

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

Estudiante
Lesley Ruth Hartge

Farmacobotánica de *Nicotiana glauca* (Solanaceae). Especie con posible aplicación farmacéutica en formulaciones tópicas

**Trabajo final presentado para obtener el título de grado
“Farmacéutico”**

Director
Dr. Carlos Gustavo Altamirano
Co-Directora
Farm. María Belén López

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/>



**TRABAJO FINAL PARA ACCEDER AL TÍTULO DE GRADO DE
FARMACÉUTICO.**

“Farmacobotánica de *Nicotiana glauca* (Solanaceae). Especie con posible aplicación farmacéutica en formulaciones tópicas”.

Cátedra: Práctica Profesional Farmacéutica.

Carrera: Farmacia.

Alumna: Hartge, Lesley Ruth.

Cel:3743499344

Correo: lhfacultad@gmail.com

Director: Dr. Altamirano, Carlos Gustavo.

Co-Director: López, Maria Belén.

Lugar de desarrollo:

Laboratorio de Farmacobotánica “ Dr. Aníbal Amat ” 5to piso, laboratorio 21.
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Félix de Azara 1552
(3300) Posadas, Misiones, Argentina. 2025.

La metodología del presente trabajo está enmarcada 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 16Q2399-TI.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la fortaleza y por siempre iluminar mi camino en la carrera día a día.

A mis papás Rosalía y Noli por darme la oportunidad de estudiar, por estar siempre a mi lado, confiar en mí y apoyarme en todo. Gracias por tanto cariño.

A mi hermano por ser un pilar para mí, aconsejarme y no permitir que me rinda en estos años, por escucharme cada vez que lo necesite y por tu apoyo incondicional.

A mi familia, por todo el apoyo y el cariño brindado durante todos estos años. Principalmente a mis tías Gisela, Marlise y Bruni por escucharme y estar siempre.

A mi novio Josias, por estar a mi lado en este último trayecto, por escucharme, por tus consejos y paciencia.

A mis ángeles, que desde donde quiera que estén sé que guían mi camino constantemente.

A los amigos que hice en el trayecto, que siempre están para mí, alentándome y ayudándome, gracias por su amistad.

A mis facuamigos, por hacer que sea mucho más leve el camino recorrido durante estos años, gracias por todo lo que hicieron por mí. Principalmente a mis compañeros de quinto gracias por las risas, cada mate y apunte compartido, por las horas de estudio y por hacer de un buen recuerdo estos últimos años de facultad.

A mi director y a mi co- directora Carlos Altamirano y López Belén, por su dedicación desde el primer día, paciencia y confianza, gracias por los buenos momentos en el laboratorio.

A toda la catedra de Farmacobotánica que me dieron un lugarcito para poder realizar las experiencias de mi trabajo y siempre ayudarme en todo.

A la Facultad de ciencias Exactas, Químicas y Naturales a todos los profesores de la carrera, por sus enseñanzas y la formación estos años.

A la Profe Mónica Espíndola y a la profe Nancy Alarcón por la oportunidad de aquella pasantía, por introducirme a la Farmacia hospitalaria y Magistral, por los conocimientos aprendidos, la paciencia y la confianza.

A mi jefa Mariela y a mis compañeros de trabajo que este último año siempre estuvieron apoyándome y alentándome.



A todas las personas que de una u otra forma siempre estuvieron presentes, ya sea orando por mí cuando tenía que rendir un examen o mandándome mensajes de aliento, aconsejándome o simplemente escuchar. Muchas gracias.

RESUMEN

Nicotiana glauca Graham (Solanaceae), conocida como “palán-palán”, es una especie ampliamente utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes y antimicrobianas. Sin embargo, su toxicidad, atribuida principalmente al alcaloide anabasina, plantea la necesidad de estudios que evalúen su composición química y su potencial aplicación farmacéutica.

El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis micrográfico y fitoquímico de hojas, tallos y flores de *N. glauca*, con el fin de aportar evidencia científica que complemente el conocimiento tradicional y explore posibles usos en formulaciones tópicas. El material vegetal fue recolectado en la provincia de Misiones (Argentina), acondicionado y sometido a procesos de extracción con metanol. Se aplicaron técnicas de microscopía, volumetría y cromatografía en capa delgada (TLC), además de ensayos antioxidantes mediante el método ABTS.

Los resultados confirmaron la presencia de metabolitos secundarios de interés farmacológico, como alcaloides, taninos, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos. Los extractos de hoja presentaron mayor proporción de flavonoides, mientras que los de flor fueron más ricos en ácidos hidroxicinámicos. Ambos mostraron actividad antioxidante. El análisis micrográfico permitió describir características anatómicas de hojas, tallos y flores, aportando información adicional a la registrada en la bibliografía.

Estos hallazgos respaldan el potencial de *N. glauca* como fuente de compuestos bioactivos aplicables en formulaciones tópicas, particularmente en el tratamiento de afecciones cutáneas como acné y forúnculos. Se propone su investigación como alternativa no antibiótica, contribuyendo a reducir el uso innecesario de antibióticos y la resistencia bacteriana. No obstante, la elevada toxicidad de la especie exige estudios adicionales para garantizar la seguridad de sus posibles aplicaciones.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN.....	3
ÍNDICE	4
INDICE DE FIGURAS.....	7
INDICE DE TABLAS	10
ABREVIATURAS.....	11
1 INTRODUCCIÓN	12
2 OBJETIVO E HIPÓTESIS	14
2.1 Objetivo General:.....	14
2.2 Objetivos Específicos:.....	14
2.3 Hipótesis.....	14
3 MARCO TEÓRICO.....	15
<i>Nicotiana Glauca</i> Graham.	15
3.1 Descripción botánica y taxonómica	15
3.2 Usos etnomedicinales:.....	18
3.3 Toxicidad.....	18
3.4 Constitución química	19
3.5 Flavonoides:	19
3.6 Taninos.....	21
3.6.1 Clasificación:.....	21
3.7 Alcaloides:.....	22
3.7.1 Anabasina	23
3.8 Análisis fitoquímico:.....	24

3.9	Método de extracción:	24
3.10	Maceración:	24
3.11	Cromatografía:	25
3.12	Reveladores químicos:	26
3.12.1	Reactivo NP/PEG:	26
3.12.2	Antioxidantes:	26
4	MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1	Justificación de la metodología de trabajo	28
4.2	Diagrama de trabajo en el Laboratorio	29
4.3	Recolección e identificación del material vegetal	30
4.4	Acondicionamiento de droga vegetal	30
4.5	Análisis micrográfico	31
4.6	Extractos	32
4.6.1	Extracto crudo de hoja y tallo; extracto crudo de parte reproductiva	32
4.6.2	Extracto para la utilización en las técnicas cromatográficas	37
4.7	Volumetría	37
4.8	Puesta a punto del ensayo autográfico	38
4.9	Revelado	42
4.9.1	Revelado físico	42
4.9.2	Revelado químico	43
4.9.3	Actividad antioxidante	43
4.10	Registros	43
4.11	Resumen de los materiales utilizados	43
5	RESULTADOS	46
5.1	Resultado de recolección e identificación del material vegetal	46

5.2	Resultado de Acondicionamiento de droga vegetal	46
5.3	Resultado de Análisis micrográfico	46
5.3.1	Epidermis Adaxial y abaxial	46
5.3.2	Corte de lámina foliar	48
5.3.3	Corte de la nervadura central	48
5.3.4	Corte del borde foliar.....	49
5.3.5	Corte del peciolo.....	50
5.3.6	Tallo.....	50
5.3.7	Flor	52
5.4	Resultado de Volumetría.....	53
5.4.1	Para alcaloides:	53
5.4.2	Para taninos:	53
5.5	Resultado de Extractos	54
5.6	Resultados de la puesta a punto ensayo autobiográfico.	56
5.6.1	Compuestos flavonoides y ácidos hidroxicinámicos.....	56
5.6.2	Resultados del perfil cromatográfico.....	56
5.7	Resumen de la información obtenida a partir del revelado y registro.....	61
5.7.1	TLC unidimensional:.....	61
5.7.2	TLC bidimensional	61
5.8	Propuesta Farmacológica	61
6	DISCUSIÓN	64
7	CONCLUSIÓN	68
8	BIBLIOGRAFÍA	70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Foto árbol <i>N. Glauca</i> , foto de autora.	16
Figura 2: <i>Nicotiana glauca</i> Graham (Agra et al. 6000). A. Rama floreciente; B. Flor aislada; C. Detalle del estambre que muestra la antera; D. Fruto con cáliz persistente, añadir; y. Detalle del filete en la región basal; F. Estilete con estigma de tipo bilobulado, extraído de (Silva et al., 2007).	17
Figura 3: Flavonoides. Estructura básica y tipos. Extraído de Martínez-Flórez et 20	20
Figura 4: Ambasina alcaloide principal en <i>Nicotiana Glauca</i> , Extraido de Alonso, 2004.	24
Figura 5: Diagrama trabajo de laboratorio, confeccionado por autora.	29
Figura 6: material clasificado en hojas y de parte reproductiva, foto de autora.	30
Figura 7: Hojas llevadas a polvo fino mediante molienda con mortero, foto de autora.	31
Figura 8: Muestra vegetal de tallo y hoja post molienda. Foto de autora.	31
Figura 9: teñido con safranina de cortes de hoja de <i>N. Glauca</i> . Fotos de autora.	32
Figura 10: Pesado de molienda de muestra de parte reproductiva para extracto seco. Foto de autora	33
Figura 11: Pesado de molienda de muestra hojas para extracto seco. Foto de autora.	33
Figura 12: Elementos utilizados para los extractos secos. Foto de autora.	34
Figura 13: extractos crudos de Hoja a la derecha y de flor a la izquierda de <i>N. Glauca</i> . Foto de autora.	34
Figura 14: Filtrado al vacío, con Kitasato de extracto crudo de hoja de <i>Nicotiana glauca</i> ., foto de autora.	35
Figura 15: placa de Petri con extracto crudo de <i>Nicotiana glauca</i> en estufa. Foto de autora.	35
Figura 16: Obtención de extracto seco de <i>N. Glauca</i> por raspado de placas. Foto de autora.	36

