un fenilpropanoide que aporta el segmento C₆-C₃ del esqueleto flavonoide (Harborne, 1984).

De forma paralela, a través de la vía del acetato/malonato, se sintetizan unidades de malonil-CoA a partir de acetyl-CoA. Estas unidades actúan como bloques de extensión de cadena. La enzima chalcona sintasa (CHS) cataliza la condensación del ácido p-cumárico con tres malonil-CoA, dando origen a una chalcona, que posee una estructura abierta pero ya contiene el esqueleto completo del flavonoide (C₆-C₃-C₆). Posteriormente, mediante la acción de la enzima chalcona isomerasa (CHI), la chalcona se convierte en una flavanona, la estructura central a partir de la cual se derivan las distintas subclases de flavonoides (Harborne, 1984).

A partir de la flavanona, distintas modificaciones enzimáticas permiten formar una amplia familia de compuestos secundarios con estructuras variadas y funciones biológicas importantes (Harborne, 1984).

3.3.3. Funciones fisiológicas y ecológicas en las plantas

Los flavonoides cumplen diversas funciones esenciales en la fisiología vegetal. Uno de sus roles más visibles es su participación como pigmentos naturales, especialmente en flores, frutos y hojas jóvenes. Las antocianidinas y otros flavonoides relacionados contribuyen a la coloración que atrae polinizadores y dispersores de semillas, facilitando la reproducción de las especies (Harborne, 1984).

Además, actúan como pantallas biológicas, protegiendo los tejidos vegetales de los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (UV), gracias a su capacidad de absorber radiación en el rango UV-A y UV-B. Esta función protectora es particularmente relevante en plantas expuestas a ambientes con alta intensidad solar (Buchanan et al., 2015).

Muchos flavonoides también participan en la defensa frente a patógenos y herbívoros. Dentro de esta función, ciertos isoflavonoides presentes en leguminosas actúan como fitoalexinas, es decir, compuestos antimicrobianos que las plantas sintetizan de forma inducida cuando detectan una infección. Ejemplos conocidos incluyen la pisatina en arveja (*Pisum sativum*) y las glyceolinas en soja (*Glycine max*), ambos con actividad antifúngica. Esta respuesta química permite a la planta limitar el avance del patógeno y reforzar sus mecanismos de defensa (Harborne, 1984).

Por otro lado, algunos flavonoides participan como aleloquímicos, es decir, compuestos liberados al ambiente que pueden inhibir la germinación o el crecimiento de plantas competidoras. Este tipo de interacción química es común en ecosistemas con alta competencia por recursos y forma parte de las estrategias de defensa y dominancia vegetal (Leicach et al., 2009).

3.3.4. Capacidad antioxidante y relevancia terapéutica

El papel terapéutico de los flavonoides se relaciona directamente con su capacidad antioxidante, especialmente en la prevención y modulación de enfermedades en las que el estrés oxidativo cumple un rol central. Este estrés se produce cuando existe un desequilibrio entre la generación de radicales libres y la capacidad del organismo para neutralizarlos mediante sus sistemas antioxidantes, los cuales incluyen enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión

peroxidasa, y moléculas antioxidantes como glutatión, vitamina C, vitamina E y compuestos fenólicos de la dieta. Cuando la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) se incrementa, y supera la capacidad de respuesta de estos sistemas, se desencadena el estrés oxidativo (Challem & Block, 2008).

En este contexto, los radicales libres inician reacciones en cadena altamente reactivas, atacando lípidos de membranas celulares —lo que provoca peroxidación lipídica, lo cual compromete la integridad estructural y funcional de la célula—, también oxidando proteínas, lo que puede alterar su estructura o su actividad enzimática, y dañando el ADN mediante modificaciones de bases o roturas de cadena. Estas alteraciones comprometen la viabilidad y función celular, y se consideran un factor clave en la fisiopatología de diversas enfermedades crónicas, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos (Challem & Block, 2008).

Los flavonoides, por su estructura rica en grupos hidroxilo fenólicos, pueden donar electrones sin volverse inestables, lo que les permite interrumpir estas cadenas de reacciones al neutralizar radicales libres antes de que ataquen componentes celulares. Esta acción es crucial porque evita fenómenos como la peroxidación lipídica, que daña membranas celulares; la oxidación de proteínas, que altera funciones biológicas; y el daño al ADN, que puede favorecer mutaciones y transformaciones celulares (Challem & Block, 2008).

En enfermedades como el cáncer, se ha observado que el daño oxidativo al ADN puede causar errores en la replicación celular, contribuyendo a la transformación maligna de células normales. Al reducir el impacto del estrés oxidativo, los flavonoides actúan como agentes quimiopreventivos, disminuyendo el riesgo de mutaciones y proliferación anormal. En el caso de las enfermedades cardiovasculares, el estrés oxidativo favorece la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL oxidado), que desencadena respuestas inflamatorias y formación de placas ateroscleróticas. Los flavonoides, al prevenir esta oxidación, contribuyen a proteger la integridad vascular y reducir el riesgo de aterosclerosis (Challem & Block, 2008).

A nivel neurológico, en enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson, los radicales libres participan en la degeneración progresiva de neuronas, afectando membranas, mitocondrias y proteínas clave como la beta-amiloide. Los flavonoides pueden proteger las neuronas del daño oxidativo, retrasar la pérdida de función

celular y mantener la integridad de las estructuras nerviosas. Esta capacidad resulta fundamental en la prevención del deterioro cognitivo asociado al envejecimiento y a trastornos neurodegenerativos (Challem & Block, 2008).

Además de su acción directa sobre los radicales libres, los flavonoides poseen la capacidad de quelar metales de transición como el hierro (Fe^{2+}) y el cobre (Cu^+), formando complejos estables que bloquean su participación en reacciones prooxidantes. Esto es especialmente relevante en el contexto de la reacción tipo Fenton, en la cual el hierro ferroso reacciona con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generando radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$), una de las especies más reactivas y dañinas para el ADN, las proteínas y los lípidos. Al unirse a estos metales, los flavonoides previenen la formación de radicales altamente tóxicos, interrumpiendo así rutas clave del estrés oxidativo. Este efecto se vuelve aún más importante en condiciones donde hay acumulación de metales catalíticos, que intensifican la generación de ROS y agravan el daño celular oxidativo (Challem & Block, 2008).

En conjunto, la capacidad de los flavonoides para interrumpir reacciones de oxidación en cadena, estabilizar radicales libres, proteger macromoléculas y regular procesos inflamatorios secundarios al daño oxidativo, sustenta su aplicación como compuestos con potencial terapéutico en la prevención de múltiples enfermedades crónicas. Su bajo nivel de toxicidad y su presencia natural en alimentos vegetales refuerzan el interés actual por su uso en estrategias farmacológicas preventivas (Challem & Block, 2008).

3.4. *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze

3.4.1. Descripción botánica

A. australe es una planta anual, herbácea, perteneciente a la familia Asteraceae, con tallos ascendentes o decumbentes, a veces rastreros y radicantes en los nudos, cuya longitud varía entre 20 y 80 cm, según el hábito de crecimiento. Los tallos son delgados, pubescentes y presentan hojas a lo largo de toda su extensión, incluso en el ápice.

Las hojas son opuestas, de forma rómbico-ovada, con base cóncavo-atenuada y pecíolos cortos; presentan ápice agudo u obtuso y margen dentado-

aserrado. Son laxamente pubescentes y muestran pequeñas glándulas puntiformes en ambas caras, especialmente en la inferior (Flora Argentina, s.f.).

La planta presenta capítulos florales solitarios, ubicados en pedúnculos cortos que nacen tanto en las axilas de las hojas como en los extremos de los tallos. Cada capítulo está rodeado por un involucreo con forma de campana, formado por cinco brácteas externas ovadas, con algunos pelos en el dorso (Flora Argentina, s.f.).

Las flores son dimorfas, con corolas de color blanco-amarillento. Las del borde del capítulo son femeninas (pistiladas), con una lígula elíptica o circular. Las del centro son masculinas (estaminadas), en número aproximado de doce por capítulo, con un tubo corto y papiloso (Flora Argentina, s.f.).

El fruto es seco y alargado, estrecho en los extremos (fusiforme). Está completamente cubierto por una envoltura formada por las brácteas internas del involucreo floral, que le da el aspecto de un pseudofruto. Su superficie presenta surcos marcados y está recubierta por cerdas rígidas con forma de gancho (Flora Argentina, s.f.).

3.4.2. Distribución y hábitat

A. australe es una especie nativa de Sudamérica, presente en el centro y este de Argentina (provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Misiones, Santa Fe y San Luis), así como en países limítrofes como Brasil, Paraguay y Uruguay (Flora Argentina, s.f.). Fuera de su rango nativo, la especie se ha registrado como introducida o adventicia en otras regiones del continente americano, incluyendo los Estados Unidos, y también en Asia (Flora Argentina, s.f.).

La planta crece en suelos agrícolas, especialmente en aquellos originados en campos abiertos y zonas con vegetación de tipo sabana o matorral seco, que suelen tener suelos más arenosos. También puede encontrarse en pastizales y terrenos baldíos, motivo por el cual es considerada una maleza por los agricultores (Martins et al., 2006).

3.4.3. Nombres comunes y usos tradicionales

En Argentina se la denomina vulgarmente “tapecué”, en Paraguay “tapekue” y en Brasil “carrapichinho”. En la medicina popular, la planta entera se emplea para uso externo, en forma de baños o lavados, en el tratamiento de afecciones cutáneas como heridas ulcerosas, micosis y procesos inflamatorios. Para uso interno, el ramo de la planta se administra por vía oral en té preparado mediante infusión o decocción, al que se le atribuyen propiedades tónicas y digestivas, así como efecto antipirético (Ramírez Garay, 2019).

3.4.4. Clasificación taxonómica

La posición taxonómica de *Acanthospermum australe* se resume en la **Tabla 1**, de acuerdo con el sistema APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016).

Tabla 1. *Taxonomía de Acanthospermum australe*

Reino	Plantae
Clado	Angiospermas
Clado	Eudicotiledóneas
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Acanthospermum</i>
Especie	<i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze

Nota. Elaboración propia a partir de Angiosperm Phylogeny Group (2016).

3.4.5. Fitoquímica del *Acanthospermum australe*

En cuanto a su composición química, en evaluaciones fitoquímicas realizadas a partir de extractos metanólicos-acuosos (9:1 v/v) de hojas de esta especie se constató la presencia de taninos, saponinas, terpenoides, fenoles, alcaloides y anillos esteroídicos, mientras que los flavonoides y esteroides libres no fueron detectados. La detección de estos compuestos proporciona un sustento científico al empleo popular de la especie en el tratamiento de distintas enfermedades que afectan tanto a seres humanos como a animales, y refuerza su relevancia como recurso de interés farmacéutico (Thangiah et al., 2013).

Además, según el estudio bibliográfico de Silva (2024), en *A. australe* se han aislado 46 compuestos de sus partes aéreas, entre los cuales predominan las lactonas terpénicas (27 sesquiterpénicas y 4 diterpénicas) y distintos flavonoides. Entre estos últimos se destacan las agliconas penduletina, crisosplenol D, axilarina y quercetina, así como los flavonoides glicosilados trifolina, hiperina y rutina. También se ha informado la presencia de ácido cafeico, junto con otros metabolitos como el sesquiterpeno globulol, los monoterpenos timol e isotimol y un hidrocarburo insaturado (Silva, 2024). Asimismo, la autora señala que varios estudios han abordado la bioactividad de los extractos de *A. australe*, especialmente en lo referente a actividades antioxidantes y otras acciones farmacológicas, lo que reafirma el potencial de esta especie como recurso medicinal.

Se ha reportado actividad antioxidante en el extracto acuoso de *A. australe* por Desmarchelier y colaboradores (1997). En dicho estudio, los autores evaluaron el potencial antioxidante de 19 especies vegetales recolectadas en Argentina, y *A. australe* se ubicó entre las tres especies más activas, con un valor de IC₅₀ (concentración del extracto que inhibe el proceso oxidativo en un 50 %) de 123 µg/mL en el ensayo de quimioluminiscencia iniciada por hidroperóxido (Desmarchelier et al., 1997).

3.5. Ensayos cromatográficos

La cromatografía es una técnica de separación que se basa en la migración diferencial de los componentes de una mezcla entre dos fases: una fase móvil, que fluye en una dirección determinada, y una fase estacionaria, que permanece fija. La separación se produce debido a las diferencias de afinidad de los componentes por cada fase, lo que provoca que migren a distintas velocidades (Farmacopea Argentina, 2023).

3.5.1. Cromatografía en capa delgada TLC

La cromatografía en capa delgada (CCD), habitualmente denominada *thin layer chromatography* (TLC), es una técnica ampliamente utilizada para la separación e identificación de sustancias. El mecanismo de separación predominante es la adsorción, aunque dependiendo del tipo de adsorbente utilizado pueden observarse también fenómenos de partición (Farmacopea Argentina, 2023).

Esta técnica se realiza en una placa compuesta por un soporte inerte recubierto con una fina capa de material adsorbente, que constituye la fase estacionaria. La muestra se deposita en la placa y se desarrolla utilizando un disolvente o una mezcla de disolventes (fase móvil o eluyente), que asciende por acción capilar. Durante el proceso, algunos compuestos presentan mayor afinidad por la fase móvil y otros por la fase estacionaria, lo que determina distintas velocidades de migración y permite la separación de los componentes de la mezcla (Corzo, 2019).

3.5.2. Cromatografía en columna

La cromatografía en columna es una técnica de separación en la que una fase estacionaria se dispone dentro de una columna (habitualmente de vidrio) y una fase móvil, líquida o gaseosa, atraviesa dicha columna. La separación de los componentes de una mezcla ocurre en función de su diferente afinidad por la fase móvil o la fase estacionaria, lo que provoca que migren a distintas velocidades y puedan recolectarse por fracciones (Méndez et al., 2023).

Existen distintos mecanismos de separación como partición, exclusión, absorción o intercambio iónico. En este trabajo se utilizó una cromatografía en columna con Sephadex LH-20 como fase estacionaria y metanol como fase móvil, lo que corresponde a un mecanismo combinado de partición y exclusión por tamaño. La separación se basa en la distinta afinidad de los compuestos por el disolvente retenido en el gel (fase estacionaria líquida) y por la fase móvil, lo que genera diferentes velocidades de elución. Además, el Sephadex LH-20 es un gel poroso que permite que las moléculas pequeñas penetren en sus poros y se retrasen más en su paso por la columna, mientras que las moléculas más grandes quedan excluidas de los poros y eluyen más rápidamente.

3.6. Revelados

Los componentes separados por cromatografía en capa fina (TLC) deben ser visualizados para su análisis. Esto no representa un inconveniente en el caso de sustancias coloreadas, como los pigmentos, que pueden observarse directamente a simple vista. Sin embargo, cuando los componentes separados son incoloros o no presentan un color perceptible, se requiere el empleo de diversas herramientas de

detección, denominadas reveladores, que pueden ser físicos o químicos (Sgariglia et al., 2010).

3.6.1. Revelado físico

Entre los reveladores físicos, el más utilizado es la luz ultravioleta (UV) mediante lámparas especiales. Las placas comerciales de TLC suelen estar preparadas con un indicador fluorescente incorporado a la fase estacionaria, generalmente un compuesto como el óxido de zinc activado, lo que permite facilitar la observación de los compuestos bajo radiación UV (Méndez et al., 2023).

Cuando se utiliza luz UV de 254 nm (UV corta), la placa completa presenta una fluorescencia uniforme, visible en color verdoso o amarillento según el tipo de indicador. Las zonas donde se encuentran los compuestos absorben la radiación UV y apagan la fluorescencia localmente, por lo que se visualizan como manchas oscuras sobre el fondo brillante. En este caso, lo que se observa es la fluorescencia del indicador de la placa, no la de los compuestos (Wagner et al., 1984).

En cambio, bajo luz UV de 365 nm (UV larga), los compuestos fenólicos, como los flavonoides, poseen la capacidad de emitir fluorescencia propia. Estos compuestos se visualizan como manchas de colores característicos: amarillo, verde o azul, según su estructura química (Wagner et al., 1984).

La intensificación y una mayor diferenciación de la fluorescencia bajo UV-365 nm pueden lograrse mediante el uso de reveladores químicos.

3.6.2. Revelado químico

Los reveladores químicos son sustancias que reaccionan de manera específica con determinados grupos funcionales presentes en las moléculas, lo que permite visualizar los componentes separados en la placa de cromatografía en capa fina (TLC). Este tipo de revelado resulta especialmente útil cuando se conocen los compuestos que se desean identificar, ya que permite seleccionar el reactivo más adecuado para detectarlos con mayor especificidad e inequívocamente (Sgariglia et al., 2010).

Para la detección de flavonoides mediante cromatografía en capa fina se utiliza el reactivo de productos naturales–poli(etilenglicol), conocido como reactivo NP/PEG. Este revelador consiste en la aplicación de una solución de

difenilboriloxietilamina en metanol (NP, 1%), seguida de una solución de polietilenglicol 4000 en etanol (PEG, 5%), en proporción (5:4). Al ser rociado sobre la placa y expuesto bajo luz UV a 365 nm, el reactivo genera zonas de fluorescencia intensa de color amarillo, naranja o verde, dependiendo de la estructura de los flavonoides presentes. Además, la incorporación de PEG incrementa la sensibilidad del método, reduciendo el límite de detección de 10 µg a 2,5 µg (Wagner et al., 1984).

3.7. Ensayo ABTS para la determinación de la actividad antioxidante

El ensayo con el radical catiónico ABTS^{•+} es una técnica ampliamente utilizada para detectar la capacidad antioxidante de compuestos puros y de extractos vegetales. El método se basa en la reducción de un radical catiónico cromógeno (ABTS^{•+}), de color verde azulado característico, por compuestos con actividad antioxidante presentes en la muestra. Esta reacción genera una decoloración localizada que permite identificar las sustancias activas (Kuskoski et al., 2005).

El radical ABTS^{•+} se obtiene previamente mediante la oxidación del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) con persulfato de potasio (K₂S₂O₈), en una reacción que se realiza en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante un período de incubación de 12 a 16 horas (Kuskoski et al., 2005).

La reducción del ABTS^{•+} ocurre por un mecanismo de transferencia de electrones, lo que transforma el radical en ABTS y provoca la pérdida local de color (Tovar del Río, 2013).

Cuando se aplica sobre una placa de cromatografía en capa fina (TLC), las zonas donde se encuentran los compuestos antioxidantes se visualizan como manchas claras sobre el fondo coloreado. Este procedimiento permite una detección cualitativa, visual y directa de la actividad antioxidante.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología del presente trabajo se encuadra en el Proyecto de Investigación “Aislamiento biodirigido de compuestos Fenólicos presentes en plantas medicinales pertenecientes a la familia Asteraceae de la provincia de Misiones”. COD 16/Q2399-TI, por lo que se plantea lo siguiente:

4.1. Recolección y acondicionamiento del material vegetal

El material vegetal de *Acanthospermum australe* se adquirió en el circuito comercial de la feria franca de la ciudad de Posadas, en forma de atado, sin rotulación, en estado seco (Figura 1). Posteriormente, se seleccionaron manualmente las partes aéreas de la planta, específicamente hojas y tallos en buen estado. Dicho material se trituró empleando un mortero y un pilón de madera, hasta obtener fragmentos de tamaño reducido y uniforme, adecuados para los procedimientos posteriores (Figura 2). El material triturado se almacenó en bolsas tipo Ziploc protegidas de la humedad y se conservó en un lugar seco, fresco y alejado de la luz directa hasta el momento de su utilización.



Figura 1. Material vegetal “*Acanthospermum australe*”
Nota. Fotografía de autora (2025).



Figura 2. Proceso de trituración del material vegetal con mortero y pilón.
Nota. Fotografía de la autora (2025).

4.2. Obtención del extracto vegetal

El extracto vegetal se obtuvo mediante maceración. Se pesaron 10 g del material vegetal triturado de *Acanthospermum australe* en una balanza digital CARAT SCALE (capacidad de 20 g; sensibilidad de 0,001 g) y se colocaron en un frasco de vidrio color ámbar. Se agregaron 100 mL de metanol como solvente y la mezcla se mantuvo durante siete días, a temperatura ambiente, bajo agitación constante con un agitador magnético modelo AMC20 (Fábrica de Aparatos Científicos S.A.).

Finalizado el período de maceración, el extracto se filtró dos veces mediante un embudo Büchner con papel de filtro, conectado a un matraz Kitasato y una bomba de vacío, con el fin de eliminar los residuos sólidos y obtener un extracto limpio. El filtrado se distribuyó en tres placas de Petri y se llevó a una estufa TECNO-DALVO, modelo BMR, a $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas, hasta lograr la completa evaporación del solvente metanólico y obtener el extracto seco.

Una vez seco, el material fue recuperado mediante raspado con una espátula de acero inoxidable y transferido a un recipiente de pesaje previamente tarado. A continuación, se lo pesó en una balanza digital CARAT SCALE para calcular el rendimiento de la extracción. Finalmente, el extracto seco se transfirió a un frasco de vidrio rotulado y se almacenó en un congelador PHILCO Top Mount PHCT290, a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su posterior utilización en el fraccionamiento y en los ensayos cromatográficos correspondientes.



Figura 3. Maceración del material vegetal con metanol en agitador magnético.
Nota. Fotografía de la autora (2025).



Figura 4. *Filtración del extracto metanólico.*
Nota. Fotografía de autora (2025).

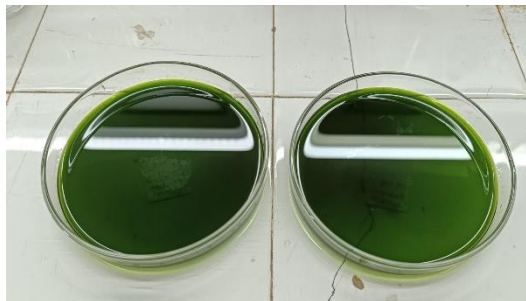


Figura 5. *Extracto metanolico antes de ser colocados en la estufa.*
Nota. Fotografía de la autora (2025).

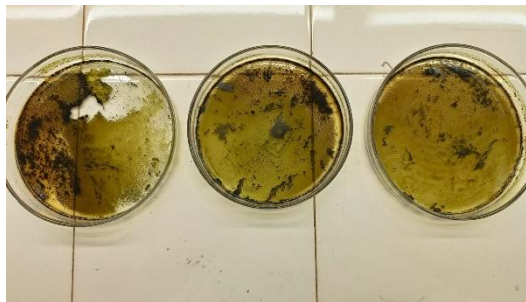


Figura 6. *Obtención de Extracto seco.*
Nota. Fotografía de la autora (2025).