Figura 17: <i>extracto de hoja (A) y extracto de flor (B), previo al ensayo. Foto de autora.</i>	38
Figura 18: <i>Reactivos y elementos utilizados para realizar S1; foto de autora.</i> ...	40
Figura 19: <i>Siembra de placas cromatográficas para TLC unidireccional, foto de autora.</i>	41
Figura 20: <i>Corrida cromatográfica unidimensional. A) Se aprecian ambas placas dentro de la cuba. B) muestra final de la corrida. Foto de autora.</i>	41
Figura 21: <i>2da corrida de TLC bidimensional. Foto de autora.</i>	42
Figura 22: <i>Peeling de hoja abaxial, estomas anisocíticos. Foto microscopio 40 X. Foto de autora.</i>	47
Figura 23: <i>Peeling de hoja adaxial, estomas anisocíticos. Foto microscopio 40 X. Foto de autora.</i>	47
Figura 24.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 25 : <i>nervadura central Nicotiana Glauca vista microscopio a un aumento de 10 X. Foto de autora.</i>	49
Figura 26: <i>borde foliar, vista microscopio 40 X. Foto de autora.</i>	49
Figura 27: <i>Corte transversal de peciolo. Foto de autor. Vista 10 X figura A, vista 40 X figura B. Foto de autora.</i>	50
Figura 28: <i>Corte transversal tallo N. Glauca. Foto de autor, vista 10 X. Foto de autora.</i>	51
Figura 29: <i>Corte transversal tallo N. Glauca. Foto de autor, vista 10 X. Foto de autora.</i>	51
Figura 30: <i>Vista de lupa de flor de N. glauca. Vista bajo lupa. Foto de autora.</i> ..	52
Figura 31: <i>Gineceo (A) y Androceo (B) de flor de N. Glauca. Vista bajo lupa; foto de autora.</i>	53
Figura 32: <i>Volumetría positiva alcaloides; A) patrón atropina, B) extracto de hoja y tallo, C) extracto de flor. Foto de autora.</i>	54
Figura 33: <i>Volumetría positiva Taninos, A) extracto de hoja y tallo, B) extracto de flor. Foto de autora.</i>	54
Figura 34: <i>corrida cromatográfica unidimensional, R (rutina), H (hoja), F (flor), foto de autora.</i>	57

- Figura 35:** *Revelado de placa cromatográfica con ABTS, para determinar presencia de antioxidantes. Foto de autora.....*58
- Figura 36:** *Corrida cromatográfica unidimensional revelada con NP, vista bajo luz UV- 365 nm, R (patrón rutina), H (extracto de hoja), F (extracto de flor). Foto de autora.*59
- Figura 37:** *Revelado físico luz UV-254 nm, corrida bidimensional, A es el extracto de flor y el B pertenece al extracto de hoja y tallo. N° 1 y 2 sentido de la corrida. Foto de autora.*60
- Figura 38:** *Revelado químico y físico Luz UV-356 nm, A extracto de hoja y tallo, B extracto de flor, NAR (naranja), CEL (celeste), VER (verde), N° 1 y 2 sentido de la corrida cromatográfica, foto de autora.*61



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía <i>Nicotiana Glauca</i>	17
Tabla 2: <i>Solventes utilizados para identificación de flavonoides en CCD</i>	39
Tabla 3: <i>Materiales utilizados en el desarrollo de los ensayos prácticos. Tabla confeccionada por la autora</i>	43

ABREVIATURAS

- °C
- ce.: células epidérmicas
- cm : centímetros
- col.: colénquima
- eab.: epidermis abaxial
- ead.: epidermis adaxial
- est.: estomas
- FeCl₃: cloruro férrico
- fl.: floema
- FM: fase móvil
- g: gramos
- hs: horas
- id.: idioblastos
- me.: médula
- ml: mililitros
- mM: Milimolar
- µl: microlitros
- nm: nanómetros
- pe.: parénquima en empalizada
- pf.: parénquima fundamental
- S1, S2, S3: solvente 1, 2 y 3
- TLC: cromatografía de capa delgada
- UV: Ultravioleta
- xi.: xilema

1 INTRODUCCIÓN

El empleo de plantas medicinales constituye una de las prácticas más antiguas y universales dentro de las culturas humanas. En Argentina, al igual que en gran parte del mundo, numerosas especies vegetales han sido utilizadas tradicionalmente para el tratamiento y prevención de distintas enfermedades, transmitiendo este conocimiento de generación en generación (Arias, 1999; Consolini & Migliori, 2005). Entre estas especies se encuentra *Nicotiana glauca* Graham, conocida comúnmente como “palán-palán”, una planta perteneciente a la familia Solanaceae, distribuida en diferentes regiones del país y de otras zonas templadas del mundo (Lahitte et al., 1998).

El *N. glauca* se caracteriza por su amplia aplicación etnomedicinal, especialmente en comunidades originarias y rurales. Sus hojas y otras partes aéreas han sido empleadas como antirreumáticas, cicatrizantes, antiinflamatorias y en el tratamiento de diversas afecciones (Martínez Crovetto, 1965; Lahitte & Hurrel, 1998; Moerman, 1998). Sin embargo, pese a estos usos tradicionales, la planta posee una toxicidad significativa atribuida a la presencia de alcaloides como la anabasina, lo que plantea la necesidad de estudios rigurosos que permitan comprender mejor su composición química, sus posibles beneficios terapéuticos y los riesgos asociados a su consumo (Reichman et al., 2008; Shishkin et al., 2015).

Desde la perspectiva farmacognóstica, el análisis fitoquímico resulta una herramienta esencial para identificar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en la especie. Dentro de estos compuestos, destacan flavonoides, taninos y alcaloides, que poseen reconocida actividad biológica y farmacológica (Martínez-Flórez et al., 2002; Herrera-Fuentes et al., 2017; Henning et al., 2013). Asimismo, la cromatografía en capa delgada (TLC) y las pruebas volumétricas permiten evaluar cualitativamente la presencia de dichos compuestos, mientras que ensayos antioxidantes ofrecen información relevante acerca de su potencial aplicación en la salud (Wagner & Bladt, 1996; Zampini et al., 2010).

En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo realizar un análisis micrográfico y fitoquímico de *Nicotiana glauca*, a fin de aportar información científica que complemente el conocimiento tradicional sobre la especie. De esta



manera, se busca contribuir al estudio de sus metabolitos secundarios, generar datos que fundamenten sus posibles usos farmacéuticos y, al mismo tiempo, alertar sobre los riesgos que implica su toxicidad.

2 OBJETIVO E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General:

Realizar un análisis micrográfico y fitoquímico de *Nicotiana glauca*.

2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Acondicionar el material vegetal.
- ✓ Obtener preparados de la droga vegetal mediante técnicas farmacobotánicas clásicas.
- ✓ Realizar extractos por métodos farmacopeicos.
- ✓ Poner a punto y analizar los extractos mediante TLC bidimensional.
- ✓ Reconocer principios activos vegetales mediante pruebas volumétricas.

2.3 Hipótesis

Caracterizar a *Nicotiana glauca* por micrografía cualitativa, técnicas de cromatografía en capa delgada y volumetría.

3 MARCO TEÓRICO

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) una planta medicinal es cualquier planta utilizada con la finalidad de aliviar, prevenir y/o curar una enfermedad o de alterar procesos psicológicos y patológicos, o cualquier planta empleada como fuente de drogas o precursores de estas (Arias, 1999).

El uso de plantas silvestres para la medicina forma parte del conocimiento tradicional. En la Argentina se utilizan unas 750 especies vegetales, de las cuales algunas son autóctonas, que se obtienen de su ambiente silvestre. (Consolini, A. & Migliori, G. 2005).

A través de la historia, los distintos grupos étnicos que habitaron el territorio que actualmente ocupa la provincia de Misiones se sirvieron de su riqueza natural para encontrar sustento y configurar sus formas de vida. El uso doméstico de especies vegetales para el tratamiento de enfermedades fue una práctica habitual durante varios siglos y aún persiste en los diferentes grupos culturales, transmitiéndose a través de generaciones. (Fernández Castalón, 2017)

Es sabido que aun actualmente en nuestra provincia se mantiene muy fuerte el uso de plantas medicinales, ya sea por herencia, tradición u como opción de tratamiento.