4.3. Puesta a punto de la cromatografía en capa fina (TLC)

Se seleccionó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) como método de separación previo al ensayo autográfico para la detección de compuestos con actividad antioxidante. Para establecer las condiciones óptimas del sistema, se realizaron pruebas preliminares utilizando extracto metanólico de *Acanthospermum australe*, en las que se ensayaron tres fases móviles diferentes, con el objetivo de

seleccionar la que ofreciera la mejor separación de los compuestos presentes en el extracto vegetal.

Para la primera cromatografía se utilizó una alícuota del extracto metanólico crudo obtenido luego del proceso de maceración. Posteriormente, una vez obtenido y raspado el extracto seco, se agregó nuevamente metanol a las placas de Petri que contenían residuos del material, generando un segundo extracto. Este extracto 2 fue conservado en heladera y utilizado para la realización de las dos cromatografías siguientes, así como también para sembrar como patrón en el ensayo cromatográfico final con las fracciones obtenidas por cromatografía en columna.

Se utilizaron placas de sílica gel (Whatman® AlSil G) de $3 \times 12,5$ cm. Las placas se llevaron previamente a estufa TECNO-DALVO, modelo BMR, a $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos, con el fin de eliminar el agua que pudieran contener debido a su característica higroscópica, y así evitar que se alterara la corrida cromatográfica. La siembra del extracto y del patrón rutina se realizó con capilar de vidrio, aplicando manualmente aproximadamente $3\text{ }\mu\text{L}$ de cada uno, en forma de bandas delgadas sobre la línea de siembra, a 1 cm del borde inferior de la placa y con una separación adecuada entre ellas. Primero se sembró el patrón rutina del lado izquierdo y el extracto del lado derecho; ambas fueron identificadas adecuadamente con sus iniciales correspondientes (Figura 7).

Una vez realizadas las siembras, las placas se volvieron a secar en estufa durante aproximadamente 10 minutos.

Posteriormente, se procedió a la preparación de las fases móviles. Para ello, se evaluaron tres sistemas eluyentes con el objetivo de seleccionar la fase móvil que ofreciera la mejor resolución cromatográfica de los compuestos presentes en los extractos.

La fase móvil 1 se preparó respetando la proporción 100:11:11:26 (v/v) de acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glaciado y agua, respectivamente. Para ello, se mezclaron 10 mL de acetato de etilo, 1,1 mL de ácido fórmico, 1,1 mL de ácido acético glaciado y 2,6 mL de agua, obteniendo un volumen total aproximado de 14,8 mL.

La fase móvil 2 se elaboró en una proporción 75:16,5:8,5 (v/v) de cloroformo, acetona y ácido fórmico. Se prepararon 10 mL del sistema mezclando 7,5 mL de cloroformo, 1,65 mL de acetona y 0,85 mL de ácido fórmico.

La fase móvil 3 se formuló en proporción 60:40 (v/v) de cloroformo y acetato de etilo. Para su preparación, se mezclaron 6 mL de cloroformo y 4 mL de acetato de etilo, alcanzando un volumen final de 10 mL.

Previamente a la incorporación de los sistemas eluyentes, las cámaras cromatográficas fueron acondicionadas mediante calentamiento indirecto con un calientador, colocado dentro de la campana extractora de gases, durante aproximadamente 15–20 minutos. Esto permitió crear un ambiente cálido y saturado, favoreciendo una elución más uniforme.

A continuación, se colocaron las fases móviles en sus respectivas cámaras cromatográficas. Estas se taparon y se dejaron reposar durante 20 minutos adicionales para permitir la saturación del ambiente interno con los vapores del sistema eluyente.

Transcurrido este tiempo, se introdujeron las placas de TLC previamente sembradas, asegurándose de que el nivel del disolvente no sobrepasara la línea de aplicación. La elución se llevó a cabo hasta que la fase móvil alcanzó las tres cuartas partes de la longitud de la placa (Figura 8). Luego, se retiraron las placas, se dejaron secar a temperatura ambiente y se protegieron de la luz hasta el revelado.

Todo el procedimiento se realizó bajo campana extractora debido a la toxicidad de los vapores liberados por los solventes utilizados.

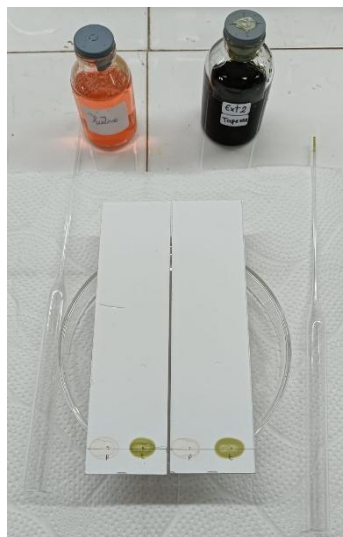


Figura 7. Siembra del patrón y el extracto en placas de cromatografía en capa fina (TLC).

Nota. Fotografía de la autora (2025).

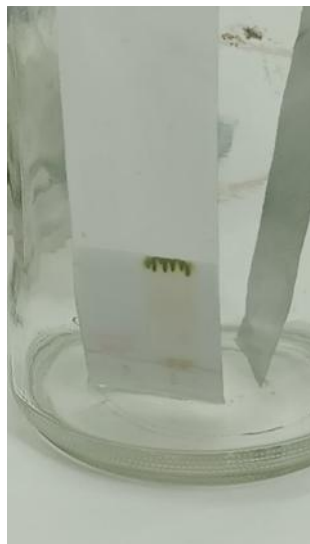


Figura 8. *Corrida cromatográfica en fase móvil 1.*
Nota. Fotografía de la autora (2025).

4.3.1. Determinación del coeficiente de relación de frentes (Rf)

Una vez desarrolladas las placas cromatográficas, se procedió a calcular el coeficiente de relación de frentes (Rf) para cada una de las manchas observadas. Para ello, se midió la distancia desde la línea de siembra hasta el centro de cada banda, y se la dividió por la distancia total recorrida por la fase móvil desde la misma línea de siembra hasta el frente del disolvente. La fórmula utilizada fue:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Los valores de Rf permitieron evaluar la capacidad resolutoria de las distintas fases móviles ensayadas y, además, comparar las bandas obtenidas a partir del extracto con las del patrón rutina sembrado en paralelo, con el fin de disponer de un valor de referencia para la interpretación cromatográfica.

4.3.2. Revelados del cromatograma preliminar

Las placas fueron reveladas mediante dos métodos: físico y químico.

Revelado físico

Consistió en la observación de las placas bajo luz visible y luz ultravioleta a longitudes de onda de 254 nm y 365 nm, utilizando una lámpara UV CAMAG. El

objetivo fue detectar la presencia de compuestos fluorescentes o absorbentes en dichas longitudes de onda.

Revelado químico

Para el revelado químico se empleó el reactivo NP/PEG, también denominado difenilboriloxietilamina–polietilenglicol, específico para flavonoides. El reactivo fue rociado uniformemente sobre la superficie de la placa y, tras el secado a temperatura ambiente, las placas fueron observadas nuevamente bajo luz UV a 365 nm.

4.3.3. Ensayo preliminar de detección antioxidante con ABTS

De manera complementaria al revelado de las placas, se realizó un ensayo de detección antioxidante con el radical catiónico ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) exclusivamente sobre la placa desarrollada con la fase móvil 1. La placa fue rociada con la solución de ABTS^{•+} previamente activada y se dejó en reposo a temperatura ambiente. La visualización de zonas de decoloración permitió confirmar la posibilidad de aplicar este método de detección en etapas posteriores del análisis.

4.4. Cromatografía en columna

Para la separación de compuestos presentes en el extracto, se empleó una cromatografía en columna abierta con fase estacionaria de Sephadex LH-20 y metanol como fase móvil. La muestra de extracto seco, previamente obtenida y conservada en congelación, fue tomada al momento del procedimiento y disuelta en 2 mL de metanol, agitando manualmente hasta su completa disolución.

Previo a la siembra, se dejó correr metanol a través de la columna ya empacada, dejando una fina capa de solvente sobre la superficie del gel, con el fin de evitar su desecación y permitir una aplicación suave y uniforme de la muestra. Luego, se procedió a la siembra del extracto utilizando una pipeta de vidrio larga, aplicando el líquido lentamente por las paredes internas de la columna, procurando que se distribuya de manera uniforme sobre la capa de solvente que cubre la fase

estacionaria. Se dejó reposar durante unos minutos hasta que la muestra fue completamente absorbida por el gel.

A continuación, se cargó metanol como fase móvil mediante una jeringa BREMEN de 60 mL, agregándolo lentamente por las paredes del tubo para evitar alteraciones en el lecho. Una vez incorporado el volumen inicial de fase móvil, se abrió la válvula de la columna, permitiendo el flujo por gravedad. El primer volumen eluido, correspondiente al volumen muerto, fue descartado (Figura 9).

Durante el proceso de elución, se recolectaron 23 fracciones sucesivas en frascos de vidrio rotulados y previamente tarados en una balanza analítica DENVER APX-200 (capacidad máxima: 200 g; sensibilidad: 0,1 mg), con el objetivo de determinar posteriormente el peso seco de cada una de ellas (Figura 10).

Al finalizar la elución, los frascos fueron colocados en la campana de extracción y se dejaron destapados a temperatura ambiente hasta lograr la evaporación completa del solvente (Figura 11). Finalmente, se pesaron nuevamente para obtener el peso seco de cada fracción por diferencia entre el peso del frasco con el residuo seco y el peso del frasco vacío, y a partir de estos datos se calculó el rendimiento total del proceso cromatográfico.



Figura 9. Separación cromatográfica del extracto mediante cromatografía en columna.

Nota. Fotografía de la autora (2025).



Figura 10. *Fracciones obtenidas tras la elución cromatográfica, ordenadas según su recolección secuencial (1 a 23).*
 Nota. Fotografía de la autora (2025).

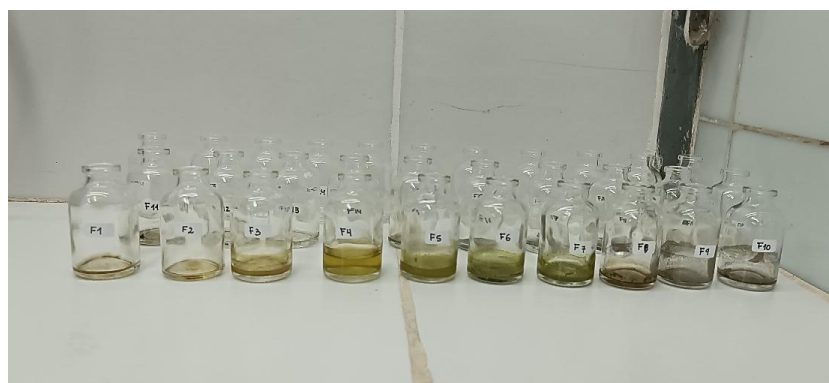


Figura 11. *Fracciones en proceso de evaporación del solvente, tras su recolección por cromatografía en columna.*
 Nota. Fotografía de la autora (2025).

4.5. Cromatografía en capa fina (TLC) definitiva

Con el objetivo de analizar y comparar los perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas, se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) utilizando placas de aluminio recubiertas con sílica gel (Whatman® AlSiil G), de 13 × 13 cm.

Previo a su uso, las placas fueron acondicionadas en una estufa TECNODALVO, modelo BMR, a 50 °C ± 1 °C durante 20 minutos. Paralelamente, se procedió a la reconstitución de las fracciones secas, agregando 1 mL de metanol a cada frasco y agitando manualmente hasta lograr la completa disolución del residuo (Figura 12).