***Nicotiana Glauca* Graham.**

3.1 Descripción botánica y taxonómica

Nicotiana Glauca Graham (**figura 1 y 2**) conocida como “palán-palán” es un Árbol pequeño, nativa de Argentina, presente en Brasil, Paraguay y Bolivia, posee una distribución cosmopolita en climas templados alrededor del mundo. Pertenece a la familia Solanaceae. Se caracteriza por presentar una altura entre 2-5 metros; hojas largamente pecioladas, glaucas, aovadas o elípticas, flores numerosas pediceladas dispuestas en amplias panojas terminales; corola tubulosa de color amarillo, cubierta con una suave pubescencia. Florece durante los meses de primavera a otoño y fructifica en verano. El fruto es una cápsula ovoide, provista de numerosas semillas pardas y reticuladas en su interior (Lahitte et al., 1998).



Figura 1: Foto árbol *N. Glauca*, foto de autora.

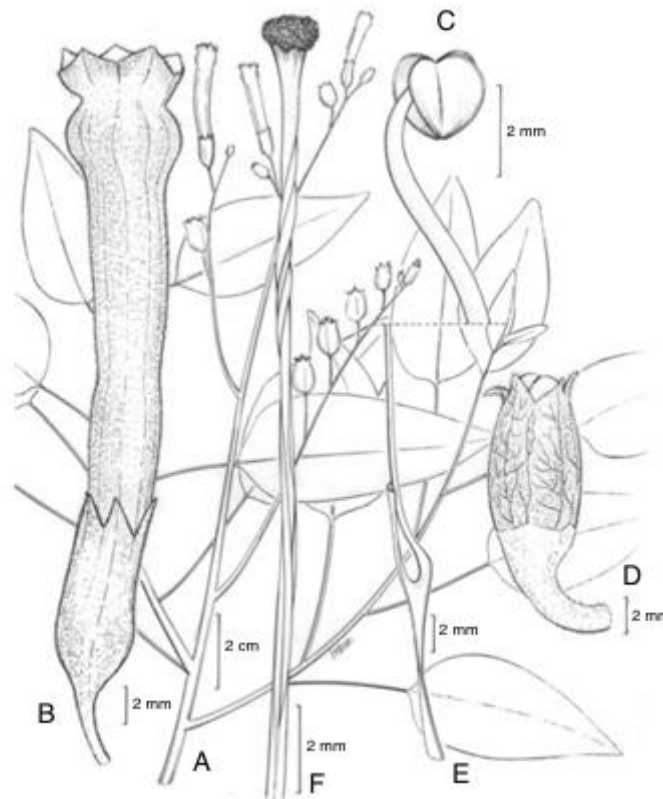


Figura 2: *Nicotiana glauca* Graham (Agra et al. 6000). A. Rama floreciente; B. Flor aislada; C. Detalle del estambre que muestra la antera; D. Fruto con cáliz persistente, añadir; y. Detalle del filete en la región basal; F. Estilete con estigma de tipo bilobulado, extraído de (Silva et al., 2007).

La clasificación taxonómica se detalla en la **tabla 1**:

Tabla 1. Taxonomía *Nicotiana Glauca*

División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Genero	<i>Nicotiana</i> L.
Especie	<i>Nicotiana glauca</i> Graham

Nota: Tabla realizada por la autora, adaptada la información de ITIS: Integrated Taxonomic Information System – Report

3.2 Usos etnomedicinales:

El Palán palán (*Nicotina glauca*) es una especie muy utilizada desde hace años en medicina tradicional. Los indígenas Wichi, que habitan en las provincias de Chaco, Salta y Formosa, utilizando esta especie como antirreumático, antiartrítico, en la curación de llagas, lastimaduras, quemaduras, maduración de forúnculos y abscesos. También usan las hojas como cicatrizante para curar mordeduras de víboras o heridas cortantes. Las hojas frescas se utilizan para las paperas (Lahitte & Hurrel, 1998), se aplican de forma externa como antiinflamatorio y antirreumático (Moerman, 1998).

Se utiliza para tratar quemaduras y Enfermedades inflamatorias en Italia (Morel et al., 1998).

Muy empleado en forma tópica (decocción de las hojas sobre un lienzo, o también las hojas flameadas o maceradas) para aliviar dolores reumáticos o traumáticos (Marzocca, 1997).

Según Janakat y Al-Merie (2002), se utiliza a *N. glauca* como planta para tratar la ictericia en la medicina popular jordana.

También se aplica en casos de parotiditis y hemorroides (indios Vilelas del Chaco). En forunculosis se aplican las hojas desprovistas de la epidermis por el haz, como antibacteriano y para facilitar la eliminación de pus. Por vía interna las infusiones (muy diluidas) se recomiendan como antiespasmódico ligero y sedante (Martínez Crovetto, 1965).

En Ecuador utilizan las hojas en infusión como antiviral. Las cataplasmas de palán-palán son aplicadas sobre picaduras de insectos o mordeduras de víboras, una vez extraído o succionado el veneno (Alonso, 2004).

Además, las hojas hervidas sirven para tratar el acné y para calmar el dolor de muelas (Falasca, 2011).

3.3 Toxicidad

La planta de *Nicotiana Glauca* tiene presente a la anabasina, un alcaloide que es extremadamente peligrosa para personas y animales (Alharthi et al., 2021; DiTomaso et al., 2013; Rinez et al., 2012; Trifa et al., 2020;). La anabasina puede inducir anomalías fetales en animales incluso si la madre come pequeñas cantidades

de esta planta durante el embarazo temprano (DiTomaso et al., 2013; Trifa et al., 2020).

En San Diego, California. Castorena, J.L et al (1987) reporta una muerte por consumo de *Nicotiana Glauca*, debido a la Anabasina.

En Jerusalén Furer et al. (2010), informa de dos casos de intoxicación en una familia luego de haber consumido la planta, afortunadamente en este caso las personas recibieron atención medica justo a tiempo.

Imane et al. (2021) reportaron un caso de intoxicación tras el uso tópico de *N. Glauca* en quemaduras de tercer grado en una niña de 5 años.

3.4 Constitución química

Los componentes químicos de *N. Glauca* comprenden de mayor a menor medida a Alcaloides: anabasina; n'-nor-anabasina; anatabina; 2-3'-bipiridina; cotinina; miosmina; nicotelina; nicotina; nor-nicotina; nicotina-1'-nóxido; ácido nicotínico; 3-acetilpiridina; etilendiamina y 4-metoxi-cinamoil Amidas: N (2', N6'-dietilfenil)-2-cloroacetamida y N-(butiloximetil)-N-(2',6'-dietilfenil)-2-cloroacetamida. Ácidos grasos: ácido palmítico, ácido linoleico y ácido oleico, deshidrocolesterol, vitamina D3, 25(OH)D3 y 1 y 25(OH)2D3. Cumarina: escopoletina. Esteroides: 2-sitosterol, daucosterol. Flavonoide: rutina. Taninos. (Silva et al., 2007).

3.5 Flavonoides:

Los flavonoides son compuestos fenólicos de bajo peso molecular que están presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por los agentes oxidantes. Están ampliamente distribuidos en las plantas como pigmentos naturales, ubicándose principalmente en las partes aéreas: hojas, flores y frutos, siendo algunos los responsables del color amarillo de ciertas flores (Martínez-Flórez et al., 2002).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. (Martínez-Flórez et al., 2002).

Los flavonoides (figura 3) son estructuras del tipo C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. Todos los flavonoides poseen un carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C₃ y en el anillo B. Son estructuras hidroxiladas (OH) en el anillo aromático y, por lo tanto, son polinefólicas (Kuklinski, 2000).

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

- 1) Flavanos con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- 2) Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- 3) Flavonas, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C₃.
- 4) Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Martínez-Flórez et al., 2002).