La siembra se efectuó manualmente con capilares de vidrio, depositando aproximadamente 3 µL de cada muestra a 1 cm del borde inferior de la placa. Se

sembró primero el extracto 2 puro como referencia y luego las 23 fracciones en orden creciente según su numeración (Figura 13a y 13b).

Finalizada la siembra, las placas fueron nuevamente secadas en estufa a 50 °C por 10 minutos (Figura 14). Luego, se acondicionó la cámara cromatográfica calentándola previamente y se preparó la fase móvil compuesta por acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial y agua en proporción 100:11:11:26 (v/v/v/v), utilizando los materiales y reactivos mostrados en la Figura 15.

Para desarrollar dos placas en paralelo, se preparó un volumen total de 29,6 mL, dividiéndose 14,8 mL en cada cubeta cromatográfica. La cámara se mantuvo cerrada durante 20 minutos para favorecer su saturación.

Una vez transcurrido ese tiempo, se colocaron las placas dentro de las cubetas para iniciar la corrida cromatográfica (Figura 16). Al finalizar el desarrollo, fueron retiradas y dejadas secar a temperatura ambiente. Posteriormente, una de las placas fue revelada con el reactivo NP/PEG para la detección de flavonoides, y la otra se utilizó para el ensayo autográfico con el radical ABTS•+, a fin de evaluar la capacidad antioxidante de las fracciones.

A continuación, se presentan imágenes ilustrativas del procedimiento experimental.



Figura 12. *Reconstitución de las fracciones secas con metanol.* Fracciones F1 a F12 reconstituidas con 1 mL de metanol, representativas del total recolectado (F1–F23), previo al análisis por cromatografía en capa fina.
Nota. Fotografía de la autora (2025).



Figura 13 (a). *Siembra del extracto patrón y fracciones F1-F12 en placas de TLC.*

Nota. Fotografía de la autora (2025).

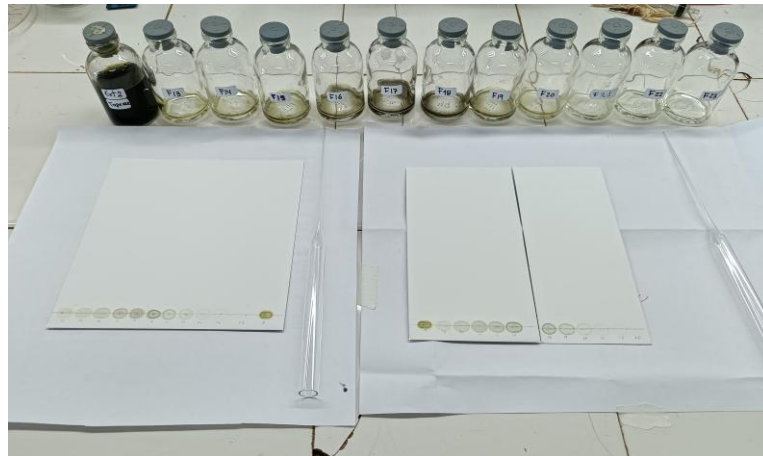


Figura 13 (b). *Siembra del extracto patrón y fracciones F13-F23 en placas de TLC.*

Nota. Fotografía de la autora (2025)



Figura 14. *Placas cromatográficas en proceso de secado en estufa después de la siembra.*

Nota. Fotografía de la autora (2025).



Figura 15. *Reactivos y material utilizado para la preparación de la fase móvil.*
Nota. Fotografía de la autora (2025).



Figura 16. *Corrida cromatográfica de las muestras en cámara de desarrollo saturada.*

Nota. Fotografía de la autora (2025).

4.5.1. Determinación del coeficiente de relación de frentes (R_f)

Para analizar los perfiles cromatográficos de las fracciones recolectadas, se determinaron los coeficientes de relación de frentes (R_f) correspondientes a cada una de las bandas observadas en la cromatografía definitiva. Este cálculo se aplicó exclusivamente a las muestras fraccionadas obtenidas por cromatografía en columna, sembradas junto al extracto 2 utilizado como patrón de referencia.

La medición se realizó considerando la distancia entre la línea de siembra y el centro de cada mancha, dividida por la distancia total recorrida por la fase móvil. Esta relación se expresa mediante la fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Los valores de R_f obtenidos permitieron comparar la movilidad relativa de los compuestos presentes en cada fracción respecto al extracto 2 utilizado como referencia. Esta comparación facilitó la identificación preliminar de zonas cromatográficas con compuestos comunes o diferenciados, según su comportamiento en la fase móvil empleada.

4.5.2. Revelados cromatográficos definitivos

Una vez desarrolladas y secas las placas cromatográficas definitivas, se procedió a su revelado por triplicado, empleando métodos físicos y químicos con el fin de analizar los compuestos presentes en las fracciones obtenidas. A diferencia de los ensayos preliminares realizados durante la puesta a punto, en esta etapa se aplicaron los revelados finales sobre las muestras reales fraccionadas tras la cromatografía en columna.

Revelado físico

Las placas desarrolladas fueron expuestas a luz ultravioleta (UV) a longitudes de onda de 254 nm y 365 nm, utilizando una lámpara UV CAMAG, con el objetivo de detectar compuestos con capacidad de absorber radiación UV o emitir fluorescencia (Figura 17). Esta observación constituyó una primera aproximación cualitativa a la caracterización de los componentes presentes en las fracciones, previa a la aplicación de los reveladores químicos específicos.



Figura 17. Lámpara de luz ultravioleta CAMAG utilizada para la observación de las placas cromatográficas a 254 nm y 366 nm.

Nota. Fotografía de la autora (2025).

Revelado químico con NP/PEG

Una de las placas fue tratada con el reactivo NP/PEG (difenilboriloxietilamina/polietilenglicol), específico para la detección de

flavonoides. El reactivo fue rociado uniformemente sobre la placa, que luego se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se observó bajo luz UV a 365 nm, permitiendo visualizar manchas fluorescentes características.

4.5.3. Ensayo autográfico definitivo de capacidad antioxidante con ABTS

La segunda placa se utilizó para realizar el ensayo autográfico de detección de capacidad antioxidante mediante el radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$. El reactivo fue rociado sobre la superficie de la placa, y, tras el secado a temperatura ambiente, se observaron zonas de decoloración localizadas como indicativo de actividad antioxidante en las fracciones.

5. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos a lo largo del trabajo experimental.

5.1. Obtención del extracto seco y rendimiento del proceso de extracción

A partir de 10 g de droga vegetal seca de *Acanthospermum australe*, se obtuvieron 0,505 g de extracto seco. Este valor se obtuvo por diferencia entre el peso del frasco con extracto seco (3,869 g) y el peso del frasco vacío (3,364 g), según la ecuación:

$$\text{Peso del extracto seco} = 3,869 \text{ g} - 3,364 \text{ g} = 0,505 \text{ g}$$

A partir de este resultado, se calculó el rendimiento del proceso extractivo como el porcentaje de masa obtenida en relación con la masa inicial de droga vegetal seca utilizada. Para ello, se empleó la ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Masa del extracto seco (g)}}{\text{Masa de droga vegetal seca (g)}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{0,505 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100 = 5,05 \%$$

Este valor indica que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, el 5,05 % del material vegetal seco correspondió a compuestos solubles en metanol.

5.2. Puesta a punto de la cromatografía en capa fina (TLC)

Durante esta etapa se evaluaron tres fases móviles con el objetivo de identificar aquella que ofreciera la mejor separación de los compuestos presentes en el extracto metanólico de *Acanthospermum australe*. Asimismo, se verificó la efectividad de los métodos de detección empleados, tanto físicos como químicos.

- **Fase móvil 1** (acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua, 100:11:11:26 v/v/v/v):

Esta fase permitió una separación nítida de múltiples bandas en el extracto, con buena distribución y sin arrastre.

Bajo luz visible, se observaron al menos tres bandas bien definidas en el carril del extracto metanólico, con tonalidades que variaban entre verde pálido y oliva. Las bandas presentaban contornos moderadamente nítidos y se distribuyeron de forma diferenciada (Figura 18).

Bajo luz ultravioleta a 254 nm, no se evidenciaron bandas oscuras definidas, lo que podría deberse a una baja concentración de compuestos absorbentes en dicha longitud de onda o a una señal débil en las condiciones ensayadas (Figura 19).

En cambio, a 365 nm se identificaron manchas fluorescentes de color amarillo-naranja y verde, que se intensificaron notablemente tras el revelado químico con NP/PEG.

En total, se distinguieron seis bandas diferenciadas en el carril del extracto, correspondientes a compuestos con distinta polaridad (Figura 20).

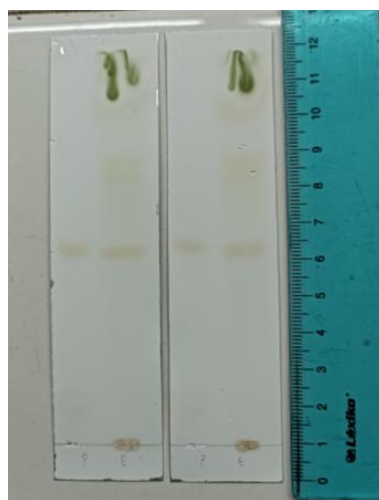


Figura 18. Placas cromatográficas con fase móvil 1, observadas bajo luz visible.
Nota. Fotografía de la autora (2025).

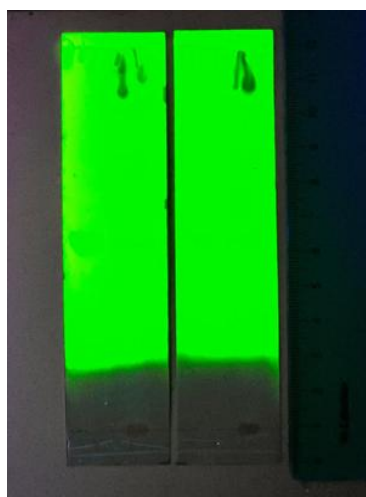


Figura 19. Revelado físico bajo luz UV a 254 nm (fase móvil 1).
Nota. Fotografía de la autora (2025).

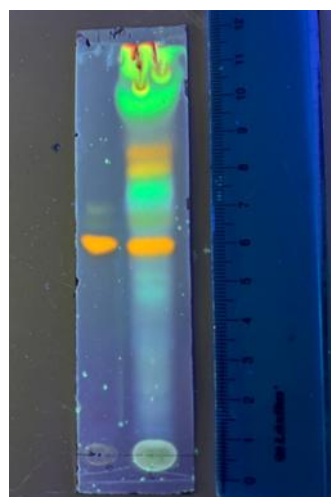


Figura 20. Revelado con NP/PEG bajo luz UV a 365 nm (fase móvil 1).
Nota. Fotografía de la autora (2025).

- **Fase móvil 2** (*cloroformo:acetona:ácido fórmico, 75:16,5:8,5*):

Bajo luz visible, se observó escasa separación de compuestos. El extracto mostró una única banda difusa, con contornos poco definidos (Figura 21). A 254 nm, se evidenciaron al menos dos zonas oscuras en el carril del extracto, una ubicada cerca del centro de la placa y otra más tenue en la región superior. Estas señales sugieren la presencia de compuestos con capacidad de absorber radiación a esta longitud de onda (Figura 22).

A 365 nm, antes del revelado, se observaron fluorescencias naturales tenues, de tonalidad rosada (Figura 23). Tras la aplicación del reactivo NP/PEG, se intensificaron las señales, visualizándose al menos cuatro bandas fluorescentes de color verde, celeste, anaranjado y rosado (figura 24).

Si bien el revelado químico permitió detectar compuestos fluorescentes, la baja resolución cromatográfica limitó la utilidad analítica de esta fase móvil.