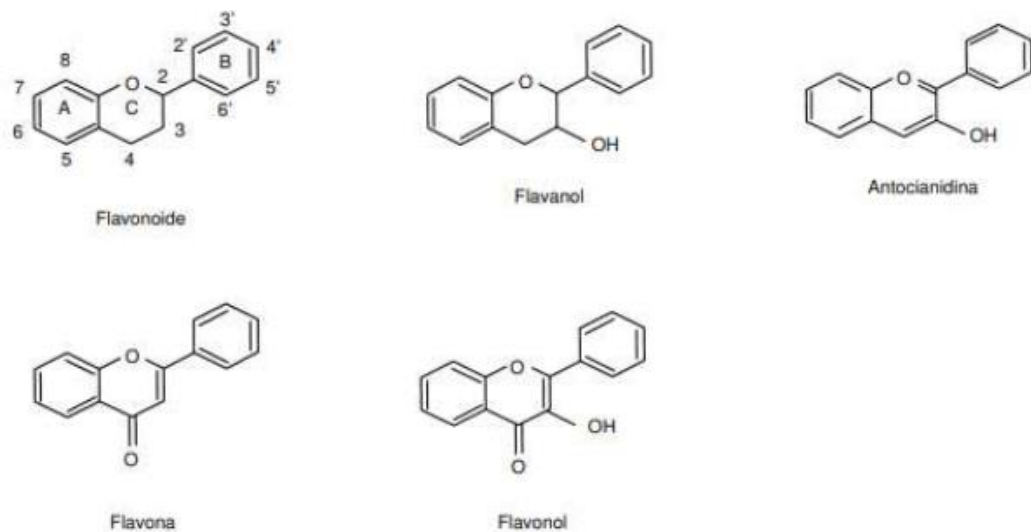


Figura 3: Flavonoides. Estructura básica y tipos. Extraído de Martínez-Flórez et

3.6 Taninos

Los Taninos son metabolitos polifenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. En la medicina tradicional se usan externamente, los preparados a base de drogas ricas en taninos, como las decocciones, se emplean para detener pequeñas hemorragias locales; en inflamaciones de la cavidad bucal, catarros, bronquitis, quemaduras, hemorroides. poder antiséptico para prevenir germinación de hongos y crecimiento de parásitos. (Herrera-Fuentes et al., 2017)

3.6.1 Clasificación:

Dada su diversidad química y estructural, estos compuestos suelen clasificarse como:

- **Taninos hidrolizables:**

Son moléculas polifenólicas de tamaño discreto, de naturaleza no polimérica, capaces de ser hidrolizados por ácidos o enzimas a un azúcar y a un ácido carboxílico fenólico. Corresponden al parecer, a los de mayor distribución en el reino vegetal. Se caracterizan por ser muy solubles en agua, sobre todo en agua caliente, formando soluciones coloidales. Son sólidos amorfos muy higroscópicos de color amarillo pardusco. Cuando están relativamente puros, disminuyen su solubilidad en agua y son más cristalinos. Son, por tanto, también más solubles en solventes orgánicos de relativa polaridad, en particular el metanol y el etanol. (Herrera-Fuentes et al., 2017)

Los que se encuentran en forma glicosídica se pueden hidrolizar parcial o totalmente durante el proceso de extracción y se precipitan con facilidad de las soluciones donde se hallan, por adición de ácidos minerales. De ellos se diferencian dos tipos.

Galotaninos: Estructuralmente, son ésteres del ácido gálico con la glucosa o un polisacárido, o la variante derivada del ácido metadigálico.

Elagitaninos: Son taninos que producen por hidrólisis tanto el ácido gálico, como algunos de sus derivados. No necesariamente aparecen fusionados en sus orígenes a la glucosa, sino que pueden aparecer después de la hidrólisis, por la

regeneración de los agrupamientos lactónicos. Agregan las estructuras del ácido elágico e hidrogálico. (Miranda & Cuellar, 2012)

Taninos condensados:

Los taninos condensados son moléculas oligoméricas o poliméricas de unidades flavan-3-ol, unidas a través de enlaces C-4 a C-8, o menos frecuentemente, C-4 a C-6 de dos unidades consecutivas de diverso tamaño y constitución según su origen, además son resistentes a la hidrólisis. También presentan mucha dispersión en el reino vegetal, y se considera como característica fundamental, que producen antocianidinas y catequinas pro calentamiento con ácidos diluidos. Se condensan con proteínas cuya estructura depende lógicamente de la masa molecular. De ellos se reconocen tres tipos. Catequinas (flavan-3-oles): Se encuentran, por lo general, libres en la naturaleza y responden estructuralmente a las variantes: catequina y galacotaquina. Los miembros más comunes sólo difieren del número de OH en el anillo B, los cuales no se han encontrado metilados. Se ha demostrado que el hidroxilo en la posición 3, se une por puente de hidrógeno con el oxígeno heterocíclico. Leucoantocianidinas (flavan-3,4-dioles): Se diferencian de las catequinas en que estas producen productos insolubles, de color amarillo oscuro, cuando se calientan con ácidos; mientras los flavn-3,4- dioles producen, además de esto, flobafenos y algunas antocianidinas. (Herrera-Fuentes et al., 2017)

3.7 Alcaloides:

Constituyen un grupo de numerosos compuestos secundarios nitrogenados aislados tradicionalmente de plantas vasculares. Estructuralmente contienen uno o varios átomos de nitrógeno en su molécula, a menudo formando parte de un anillo heterocíclico. En un principio se los definió como aquellas sustancias de origen natural, nitrogenadas y de reacción alcalina, derivadas biosintéticamente de aminoácidos, de distribución restringida y de actividad farmacológica significativa; aunque esta definición caracterizaría sólo a los alcaloides verdaderos. En cuanto a sus propiedades, la mayoría son de carácter básico, cristalinos, aunque algunos forman precipitados amorfos y unos pocos son líquidos a temperatura ambiente (como la nicotina, la coniína y la esparteína); no tienen olor, son amargos y en

general incoloros (aunque también hay excepciones, como la berberina y la sanguinarina). Su peso molecular oscila entre 100 y 900, y su basicidad se 18 debe a que normalmente el nitrógeno posee un par de electrones no compartidos. (Henning et al., 2013)

Según la composición elemental pueden clasificarse en ternarios o cuaternarios: - los ternarios o no oxigenados por lo general se presentan como líquidos oleosos, volátiles y arrastrables por vapor de agua, características que se tienen en cuenta para su determinación cuantitativa a través de una destilación (ver: Métodos de extracción en este Capítulo). En la figura 2 se puede verificar la ausencia de átomos de oxígeno en las estructuras de laconiina en la cicuta (*Conium maculatum*), la esparteína en retama (*Spartium junceum*) y la nicotina en tabaco (*Nicotiana tabacum*). (Henning et al., 2013)

3.7.1 Anabasina

Es el alcaloide piperidínico más abundante en *Nicotiana glauca*, constituyendo hasta el 98% del contenido total de alcaloides en las hojas (Reichman et al., 2008; Mizrachi et al., 2012).

Estructuralmente, la anabasina es similar a la nicotina, con una diferencia clave en el anillo de piridina/piperidina. Es un potente agonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), actuando de manera similar a la nicotina, pero con una potencia y selectividad diferentes (Shishkin et al., 2015).

La anabasina ha sido objeto de investigación debido a su actividad en los receptores nicotínicos de acetilcolina, que son objetivos importantes para el desarrollo de fármacos para enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, así como para la adicción a la nicotina. Sin embargo, su toxicidad es un factor limitante (Shishkin et al., 2015).

La alta toxicidad, de la planta de *Nicotiana Glauca* es atribuida casi en su totalidad a la anabasina este alcaloide es altamente tóxico que puede ser letal tanto para humanos como para animales (Reichman et al., 2008).

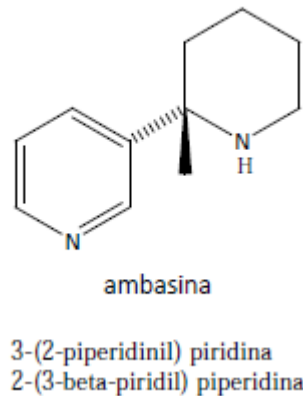


Figura 4: *Ambasina* alcaloide principal en *Nicotiana Glauca*, Extraído de Alonso, 2004.

Otros alcaloides presentes, aunque en menor proporción, son la nornicotina y la cotinina, productos de la metabolización de la anabasina (Mizrachi et al., 2012).

3.8 Análisis fitoquímico:

El análisis fitoquímico tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar, aplicando para ello una serie de técnicas de extracción, de separación, y purificación (Olivera et al., 2017).

3.9 Método de extracción:

La extracción es una operación fundamental en el laboratorio que consiste en aislar, mediante un disolvente, una fracción determinada de una muestra, procurando que el resto de sus componentes permanezca lo más intacto posible.

3.10 Maceración:

Es un método de extracción, que consiste en poner en contacto la droga seca triturada con el disolvente utilizado para la extracción a temperatura ambiente, manteniéndolo todo en agitación durante un tiempo determinado que depende de las características de la droga y de la naturaleza de los principios activos (normalmente días). Se utiliza generalmente agua, glicerina o mezclas hidroalcohólicas. A continuación, se decanta el conjunto obteniéndose por una parte

el extracto líquido con los principios activos y por otra el residuo de la droga (Kuklinski, 2000).

3.11 Cromatografía:

La cromatografía es un método por el cual las sustancias se separan mediante un proceso de migración diferencial en un sistema que consta de dos fases. Una fase que fluye continuamente en una dirección dada (fase móvil) y otra que permanece fija (fase estacionaria) (Farmacopea Argentina, 2013).

La cromatografía en capa delgada es comúnmente empleada para la identificación de sustancias. El mecanismo de separación predominante es la adsorción, pero dependiendo del adsorbente empleado pueden observarse también fenómenos de partición (Farmacopea Argentina, 2013).

En cromatografía en capa delgada el adsorbente está constituido por una capa uniforme y relativamente delgada de un material finamente pulverizando que se aplica sobre una placa rígida de vidrio, plástico o metal. En cambio, la cromatografía en columna se emplea para la separación de sustancias en escala preventiva (Farmacopea Argentina, 2013).

Los componentes separados por cromatografía deben poder ser visualizados de alguna manera, hecho que no constituye un problema para sustancias coloreadas como los pigmentos, pero cuando los componentes a separar no pueden ser observados a simple vista es necesario recurrir a diversas herramientas de detección, las cuales se denominan reveladores (Sgariglia, et al., 2010).

Los reveladores pueden ser físicos o químicos. Los reveladores físicos comprenden por ejemplo lámparas que emiten luz UV, la cual permite visualizar componentes que por sus características químicas son capaces de emitir fluorescencia (ej. compuestos fenólicos), la exposición al calor también puede generar ciertos cambios en los componentes separados (ej. acelerar la oxidación de éstos) que permitan visualizarlos. Los reveladores químicos son sustancias químicas con reactividad, la cual generalmente es específica para grupos funcionales determinados en una molécula, y a través de éstos es posible seleccionar qué tipo de moléculas (componentes) queremos visualizar. En este sentido vale la

pena mencionar que cuando se conocen exactamente los componentes que se pretenden separar mediante cromatografía, se aprovechan las propiedades de éstos para seleccionar aquellos reveladores que permitan detectarlos con mayor especificidad e inequívocamente (Sgariglia, et al., 2010).

3.12 Reveladores químicos:

3.12.1 Reactivo NP/PEG:

Este revelador es específico para la detección de flavonoides. Éste se emplea para detectar flavonoides y glicósidos de flavonas, consiste en una mezcla de difenilboriloxietilamina (NP) y polietilenglicol etanólico 6000 (PEG) en una razón de (5:4). Produce inmediatamente después de rociada la placa y bajo luz UV a 365 nm una intensa fluorescencia que emite un color que va desde anaranjado, amarillo verdoso y verde oscuro, dependiendo de la estructura de los flavonoides (La Hoz, 2009).

3.12.2 Antioxidantes:

Se determino la presencia de Antioxidantes por el método ABTS+. Este método se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS+, debido a su reducción a ABTS por la acción de antioxidantes. El radical catiónico ABTS+ es un cromóforo verde azulado que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azinobis-3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical ABTS+ está determinado en función a la concentración (Rioja Antezana et al., 2018). El ABTS•+ se logra haciendo reaccionar 2.45 mM de persulfato de potasio equivalente a 0,0033 g con 7 mM de ABTS equivalente a 0,0194 g en un frasco.

Posteriormente se añade 5 ml de agua destilada (figura 4). Esta mezcla se agita y el frasco se cubre con papel de aluminio dejándolo reposar durante 12 a 16 hs. Es importante que se lo deje en la oscuridad (Gruszycki et al., 2019).

Dicho radical pierde su coloración característica frente a compuestos antioxidantes, debido a que éste cede su electrón produciendo regiones con manchas claras. Para esto se realiza un fondo, el cual se logra adicionando 1 ml de

ABTS•+ sobre 3 ml de agar al 0,9%. Esta mezcla se vierte sobre la placa de CCD la cual presenta una corrida previa y se deja enfriar hasta que solidifique.

Posteriormente la misma, en condiciones de oscuridad, se incuba a temperatura ambiente. Al cabo de 1 minuto se determinan los resultados. La importancia de la utilización del agar radica en que aumenta la sensibilidad del ensayo (Zampini et al., 2010)

Por lo mencionado anteriormente se propone analizar la actividad antioxidante de *Nicotiana Glauca*, usando el método ABTS+.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Justificación de la metodología de trabajo

La metodología del presente trabajo está enmarcada 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 16Q2399-TI.

4.2 Diagrama de trabajo en el Laboratorio

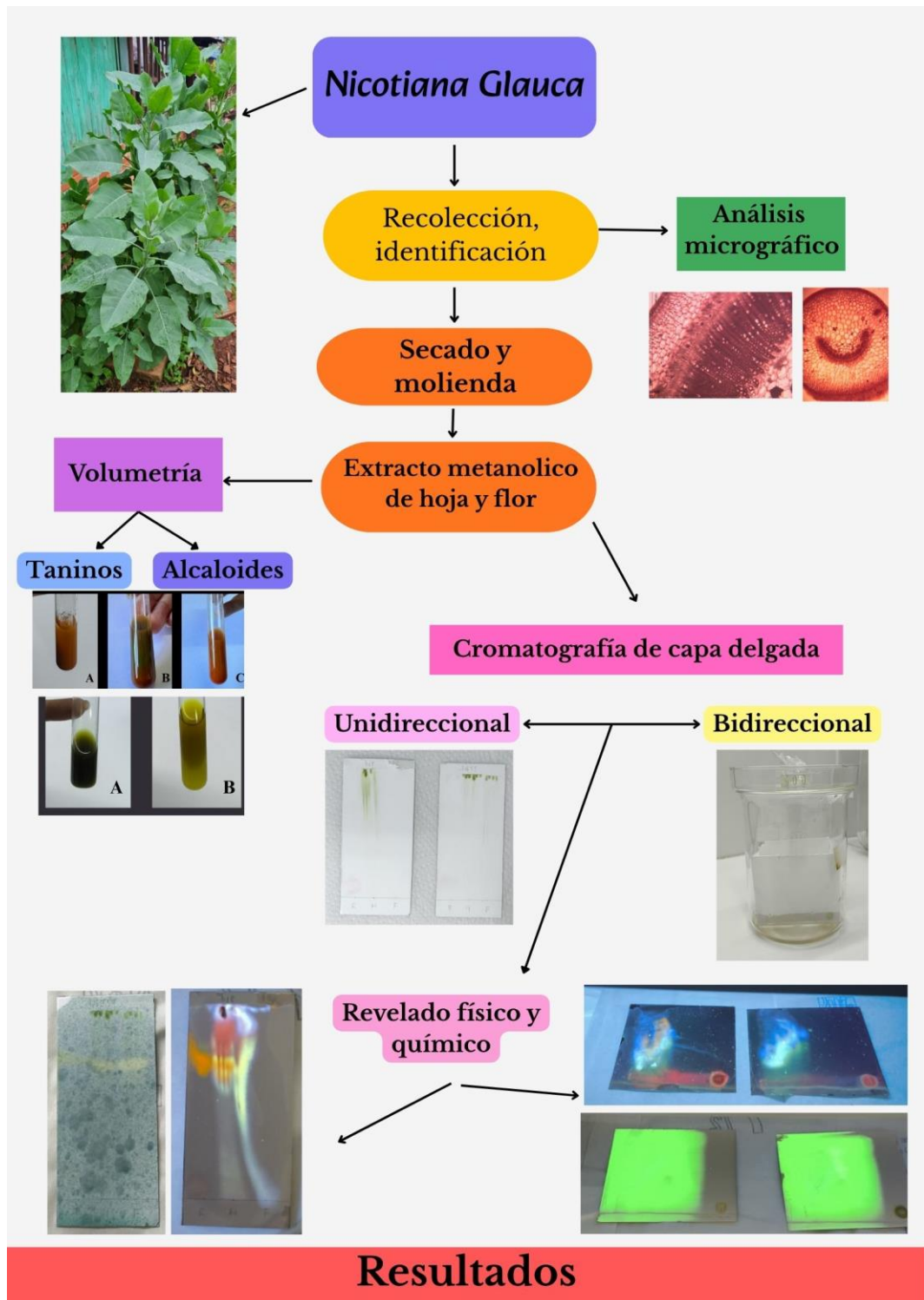


Figura 5: Diagrama trabajo de laboratorio, confeccionado por autora.

4.3 Recolección e identificación del material vegetal

En primer lugar, en octubre de 2024 se acercó una muestra a la cátedra de farmacobotánica que fue de nexa con la Prof. **Naike González** que fue la encargada de la identificación para confirmar si la muestra era correspondía a *Nicotiana Glauca* Graham.

Posterior a una identificación positiva se procedió a recolectar el material vegetal consistió en partes aéreas (tallos, hojas y flores) de *Nicotiana Glauca* Graham, los cuales fueron recolectados en noviembre del año 2024 en la ciudad de Ruiz de Montoya, Misiones, Argentina. Una vez recolectada la muestra fue colocada en una bolsa y transportada a Posadas, y llevada a la cátedra de farmacobotánica donde fue secada a estufa y guardada en sobre de papel hasta su utilización.

4.4 Acondicionamiento de droga vegetal

Para el acondicionamiento del material vegetal en primer lugar se separó el material ya seco, por un lado, el tallo y hojas, por otro la parte reproductiva. (Figura 6).



Figura 6: material clasificado en hojas y de parte reproductiva, foto de autora.

Luego se procedió a la molienda de cada uno por separado hasta llegar a polvo fino, se pesó y se reservó en sobres de papel hasta la preparación de los extractos. (Figura 7 y 8).



Figura 7: Hojas llevadas a polvo fino mediante molienda con mortero, foto de autora.



Figura 8: Muestra vegetal de tallo y hoja post molienda. Foto de autora.

Finalmente se procedió al pesado de cada molienda por separado y se almacenaron en sobres de papel rotulados hasta su uso.