Figura 21. Fase móvil 2 bajo luz visible.

Nota. Fotografía de la autora (2025).

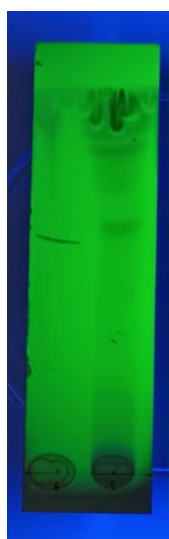


Figura 22. Fase móvil 2 bajo UV a 254 nm.

Nota. Fotografía de la autora (2025).



Figura 23. Fase móvil 2 a 365 nm sin revelado químico.

Nota. Fotografía de la autora (2025).

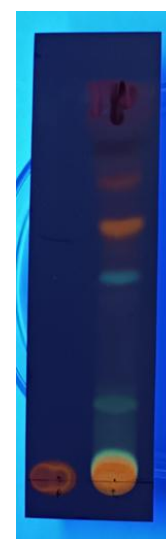


Figura 24. Fase móvil 2 revelada con NP/PEG a 365 nm.

Nota. Fotografía de la autora (2025).

- **Fase móvil 3** (*cloroformo:acetato de etilo, 60:40 v/v*):

En condiciones de luz visible, se evidenció una marcada acumulación del extracto en la zona de siembra, sin migración efectiva. Las bandas no se separaron y se concentraron en la base de la placa (Figura 25).

A 254 nm, se detectaron zonas oscuras poco contrastadas y sin contornos nítidos (Figura 26). A 365 nm, antes del revelado, las fluorescencias naturales fueron débiles (Figura 27). Tras la aplicación del reactivo NP/PEG, se observó una única región fluorescente localizada en la base del carril del extracto, sin separación de compuestos (Figura 28).



Figura 25. Fase móvil 3 bajo luz visible.
Nota. Fotografía de la autora (2025).

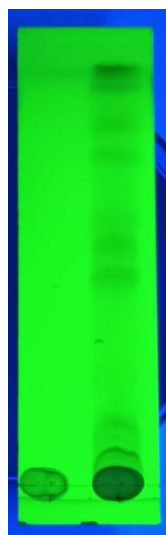


Figura 26. Fase móvil 3 bajo UV a 254 nm.
Nota. Fotografía de la autora (2025).



Figura 27. Fase móvil 3 a 365 nm sin revelado químico.
Nota. Fotografía de la autora (2025).



Figura 28. Fase móvil 3 revelada con NP/PEG a 365 nm.
Nota. Fotografía de la autora (2025).

La fase móvil 1 fue la única que permitió una separación reproducible, con bandas bien definidas y buena respuesta frente a los métodos de detección. En cambio, las fases móviles 2 y 3 mostraron una resolución insuficiente y retención excesiva, lo que limitó su utilidad analítica en este sistema.

5.2.1. Determinación de los valores de Rf en fase móvil seleccionada

En la cromatografía desarrollada con la fase móvil 1 se observaron seis bandas bien definidas en el extracto metanólico de *Acanthospermum australe*. Los valores de Rf obtenidos para el patrón rutina y las bandas del extracto se presentan a continuación en la tabla 2:

Tabla 2. Valores de R_f determinados para el patrón rutina y el extracto metanólico de *Acanthospermum australe* en fase móvil 1

Banda	R_f obtenido
Rutina (patrón)	0,49
Banda 1 (extracto)	0,48
Banda 2 (extracto)	0,53
Banda 3 (extracto)	0,62
Banda 4 (extracto)	0,67
Banda 5 (extracto)	0,72
Banda 6 (extracto)	0,85

Una de las bandas del extracto migró con un valor muy similar al de la rutina ($R_f = 0,48$), lo que sugiere la presencia de un compuesto con comportamiento cromatográfico comparable similar al del patrón.

5.2.2. Ensayo preliminar de capacidad antioxidante del extracto con ABTS

Tras la aplicación del reactivo ABTS^{•+}, se observaron zonas de decoloración netas en diferentes regiones del carril del extracto, indicativas de actividad antioxidante. Estas áreas blanqueadas coincidieron parcialmente con algunas de las bandas fluorescentes detectadas tras el revelado con NP/PEG (Figura 29).

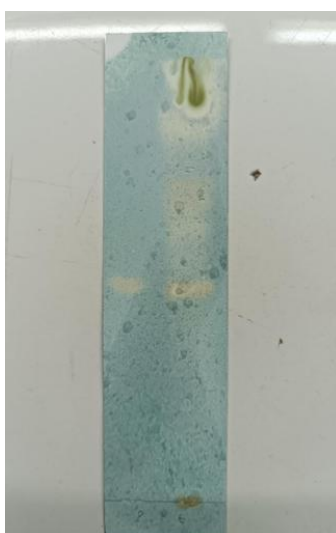


Figura 29. Revelado con ABTS sobre placa cromatográfica desarrollada con fase móvil 1.

Nota. Fotografía de la autora (2025).

5.3. Cromatografía en columna

Mediante esta técnica de separación se obtuvieron 23 fracciones del extracto metanólico de *Acanthospermum australe*, cuyos residuos secos, tras la evaporación del disolvente, fueron pesados individualmente. Los valores de masa obtenidos para cada fracción se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Masa seca de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna

Fracciones	Masa seca de las fracciones (g)
F1	0,0043
F2	0,0064
F3	0,0155
F4	0,0384
F5	0,0667
F6	0,0976
F7	0,0482
F8	0,0231
F9	0,0086
F10	0,0061
F11	0,0043
F12	0,0039
F13	0,0062
F14	0,0062
F15	0,0094
F16	0,0074
F17	0,0059
F18	0,0042
F19	0,0026
F20	0,0016
F21	0,0053
F22	0,0011
F23	0,001
Masa total recuperada (\sum F1–F23)	0,374

Nota. Datos obtenidos por la autora (2025).

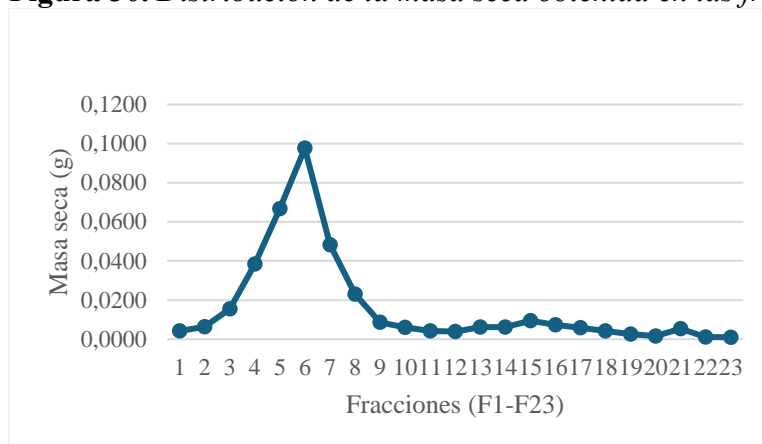
A partir estos valores, se calculó un rendimiento total del proceso cromatográfico del 74,06%, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{0,374 \text{ g}}{0,505 \text{ g}} \times 100 = 74,06\%$$

Además, se realizó una representación gráfica de las fracciones obtenidas en función de sus masas secas individuales, con el fin de visualizar la distribución

del material recuperado tras el fraccionamiento cromatográfico. Esta representación se muestra en la Figura 30.

Figura 30. Distribución de la masa seca obtenida en las fracciones F1–F23



Nota. Datos obtenidos por la autora (2025).

5.4. Cromatografía en capa fina (TLC) definitiva

Las fracciones 11, 12, 14 y 15 fueron identificadas como las de mayor interés, ya que respondieron consistentemente a los distintos métodos de detección de flavonoides. En menor medida, la fracción 13 también mostró resultados compatibles, por lo que fue considerada de interés secundario.

Bajo luz UV a 254 nm, las fracciones 11, 12, 13, 14 y 15 presentaron manchas oscuras definidas, indicativas de absorción de radiación. Esto sugiere la presencia de compuestos con sistemas conjugados capaces de absorber en dicha longitud de onda, compatibles con metabolitos fenólicos como los flavonoides (Figura 31 y 32).

A 365 nm, sin tratamiento químico, se observaron señales fluorescentes tenues en las fracciones 11, 12, 14 y 15. En cambio, las fracciones 9 y 10 mostraron fluorescencias más intensas, pero no reaccionaron al revelado con NP/PEG, por lo que fueron descartadas como posibles fuentes de flavonoides (Figura 33 y 34).

Tras el revelado con el reactivo NP/PEG, las fracciones 11, 12, 14 y 15 presentaron fluorescencias intensas en tonos anaranjados y amarillo-verdosos, compatibles con flavonoides del tipo flavonoles y flavonas, respectivamente.

Además, estas fracciones mostraron bandas con fluorescencias similares en color a las observadas en el extracto puro sembrado como patrón, lo que sugiere la

posible presencia de flavonoides estructuralmente relacionados con los compuestos presentes en dicho extracto (Figura 35 y 36).

La fracción 13, si bien no presentó coincidencia completa en el número de bandas, mostró una banda anaranjada intensa tras el revelado con NP/PEG y absorbancia visible a 254 nm, lo que sugiere la posible presencia de un flavonoide estructuralmente relacionado con alguno de los presentes en el extracto patrón, o bien de otro compuesto con propiedades cromatográficas similares.

Las fracciones 16 y 17 tampoco presentaron coincidencia completa con las bandas del patrón, evidenciando únicamente una fluorescencia verde tras el revelado químico. Sin embargo, no mostraron absorción visible a 254 nm, lo que sugiere la presencia de compuestos con actividad antioxidante, aunque no necesariamente flavonoides.

A continuación, se presentan las imágenes de las placas reveladas y la tabla 4 comparativa de valores de Rf y número de bandas.

Nota. Las fracciones 1–12 y 13–23 fueron sembradas en placas cromatográficas independientes y sometidas por separado a cada uno de los métodos de detección. No obstante, las imágenes se presentan agrupadas por tipo de revelado (UV 254 nm, UV 365 nm y NP/PEG), con el fin de facilitar la comparación visual entre las fracciones.

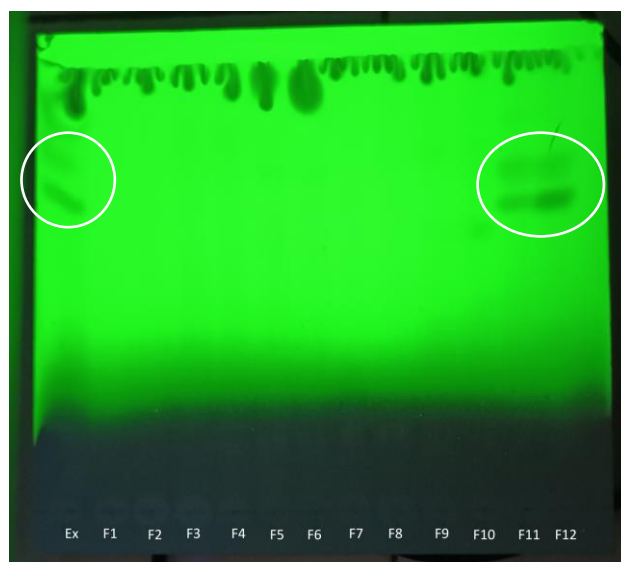


Figura 31. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 1–12, observada bajo luz UV a 254 nm, sin revelado químico (placa 1).