4.5 Análisis micrográfico

Se realizaron cortes transversales a mano alzada de tallo y hoja de *Nicotiana Glauca* Graham, mediante la utilización de navajas. Los cortes fueron pasados por hipoclorito de sodio, lavados con agua y luego teñidos con safranina (Figura 9) para ser montados en porta objetos, y observados bajo microscopio.

Además, se realizó peeling de la hoja y se observó bajo lupa las flores y semillas.



Figura 9: *teñido con safranina de cortes de hoja de N. Glauca. Fotos de autora.*

4.6 Extractos

Según FA 7, primer suplemento, son formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y plásticas o sólidas y pulverulenta, obtenidas por agotamiento de drogas vegetales o animales con solventes apropiados, que luego se evaporan parcial o totalmente, ajustando el residuo a tipos determinados para cada droga (Farmacopea Argentina, 2018).

4.6.1 Extracto crudo de hoja y tallo; extracto crudo de parte reproductiva.

Una vez obtenido la muestra molida se procedió a realizar los extractos secos. Para los extractos se usaron:

- Para el extracto de las partes reproductiva 2,010 g de la muestra molida y se midieron 50 ml de metanol anhidro. (Figura 10)
- En el extracto de hoja 10 g de la muestra molida (Figura 11) y se midió 100 ml de metanol anhidro.

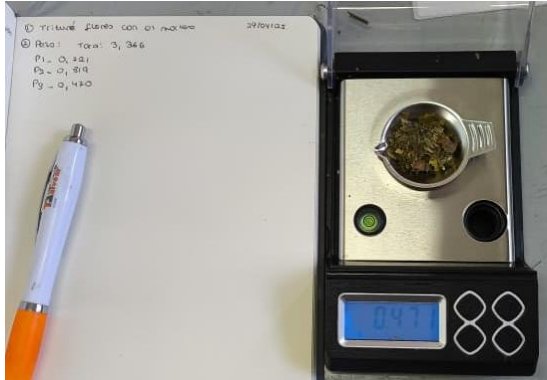


Figura 10: *Pesado de molienda de muestra de parte reproductiva para extracto seco. Foto de autora*



Figura 11: *Pesado de molienda de muestra hojas para extracto seco. Foto de autora.*



Figura 12: Elementos utilizados para los extractos secos. Foto de autora.

En ambos casos se los coloco dentro de frascos color caramelo, se los tapo y se los dejo en agitación usando el agitador magnético AMC20 FAC (FABRICA DE APARATOS CIENTIFICOS S.A.), sin calefacción, por 14 días en el caso del extracto de hoja y por 7 días el de flor, (figura 13.). Pasado el tiempo, se filtró ambos al vacío con Kitasato y papel filtro para obtener el extracto crudo (figura 14), se pasó posterior a fraccionar este líquido en placas de Petri para ser secadas en estufa a 60° C por 6 días. (figura 15)



Figura 13: extractos crudos de Hoja a la derecha y de flor a la izquierda de *N. Glauca*. Foto de autora.



Figura 14: Filtrado al vacío, con Kitasato de extracto crudo de hoja de *Nicotiana glauca.*, foto de autora.



Figura 15: placa de Petri con extracto crudo de *Nicotiana glauca* en estufa. Foto de autora.

Además, se realizó la pesada del frasco contenedor del extracto seco, a través de la balanza analítica DENVER INSTRUMENT APX-200 el cual se encontraba, vacío, limpio y sin tapa.

Una vez evaporado totalmente el solvente seco, con una espátula de acero se procedió a raspar las placas de Petri para la obtención del extracto seco de *Nicotiana Glauca*, (figura 16).

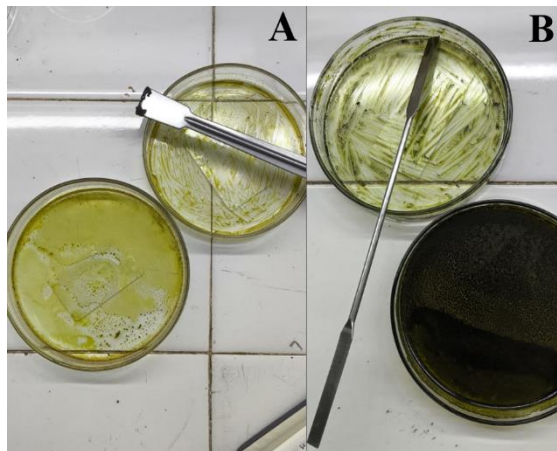


Figura 16: Obtención de extracto seco de *N. Glauca* por raspado de placas.

Foto de autora.

Se colectó los extractos secos en los frascos previamente pesados y nuevamente se realizó el mismo procedimiento de medición, mediante el instrumento ya mencionado.

Esto permitió calcular, a través de la aplicación de una diferencia (ver Ecuación 1), el valor del peso del extracto seco de *N. Glauca*.

Ecuación 1. Cálculo del peso de extracto seco de hoja de *N. Glauca*.

$$PES = PVES - PVV$$

Donde:

- PES, es el peso del extracto seco (g)
- PVES, es el peso del vial con extracto seco (g)
- PVV, es el peso del vial vacío (g)

A continuación, se rotularon los frascos con el extracto seco de hoja y de flor de *N. Glauca*, con los datos pertinentes, y se lo llevó para su conservación a 4°C, en la HELADERA PHILCO TOP MOUNT PHCT290, hasta su uso para la cromatografía.

Otro cálculo efectuado fue el porcentaje de rendimiento de la maceración del extracto seco, mediante la siguiente **Ecuación 2**:

Ecuación 2. Determinación del porcentaje de rendimiento del extracto seco de hojas y del extracto seco de flor de *N. Glauca* obtenido a partir de la maceración.

$$\% R \text{ maceración} = \frac{g \text{ obtenidos}}{g \text{ de muestra}} \times 100$$

Donde:

- %R maceración, es el porcentaje del rendimiento de extracto seco de tallo de *N. Glauca*, obtenido a partir de la maceración.
- g obtenidos, son los gramos obtenidos del extracto seco de tallo de *N. Glauca* obtenido de la Ecuación 1.
- g muestra, es el peso en gramos de partida de la droga vegetal.

4.6.2 Extracto para la utilización en las técnicas cromatográficas

Para la siembra de las placas cromatográficas se prepararon a partir de los extractos de hoja y de flor una dilución, utilizando en ambos casos una alícuota de estos y ambos se diluyeron en dos viales por separado, con 5 ml de metanol anhidro.

4.7 Volumetría

Para este ensayo se tomó como referencia al trabajo de Alghamdi, (2020). Se tomó una alícuota de 1 ml del extracto de hoja y tallo y otra de 1 ml del extracto de flor (obtenidos según lo detallado en el 4.6.1). Cada alícuota se colocó en un tubo de ensayo y se le añadieron 3 ml de agua destilada, agitando vigorosamente para asegurar la homogeneización. Este procedimiento se realizó por duplicado, con el fin de disponer de muestras para las experiencias de volumetría.

Para la determinación de alcaloides, se empleó un tubo de cada extracto y se preparó además un tubo patrón con 1 ml de atropina y 3 ml de agua destilada. A los tres tubos se les adicionó una gota de reactivo de Dragendorff, con el objetivo de evidenciar la presencia de alcaloides. (Figura 17)

Los dos tubos de ensayo restantes fueron utilizados para la determinación de taninos. A cada uno se les agregó una gota de solución de FeCl_3 , registrándose las reacciones características.

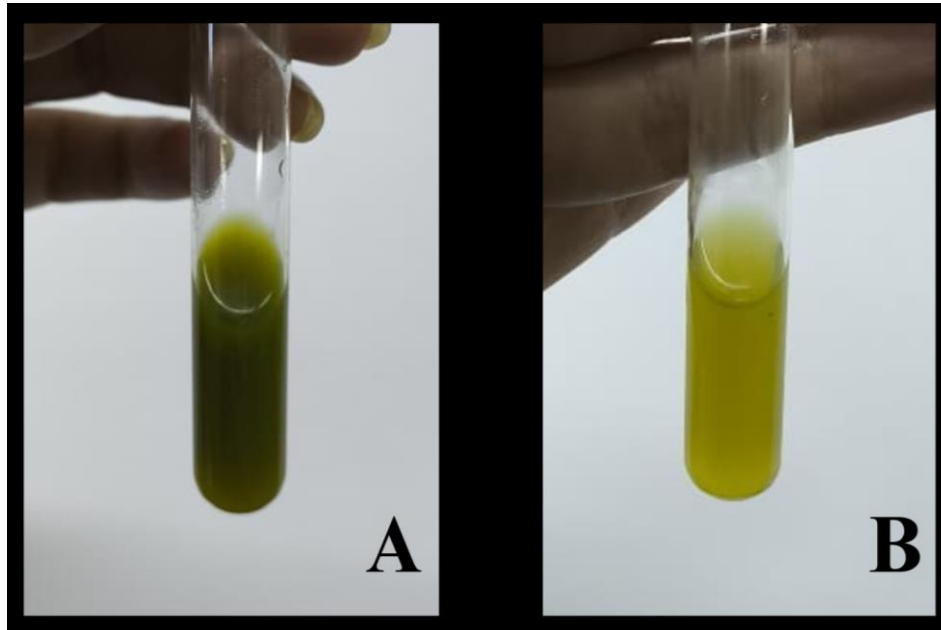


Figura 17: *extracto de hoja (A) y extracto de flor (B), previo al ensayo.*

Foto de autora.

4.8 Puesta a punto del ensayo autográfico

El extracto vegetal se ensayó por cromatografía en capa delgada (TLC) unidireccional como método de análisis preliminar de la composición química (Wagner, 1996) fue hecha a duplicado y comparándolo con rutina como patrón, utilizando revelador NP/PEG específico para determinar los flavonoides. También se determinó la capacidad antioxidante del extracto utilizando un sistema con ABTS (Zampini et al., 2010).

Seguido se realizó una corrida de TLC bidimensional para separar mejor los compuestos químicos de interés según metodología descrita en (Wagner, 1996). Para revelar la placa se utilizaron los mismos reveladores químicos que en la TLC unidimensional.

La muestra y el patrón utilizado en la TLC unidimensional, se sembró en placas DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254 para cada experimento. Las mismas se cortaron de 7 cm de alto y de 3 cm de ancho para la TLC unidimensional y de 7 cm alto x 7 cm de ancho para bidimensional, estas dimensiones fueron consideradas para permitir la siembra del extracto y una adecuada separación de los compuestos de interés. Las placas de llevaron a estufa

a 60° C, por 30 minutos, para eliminar el agua que hayan podido contener debido a su característica higroscópica y para así evitar su interferencia en la corrida.

Para la fase móvil se usó como referencia ya trabajos finales realizados en la cátedra de Farmacobotánica para la determinación de flavonoides por lo cual se utilizaron los siguientes solventes detallados en la tabla 2.

Tabla 2: *Solventes utilizados para identificación de flavonoides en TLC.*

Sistema de solventes	Componentes	Relación volumen de solventes
S1	Acetato de etilo-Ácido fórmico-Ácido acético glacial-Agua	(100:11:11:26)
S2	Ácido acético glacial-Butanol-Agua	(40:10:50)
S3	Ácido acético-Agua	(5:95)

Nota: Fuente: extraída de Wagner & Bladt, 1996.

Para la TLC unidimensional se utilizó el S1 (Acetato de etilo-Ácido fórmico-Ácido acético glacial-Agua) como fase móvil, adecuando las proporciones volumétricas de la formula acordes al uso experimental (relación 10:1,1:1,1:2,6 v/v). Figura 18

Para la TLC bidimensional se utilizó el sistema S2 (Ácido acético glacial-Butanol-Agua) para la primera corrida, con una relación 4:1:5 y el S3 (ácido acético al 5%) como fase móvil para la segunda corrida.



Figura 18: *Reactivos y elementos utilizados para realizar S1; foto de autora.*

En el caso de la TLC unidimensional, se utilizó alícuotas de 30 μL , en el borde inferior de las placas de sílice en primer lugar se depositó el patrón que en este caso el utilizado fue rutina, seguido por la alícuota de extracto de hoja y por último la del extracto de flor; el procedimiento de obtención de estos extractos se describe en el punto 4.6.2; este proceso se hizo por duplicado. Figura 19.

Luego para la TLC bidimensional se utilizó también una alícuota de 30 μL , que fueron sembradas en la parte inferior derecha de cada placa, una para el extracto de flor y una para el extracto de hoja. En ambos casos se esperó hasta que la placas estén secas para continuar con la experiencia.

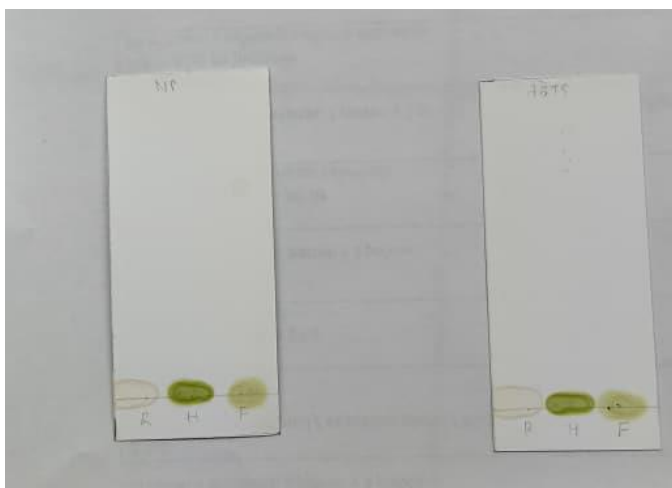


Figura 19: *Siembra de placas cromatográficas para TLC unidireccional, foto de autora.*

Tanto para la corrida de TLC unidimensional y bidimensional, se prepararon los solventes correspondientes y se los introdujo dentro de la cuba preparada para cada una, se dejó que esta se sature previo la introducción de las placas.

En primer lugar, se hizo correr la TLC unidimensional, en este caso se esperó que la FM llegue a una altura de $\frac{3}{4}$ partes de la placa finalizando la corrida. Todo este procedimiento se realizó bajo campana de gases debido a los vapores tóxicos, como se observa en la **figura 20**. (Wagner & Bladt, 1996).

Para la bidimensional se introdujo la placa en primer lugar en el S2, se dejó correr hasta que llegó a $\frac{3}{4}$ de la placa, se la retiró con pinzas y utilizando la protección adecuada, se la dejó secar y luego fue introducida a la cuba donde se encontraba el S3, (Figura 21) nuevamente se la dejó correr hasta $\frac{3}{4}$, se retiró y dejó secar para ser revelada a posteriori. Al igual que el proceso anterior fue hecho bajo la campana de gases.

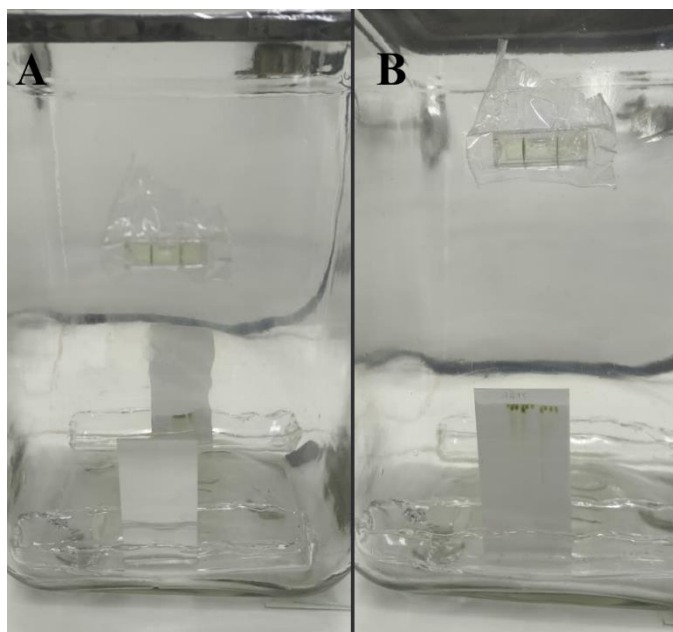


Figura 20: *Corrida cromatográfica unidimensional. A) Se aprecian ambas placas dentro de la cuba. B) muestra final de la corrida. Foto de autora.*



Figura 21: 2da corrida de TLC bidimensional. Foto de autora.

Después de que las placas secaron, los componentes separados se visualizaron con luz visible, luz ultravioleta (UV) con lámpara CAMAG® para una longitud de onda de 254 nm y 365 nm. Posteriormente se reveló las placas con el reactivo de productos naturales (NP), y luego se observaron nuevamente a luz visible, luz ultravioleta de 254 nm y 365 nm, donde se marcaron las fracciones que presentaban fluorescencia característica a la estructura química de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos. De esta forma se obtuvo el patrón de distribución de los compuestos para el material en estudio que orienta acerca de su composición cualitativa (Wagner & Bladt, 1996).

En la otra placa proveniente de la TLC unidireccional, se utilizó el revelador ABTS•+ sobre toda la placa, produciendo un atrapamiento del radical y se dejó solidificar. Luego de esto, se determinó la capacidad antioxidante del extracto por medio de visualización.

4.9 Revelado

4.9.1 Revelado físico

En primer lugar, se realizó el revelado físico donde se observó si la cromatografía corría correctamente, y éste, al no ser un método destructivo, permitía la utilización de la placa para el revelado químico. Por medio de luz visible, se marcó el final de corrida, que es la altura hasta donde llegaba la fase móvil y

hasta donde llegaron las fracciones. Luego, se observó con luz UV a 254 nm y a 365 nm, ya que estas radiaciones permiten hacer visibles los compuestos fluorescentes.

4.9.2 Revelado químico

La placa se roció con el revelador natural products (NP) específico para flavonoides y ácidos fenólicos, se secó complemente y se lo llevó a cámara UV a 254 nm y a 365 nm y se marcaron las fracciones que presentaban fluorescencia característica a la estructura química de dichos compuestos (Wagner & Bladt, 1996).