Nota. Fotografía de la autora (2025). Las zonas marcadas corresponden a bandas con absorción de radiación, indicativas de compuestos con sistemas conjugados.

La zona de la izquierda pertenece al extracto patrón, y la de la derecha a las fracciones 11 y 12.

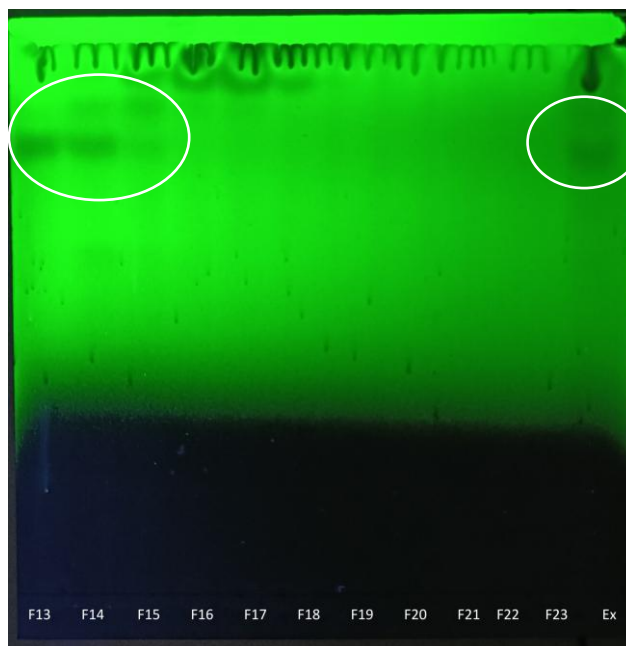


Figura 32. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 13–23, observada bajo luz UV a 254 nm, sin revelado químico (placa 2).

Nota. Fotografía de la autora (2025). Las zonas marcadas corresponden a bandas con absorción de radiación, indicativas de compuestos con sistemas conjugados.

La zona de la derecha corresponde al extracto patrón, y la de la izquierda a las fracciones 13,14 y 15.

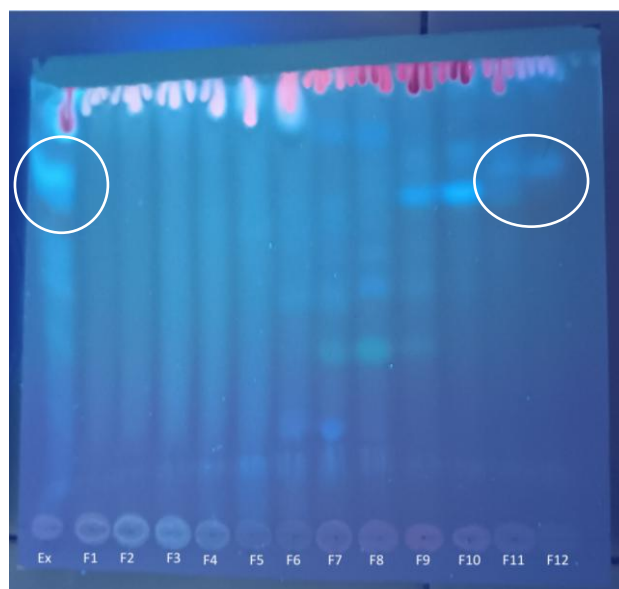


Figura 33. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 1-12, observada bajo luz UV a 365 nm, sin revelado químico (placa 1).

Nota. Fotografía de la autora (2025). Las zonas marcadas corresponden a fluorescencias tenues observadas en el extracto patrón (izquierda) y derecha las fracciones 11 y 12.

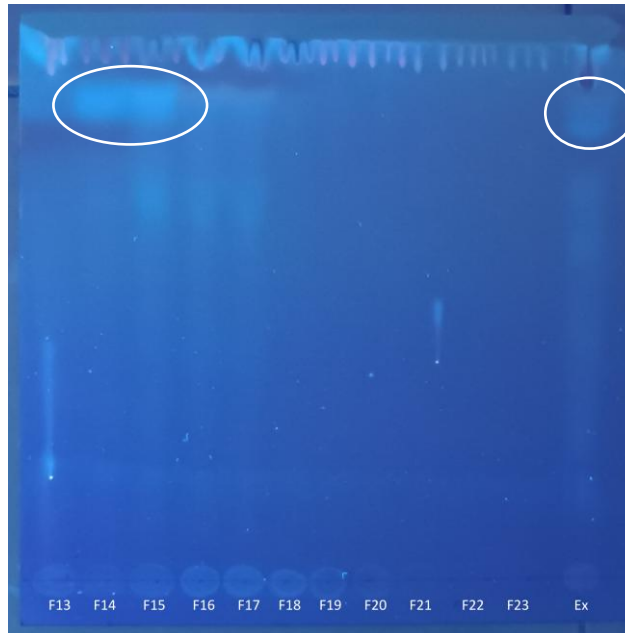


Figura 34. *Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 13–23, observada bajo luz UV a 365 nm, sin revelado químico (placa 2).*

Nota. Fotografía de la autora (2025). Las zonas marcadas corresponden a fluorescencias observadas en las fracciones 14 y 15, y en el extracto patrón, cuya señal fue tenue y difusa, aunque se tomó como referencia para la comparación cromatográfica.

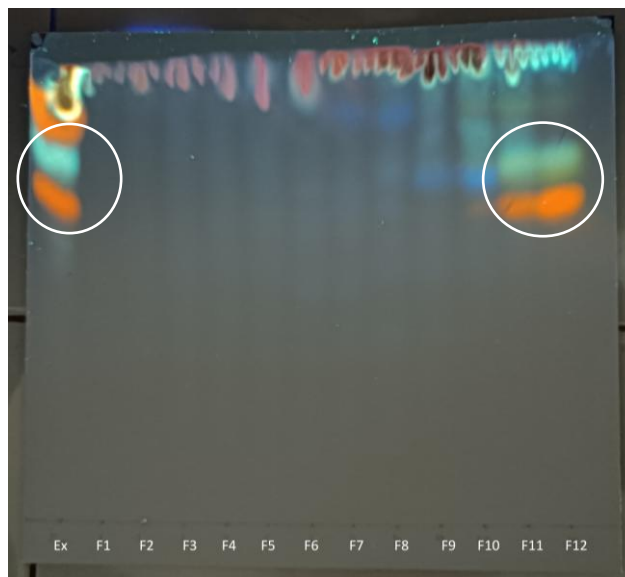


Figura 35. *Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 1–12 revelada con NP/PEG y observada bajo luz UV a 365 nm (placa 1).*

Nota. Fotografía de la autora (2025). Las zonas marcadas muestran bandas fluorescentes observadas en el extracto patrón (izquierda) y en las fracciones 11 y 12 (derecha).

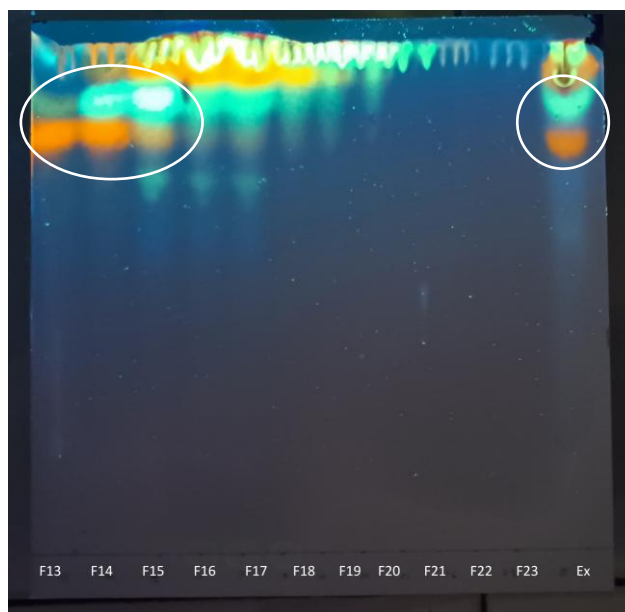


Figura 36. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 13–23 revelada con NP/PEG y observada bajo luz UV a 365 nm (placa 2).

Nota. Fotografía de la autora (2025). Las zonas marcadas corresponden a fluorescencias observadas en las fracciones 13, 14 y 15 (a la izquierda) y en el extracto patrón (a la derecha).

Tabla 4. Valores de R_f y número de bandas obtenidas para el extracto patrón y las fracciones seleccionadas en ambas placas cromatográficas.

Placa 1		
Muestras	Nº de Bandas	R_f
Patrón (Extracto 2)	2	0,67 y 0,76
Fracción 11	2	0,65 y 0,74
Fracción 12	2	0,66 y 0,74
Placa 2		
Muestras	Nº de Bandas	R_f
Patrón (Extracto 2)	2	0,78 y 0,85
Fracción 13	1	0,80
Fracción 14	2	0,80 y 0,87
Fracción 15	2	0,79 y 0,87
Fracción 16	1	0,87
Fracción 17	1	0,87

Nota. Dado que las fracciones F1–F23 se sembraron en dos placas cromatográficas distintas (placa 1: F1–F12; placa 2: F13–F23), cada una acompañada por el extracto patrón correspondiente, los valores de R_f y número de bandas se consignan por separado según la placa utilizada.

5.4.1. Ensayo autográfico definitivo de capacidad antioxidante con ABTS

El ensayo de detección antioxidante mediante el radical catiónico ABTS^{•+} evidenció zonas de decoloración sobre las placas cromatográficas, indicativas de actividad antioxidante en diversas fracciones. Las fracciones 11, 12, 13, 14 y 15 presentaron zonas decoloradas bien definidas, de tonalidad amarillenta o blanquecina, coincidentes con las bandas previamente reveladas como posibles flavonoides mediante NP/PEG.

Las fracciones 16 y 17 también mostraron zonas de decoloración; sin embargo, en los análisis previos no exhibieron características típicas de flavonoides, lo que sugiere la presencia de otros compuestos con capacidad antioxidante.

El extracto patrón mostró actividad antioxidante en la placa correspondiente a las fracciones 1–12, mientras que en la corrida de las fracciones 13–23 no se observó decoloración en su posición, hecho que podría atribuirse a variaciones en la siembra. En conjunto, los resultados indican que tanto el extracto metanólico de *Acanthospermum australe* como las fracciones 11, 12, 13, 14 y 15 poseen actividad antioxidante, como se observa en las Figuras 37 y 38.

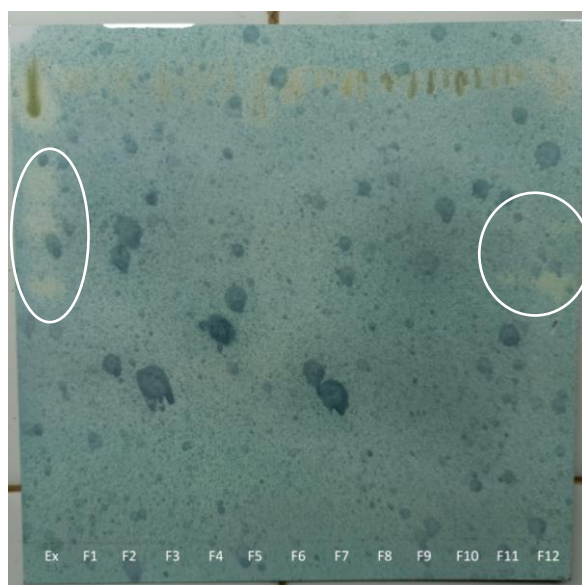


Figura 37. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 1–12 reveladas con ABTS (placa 1).

Nota. Fotografía de la autora (2025). Las zonas marcadas con círculos indican regiones donde se observó decoloración del fondo azul, compatible con capacidad antioxidante. La izquierda corresponde al extracto patrón, y la derecha a las fracciones 11 y 12.

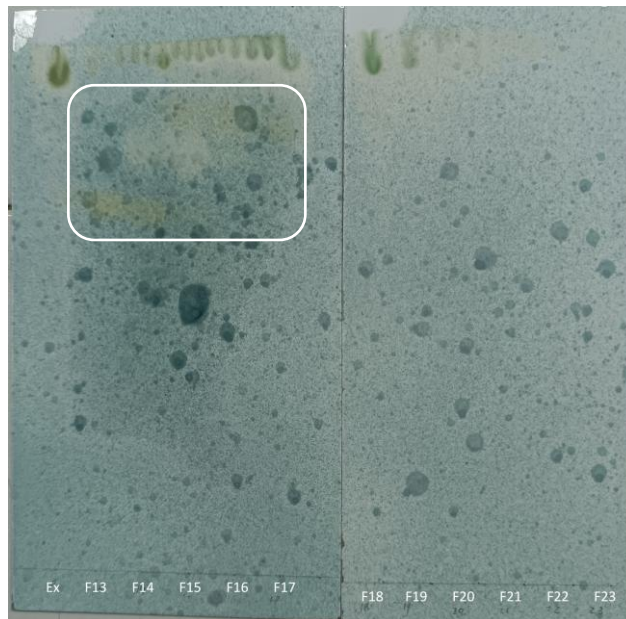


Figura 38. *Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones 13–23 reveladas con ABTS (placa 2).*

Nota. Fotografía de la autora (2025).

6. DISCUSIÓN

El rendimiento de extracción metanólica obtenido en el presente estudio (5,05 %) fue similar al reportado para la raíz de *Acanthospermum hispidum* (8,30 %) en un estudio que empleó el método Soxhlet, según Jiya et al. (2020), lo que indica cierta coincidencia en el orden de magnitud de los valores, a pesar de las diferencias en la especie, la parte utilizada de la planta y el método aplicado. En este trabajo se empleó el método de maceración para la obtención del extracto, técnica sencilla y de bajo costo que, al realizarse a temperatura ambiente, evita la degradación de compuestos termolábiles. Como limitación, requiere tiempos prolongados de extracción y un rendimiento relativamente menor al obtenido mediante métodos continuos como Soxhlet, aunque resulta más adecuada para preservar la integridad química del extracto (Zhang et al., 2023).

En relación con la naturaleza de los metabolitos extraídos en este trabajo, se reconoce que los flavonoides pueden encontrarse como heterósidos o como agliconas libres, siendo los primeros (flavonoides unidos a un azúcar) la forma más frecuente en las plantas (Trease & Evans, 2009; Kuklinski, 2012). Además, una misma aglicona puede presentarse en diferentes combinaciones glicosídicas, lo que incrementa la diversidad de perfiles flavonoídicos observados (Harborne, 1998).

Estas características estructurales tienen implicancias directas en la solubilidad: mientras que las agliconas son prácticamente insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos polares como metanol y etanol, así como en apolares como éter y cloroformo, los glucósidos presentan buena solubilidad en agua y en mezclas hidroalcohólicas, resultando insolubles en disolventes orgánicos apolares (Kuklinski, 2012). En este estudio, al emplearse maceración con metanol, es probable que se hayan extraído tanto agliconas como heterósidos, aunque con predominio de estos últimos, lo cual concuerda con su abundancia natural y con la afinidad del disolvente utilizado. Esta interpretación se ve reforzada por el análisis cromatográfico, dado que la fase móvil empleada (acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua) ha sido recomendada en la literatura para la separación de glucósidos flavonoides por TLC (Wagner et al., 1984) y, en nuestro caso, permitió visualizar perfiles compatibles con este tipo de compuestos.

Para validar la metodología cromatográfica empleada, inicialmente se realizó una corrida preliminar utilizando rutina como patrón de referencia. Este

control positivo permitió confirmar que las condiciones seleccionadas de fase móvil y revelado eran adecuadas para la detección de flavonoides. Una vez comprobado esto, el análisis se centró en el extracto metanólico puro y en las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna, donde se observaron fluorescencias y coloraciones características en UV y con el reactivo NP/PEG, compatibles con la presencia de compuestos flavonoides.

Una vez confirmado lo anterior, el análisis cromatográfico definitivo sobre las fracciones y el extracto puro sembrado como patrón permitió evidenciar fluorescencias y coloraciones características tras el revelado con NP/PEG. Este reactivo es ampliamente reconocido en la literatura como sensible y característico para flavonoides, ya que genera fluorescencias intensas cuya tonalidad depende de la estructura del núcleo flavonoide (Wagner et al., 1984).

De acuerdo con estos autores, fluorescencias anaranjadas suelen asociarse a flavonoles como los glucósidos de quercetina y miricetina, así como a flavonas como los glucósidos de luteolina; mientras que fluorescencias verde-amarillentas corresponden a flavonoles como los glucósidos de kaempferol e isoramnetina, o bien a flavonas como los glucósidos de apigenina. Estos patrones descritos en la literatura concuerdan con las observaciones realizadas en el presente estudio, lo que respalda la hipótesis de que los compuestos observados son compatibles con perfiles flavonoídicos.

No obstante, debe tenerse en cuenta que, de manera general, otros metabolitos secundarios de origen vegetal, como las cumarinas, también pueden exhibir fluorescencias bajo estas condiciones. En particular, se ha reportado que las cumarinas pueden presentar fluorescencias de color azul o azul-verdoso cuando se revelan con NP/PEG, aunque por lo general con menor intensidad que los flavonoides (Sampietro et al., 2009). Por lo tanto, si bien en este estudio la intensidad y el espectro de coloración observados respaldan la hipótesis de que los compuestos mayoritarios son flavonoides, no puede afirmarse con certeza su identidad únicamente sobre la base de este ensayo. En consecuencia, sería recomendable complementar estos resultados con técnicas más específicas; por ejemplo, el HPLC puede aportar información comparativa de perfiles cromatográficos, mientras que métodos como LC-MS o RMN resultan esenciales para confirmar de manera definitiva la naturaleza de los metabolitos detectados.

La elección del ensayo autográfico con ABTS en cromatografía en capa fina (TLC) se fundamenta en su capacidad para asociar la bioactividad antioxidante con bandas cromatográficas específicas, lo que representa una ventaja frente a métodos espectrofotométricos en solución como DPPH o FRAP. Estos últimos permiten cuantificar la actividad global de un extracto, pero no brindan información sobre qué compuestos individuales son responsables de la respuesta observada. En contraste, el ensayo con ABTS aporta un análisis preliminar más dirigido, especialmente útil en matrices complejas como los extractos vegetales (Kuskoski et al., 2005).

Sin embargo, debe señalarse que se trata de una técnica fundamentalmente cualitativa. La decoloración del radical $ABTS^{\bullet+}$ no refleja de manera estrictamente proporcional la potencia antioxidante, y la señal puede estar influenciada por factores como la concentración localizada de los metabolitos o la presencia de compuestos fenólicos distintos a los flavonoides. En este sentido, el método debe considerarse como un primer acercamiento exploratorio: ofrece rapidez y bajo costo, pero requiere ser complementado con ensayos cuantitativos en solución y con técnicas instrumentales más específicas, como HPLC o LC-MS, que permitan confirmar la identidad y cuantificar los compuestos activos (Tovar del Río, 2013).

De este modo, la pertinencia del ensayo autográfico radica en su valor como herramienta de tamizaje. En el caso de extractos poco estudiados, como *Acanthospermum australe*, constituye una estrategia confiable para la detección preliminar de fracciones bioactivas y establece la base para investigaciones posteriores orientadas a la caracterización estructural y a la evaluación cuantitativa de su potencial antioxidante.

En concordancia con lo observado, estudios previos han demostrado que *Acanthospermum australe* presenta actividad antioxidante evaluada frente al radical DPPH (Ramírez Garay, 2019), lo que resulta concordante con los resultados obtenidos en el presente trabajo mediante el ensayo autográfico con ABTS en TLC. Asimismo, Rocha Ferro et al. (2024) reportaron la presencia de flavonoides en *A. australe*, hallazgo que coincide con las observaciones realizadas en este estudio. De manera complementaria, en otra especie del mismo género, *Acanthospermum hispidum*, también se verificó una elevada actividad antioxidante, similar a la reportada por Ramírez Garay en *A. australe* (Hilou et al., 2018).

Sin embargo, algunos reportes previos han descrito resultados diferentes. En el estudio de Thangiah et al. (2013), se realizó un tamizaje fitoquímico preliminar del extracto metanólico y acuoso de hojas de *Acanthospermum australe*. Los autores reportaron la presencia de metabolitos secundarios como taninos, saponinas, terpenoides, fenoles, alcaloides y compuestos con anillos esteroídicos; sin embargo, indicaron que los flavonoides y los esteroides se encontraban ausentes en el material analizado.

Las diferencias en los resultados podrían atribuirse principalmente a la sensibilidad y especificidad de las metodologías empleadas. El ensayo colorimétrico preliminar aplicado por Thangiah et al. consistió en mezclar el extracto acuoso con amoníaco diluido y ácido sulfúrico concentrado, considerando como reacción positiva un viraje de color. Sin embargo, en su estudio no se observó dicha reacción, lo que llevó a reportar ausencia de flavonoides. Este método inespecífico puede verse limitado por la baja concentración de compuestos, la presencia de interferentes o incluso por la degradación térmica o química durante la preparación del extracto. En cambio, la metodología utilizada en este trabajo, basada en TLC con revelado fluorescente (NP/PEG, UV 365 nm), permite una visualización más precisa y selectiva de compuestos fenólicos flavonoides, incluso en cantidades traza, gracias a la interacción del reactivo con los grupos hidroxilos característicos de estas moléculas. En síntesis, los resultados aquí obtenidos aportan evidencia experimental de que *Acanthospermum australe* sí contiene flavonoides, lo que pone de manifiesto la importancia de emplear métodos de detección más adecuados y sensibles para una caracterización fitoquímica precisa de la especie.

En línea con esta interpretación, otros antecedentes señalan que en las partes aéreas de *Acanthospermum australe* se han aislado flavonoides y se ha reportado actividad antioxidante (Silva, 2024; Desmarchelier et al., 1997). Estos hallazgos se corresponden con los resultados del presente trabajo, donde en el extracto crudo y fracciones de las partes aéreas se detectaron flavonoides por TLC (NP/PEG, UV 365 nm) y se confirmó su capacidad antioxidante mediante el ensayo autográfico con ABTS, reforzando el potencial bioactivo de la especie.

A futuro, se recomienda complementar los análisis cualitativos realizados en este trabajo con estudios cuantitativos de la actividad antioxidante mediante espectrofotometría (por ejemplo, DPPH), así como avanzar en la elucidación de la

identidad molecular de los metabolitos secundarios activos mediante técnicas como HPLC-MS.

7. CONCLUSIÓN

- En conclusión, el ensayo autográfico se mostró como un método rápido, económico, confiable y reproducible para la determinación cualitativa de la capacidad antioxidante del extracto de *Acanthospermum australe*.
- La combinación de técnicas cromatográficas permitió relacionar parcialmente los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante con la presencia de compuestos polifenólicos.
- La cromatografía en columna con Sephadex LH-20 permitió obtener 23 fracciones, lo que permitió un análisis diferenciado de los componentes del extracto. Los ensayos cromatográficos y los revelados con NP/PEG y luz UV sugieren la presencia de flavonoides en el extracto y en fracciones específicas, lo que resalta su interés como posibles metabolitos antioxidantes de la especie.
- Entre las fracciones analizadas, las F11, F12, F14 y F15 resultaron de mayor interés por reproducir el perfil cromatográfico del extracto y presentar valores de Rf compatibles con el patrón, lo que respalda su consideración como candidatas principales a contener flavonoides asociados a la actividad antioxidante.
- La fracción 13, en cambio, presentó una única coincidencia parcial ($R_f = 0,80$), lo que la ubica como de interés secundario, con posibilidad de corresponder a uno de los flavonoides presentes en el extracto, aunque sin coincidencia completa de bandas.
- Las fracciones 16 y 17 también evidenciaron actividad antioxidante, aunque sin características típicas de flavonoides, lo que sugiere la presencia de otros metabolitos con capacidad reductora.
- En conjunto, los resultados obtenidos permiten considerar a *Acanthospermum australe* como una fuente promisorio de metabolitos antioxidantes, constituyendo una base para futuras investigaciones sobre el potencial bioactivo de la especie.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adati, R. T. (2006). *Estudo biofarmacognóstico de Acanthospermum australe (Loefl.) O. Kuntze (Asteraceae)* [Tese de doutorado, Universidade de São Paulo]. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP.
- Altamirano, C. G. (2019). *Evaluación de la genotoxicidad y toxicidad general de extractos acuosos de Acanthospermum australe Loefl. Kuntze (Asteraceae) por medio de la prueba de Allium cepa. Dominguezia, 35(2).* <https://www.dominguezia.org/volumen/35200.pdf>
- Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society, 181(1)*, 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Barboza, G. E., Cantero, J. J., 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(1–2), 7–365.* https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-59622009000100002
- Bardón, A., Catalán, C. A. N., Díaz, J., & Herz, W. (2009). Melampolides from Argentinean *Acanthospermum australe*. *Phytochemistry Letters, 2(1)*, 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2008.12.007>
- Barlow, S. M. (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. En B. J. F. Hudson (Ed.), *Food Antioxidants* (pp. 253–307). Elsevier Applied Science. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0753-9_7

- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants* (2nd ed.). Wiley Blackwell.
- Castro, L. C., Sauter, I. P., Ethur, E. M., Kauffmann, C., Dall'Agnol, R., Souza, J., Cibulski, S. P., Muniz, A. W., Weidlich, L., Lohmann, P. M., Roehe, P. M., Germani, J. C., Rott, M. B., & Vand Der Sand, S. T. (2013). *In vitro effect of Acanthospermum australe (Asteraceae) extracts on Acanthamoeba polyphaga trophozoites*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15(4), 589–594. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000400016>
- Challem, J., & Block, M. (2008). *Antioxidantes naturales: Cómo reducir el riesgo de cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares*. Ediciones Nowtilus.
- Corzo, A. G. (2019). *Técnicas de análisis en química orgánica: Cromatografía*. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Facultad de Ciencias Forestales. <https://fcf.unse.edu.ar/archivos/series-didacticas/SD-44-Cromatografia-CORZO.pdf>
- Farmacopea Argentina. (2013). *Farmacopea Argentina* (7ma ed., Vol. IV). Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). <https://www.argentina.gob.ar/anmat/farmacopea-argentina>
- Farmacopea Argentina. (2023). *Segundo suplemento*. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/farmacopea_-_segundo_suplemento_farmacopea.pdf

- Flora Argentina. (s.f.). *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze. Instituto de Botánica Darwinion. Recuperado el 19 de junio de 2025, de <http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/361>
- Harborne, J. B. (1984). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis* (2nd ed.). Chapman and Hall.
- Hilou, A., N'Do, J. Y.-p., Ouedraogo, N., Sombie, E. N., & Traore, T. K. (2018). *Phytochemistry, antioxidant, and hepatoprotective potential of Acanthospermum hispidum DC extracts against diethylnitrosamine-induced hepatotoxicity in rats. Medicines, 5(2), 42.* <https://doi.org/10.3390/medicines5020042>
- Jiya, A. H., Buhari, H., Abdulkadir, S., & Zayyanu, M. A. (2020). *In vitro antibacterial activity and phytochemical screening of root extracts of Acanthospermum hispidum (Asteraceae).* International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR), 53(2), 1–13.
- Khan, N., Bagade, M. V., Giri, M. R., & Bhojar, L. A. (2023). The study of natural antioxidants in human health and diseases. *International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology, 3(2), 266–276.* <https://doi.org/10.48175/IJARSCT-14233>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, 25(4), 726–732.* <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Leicach, S. R., Sampietro, D. A., & Narwal, S. S. (2009). *Allelochemicals: Role in plant–environment interactions.* Studium Press.

- Martins, L. R. R., Mourão, K. S. M., Albiero, A. L. M., Garcia Cortez, D. A., Dias-Filho, B. P., & Nakamura, C. V. (2006). *Estudo morfoanatômico preliminar do caule e da folha de Acanthospermum australe (Loefl.) Kuntze (Asteraceae–Heliantheae)*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1), 42–52. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100009>
- Méndez, A. M., Penieres Carrillo, J. G., & Ortega Jiménez, F. (2023). *Cromatografía en capa fina y columna*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. <https://ru.cuautitlan.unam.mx/retrieve/16449c20-525d-4885-8526-9b526f0e937b>
- Organización Mundial de la Salud. (2002). *Directrices sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales (BPAR)*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42783>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Ramírez Garay, E. L. (2019). Cuantificación de compuestos fenólicos totales, taninos totales y actividad antioxidante de dos plantas medicinales del Paraguay: Tapekue (*Acanthospermum australe*) y Ñandypa (*Genipa americana* L.). *Revista sobre Estudios e Investigaciones del Saber Académico*, (13), 15–21. <https://doi.org/10.70833/rseisa13item186>
- Rocha Ferro, T. V., Othmar, F. de S., Nunes, D. M., Pontes, M. M., Rodrigues, N. E. R., Souza, P. H. S., & Nunes, A. T. (2024). Perfil fitoquímico e atividade antioxidante de plantas medicinais do Castainho - PE. *Revista Aracê*, 6(4), 11877–11890. <https://doi.org/10.56238/arev6n4-059>

- Rodríguez-Burbano, M. T. (Ed.). (2005). *Methods in phytochemistry*. Taylor & Francis.
- Sabini, M. C., Menis Candela, F., & Beoletto, V. (2019). Historia de las plantas medicinales. En E. Reinoso (Ed.), *Una farmacia en el monte: Plantas medicinales del Chaco y su utilización* (pp. 11–20). Fundación Proteger. https://www.researchgate.net/publication/368684764_Una_farmacia_en_el_monte
- Sampietro, D. A., Catalán, C. A. N., & Vattuone, M. A. (Eds.). (2009). *Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products*. Science Publishers.
- Sgariglia, M. A., Soberón, J. R., Sampietro, D. A., & Vattuone, M. A. (2010). Cromatografía: conceptos y aplicaciones. *Revista Arakuku*, 2(1), 1–6. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/75465>
- Silva, A. dos S. (2024). *Fitoquímica e bioatividade de Acanthospermum australe (Loefl.) Kuntze (carrapicho): uma revisão sistemática* [Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto Federal de Goiás]. Repositório IFG. <https://repositorio.ifg.edu.br/bitstream/prefix/2178/1/TCC%20Alessandra.pdf>
- Thangiah, A. S., & Ngule, M. C. (2013). Preliminary phytochemical screening of methanolic–aqua extract of *Acanthospermum australe* leaves. *International Journal of Bioassays*, 2(11), 1434–1439. <https://www.ijbio.com/articles/preliminary-phytochemical-screening-of-methanolic-aqua-extract-of-acanthospermum-australe-leaves.pdf>

- Tovar del Río, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera* [Trabajo de grado, Universidad Tecnológica de Pereira]. Repositorio Institucional UTP. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/28bb3599-16cd-4c41-9c48-0a0dc4a9b5e2/content>
- Wagner, H., Bladt, S., & Zgainski, E. M. (1984). *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas* (Th. A. Scott, Trans.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Zhang, M., Zhao, J., Dai, X., & Li, X. (2023). Extraction and analysis of chemical compositions of natural products and plants. *Separations*, 10(12), 598. <https://doi.org/10.3390/separations10120598>
- Zhou, Y. (2015). *Investigation of flavonoids and polyphenolic antioxidants from plants* [Tesis doctoral, The University of Hong Kong]. HKU Scholars Hub. https://doi.org/10.5353/th_b5689346

**Formulario de autorización de depósito de tesis/trabajo final integrador en la
 Comunidad Ciencias Médicas y de la Salud del RIDUNaM
 (Repositorio Institucional Digital de la UNaM)**

Por intermedio de la presente, el abajo firmante, AUTOR de la Tesis/TFI (Grado) titulada/o
**"Ensayo autográfico para la detección rápida de la capacidad antioxidante de extractos de
 Acanthospermum austral."**

Da FE de la autoría y originalidad de la obra mencionada, que fue dirigida por Director: Dr.
 Altamirano, Carlos Gustavo.

Presentada y defendida en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad
 Nacional de Misiones (FCEQyN-UNaM), el (fecha) 29/09/2029 , Acta/Expdte. N°196854 con el fin de
 obtener el título de FARMACÉUTICO.

Tildar según corresponda

- Tesis de Posgrado
 Doctorado Maestría Trabajo Final Integrador
 Tesis de Grado

Derechos patrimoniales

Como autor, expreso mi conformidad en cuanto a la cesión gratuita de los derechos de reproducción y
 circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la FXX-UNaM. Dicha reproducción y
 circulación se podrá realizar, una o varias veces, en cualquier soporte, para todo el mundo, con fines
 sociales, educativos y científicos.





En virtud del carácter no exclusivo de esta cesión, el autor podrá reproducir y comunicar libremente la
 tesis o trabajo final integrador, a través de los medios que estime oportunos.

Condiciones de acceso en línea

- Autorizo el depósito de la tesis o trabajo final integrador en forma inmediata
 Autorizo el depósito del documento con embargo por el plazo de _____ meses a partir de la
 defensa de la misma.

Condiciones de uso de la tesis/TFI

Será puesta a disposición pública bajo las siguientes condiciones de uso:

	(BY) Atribución — Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciente (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o que apoyan el uso que hace de su obra).
	(NC) No Comercial — No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
	(SA) Permite trabajos derivados — Siempre que se mantenga la misma licencia.
	Reconocimiento - NoComercial - CompartirIgual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

Referencias:
 CC (Licencias Creative Commons).

BY (Atribución).
 NC (No comercial).
 SA (Compartir igual).

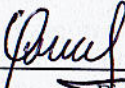
Dados personales (llenar un cuadro por cada autor)

Apellido y Nombres	Silva, Victoria Anahi
Teléfono/Celular	3765034811
Correo electrónico	victoria.sil198@gmail.com

Apellido y Nombres	Altamirano Carlos Gustavo
Teléfono/Celular	3764129898
Correo electrónico	cgaltamirano@fceqyn.unam.edu.ar

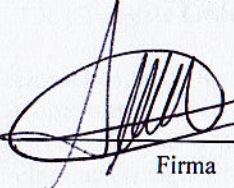
Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Se firma la presente en la Ciudad de Posadas a los 29 días del mes de Septiembre de 2025.-


 Firma

41335474
 Tipo y N° Documento

Silva Victoria Anahi
 Aclaración


 Firma

DM 3233071
 Tipo y N° Documento

ALTAMIRANO CARLOS GUSTAVO
 Aclaración

 Firma

 Tipo y N° Documento

 Aclaración