4.9.3 Actividad antioxidante

En la otra placa proveniente también de la TLC, para determinar flavonoides, los componentes separados se visualizaron con un sistema ABTS. Se pulverizo ABTS sobre toda la placa, luego de esto, se determinó la capacidad antioxidante del extracto por medio de visualización (Zampini et al., 2010).

4.10 Registros

Se llevó a cabo un análisis cualitativo de los cromatogramas obtenidos. Utilizando la TLC bidimensional se determinó la identidad de las sustancias separadas en la muestra analizada mediante la comparación de su color con bibliografías de referencia utilizadas. En cambio, con la TLC unidimensional, se determinó la identidad de las sustancias separadas en la muestra analizada mediante la comparación de su color con el patrón de referencia utilizado. Para ello se capturaron imágenes de los cromatogramas bajo diferentes condiciones de revelado físico y químico.

4.11 Resumen de los materiales utilizados

Los materiales utilizados en el desarrollo de los ensayos prácticos se detallan en la tabla 3.

Tabla 3: *Materiales utilizados en el desarrollo de los ensayos prácticos. Tabla confeccionada por la autora.*

Determinación	Materiales
Secado y molienda	Hojas, tallos y flores de <i>N. Glauca</i> Graham.

	Mortero de madera con pilón de madera, Bolsa de cierre perfecto.
Análisis Micrográfico	Hoja de bisturí, placas de Petri, Safranina, microscopio con lentes de 4X, 10X y 40X, portaobjetos y cubreobjetos, hipoclorito de sodio, agua
Volumetría	Tubos de ensayo, Agua destilada, Reactivo de Dragendorff, Pipeta, CIFE ₃ , Atropina.
Extractos	Balanza analítica Denver Instrument APX-200® de sensibilidad 0,0001 g, Viales de vidrio con tapón de goma, Agitador mecánico AMC20®, Metanol, Papel de filtro, Jeringa, Embudo de vidrio, Placas de Petri, Espátulas metálicas, Estufa DALVO modelo B.M.R®
Cromatografía en capa delgada	Micropipetas de 5 µl, Campana de gases, Cámara de cromatografía, <u>Fase estacionaria</u> : DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254 <u>Fase móvil 1</u> : acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial y agua <u>Fase móvil 2</u> : Ácido acético glacial, butanol y agua <u>Fase móvil 3</u> : Ácido acético glacial diluido

Revelados

Químicos:

Flavonoides: NP

Actividad Antioxidante: ABTS•+

Físicos:

Visible

UV 265 nm

UV 365 nm

Patrón	Quercetina
Procesamiento de los datos	Notebook Lámpara CAMAG® de UV a 265 nm y 365 nm

5 RESULTADOS

5.1 Resultado de recolección e identificación del material vegetal

Posterior a una identificación positiva por parte de la Prof. Naike González se procedió a recolectar el material vegetal consistió en partes aéreas (tallos, hojas y flores) de *Nicotiana Glauca* Graham, los cuales fueron recolectados en noviembre del año 2024 en la ciudad de Ruiz de Montoya, Misiones, Argentina.

5.2 Resultado de Acondicionamiento de droga vegetal

Se procedió según lo descripto en el apartado de materiales y métodos en el apartado 4.4 obteniendo una muestra de molienda fina y de tamaño homogéneo acorde al diseño de la experiencia.

Del secado y de la molienda se obtuvieron:

- 41,307 g de muestra comprendida de hojas y tallos.
- 2,010 g de muestra comprendida de la parte reproductiva.

5.3 Resultado de Análisis micrográfico

5.3.1 Epidermis Adaxial y abaxial

La epidermis de la lámina foliar *Nicotiana Glauca* Graham es anfiestomática, con estomas (est.) del tipo anisocítico. (Figura 22 y 23).

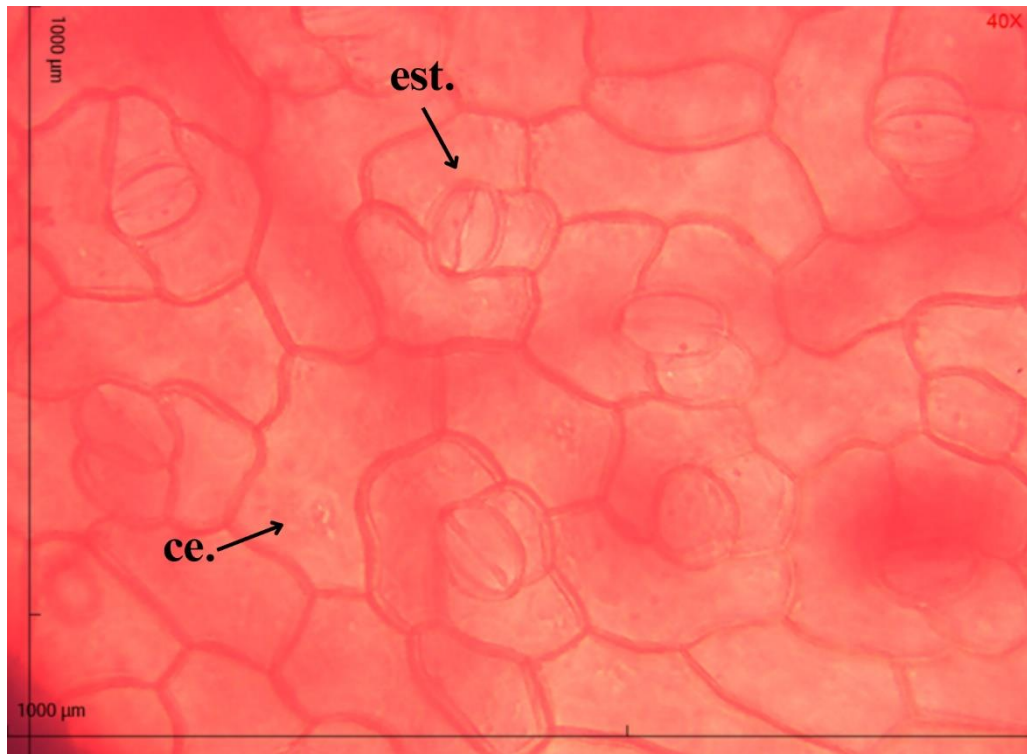


Figura 22: *Peeling de hoja abaxial, estomas anisocíticos. Foto microscopio 40 X. Foto de autora.*

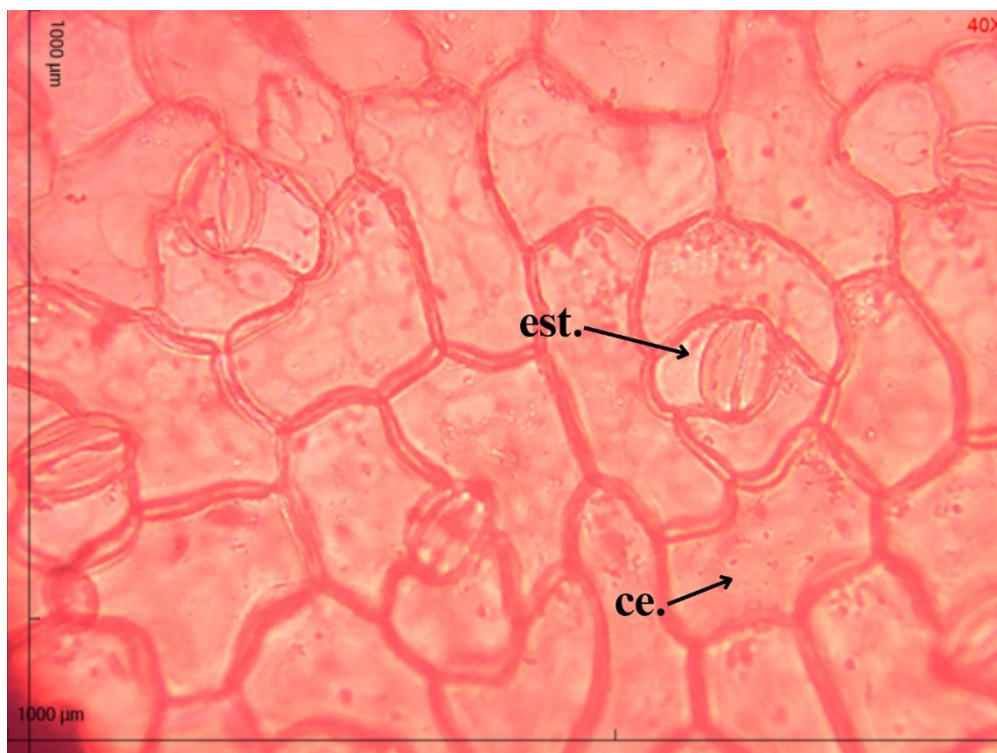


Figura 23: *Peeling de hoja adaxial, estomas anisocíticos. Foto microscopio 40 X. Foto de autora.*

5.3.2 Corte de lámina foliar

En el corte de lámina de hoja de *N. Glauca*, se puede observar la epidermis adaxial (ead.) debajo de este el parénquima en empalizada (pe.) y por la parte inferior la epidermis abaxial (eab.).

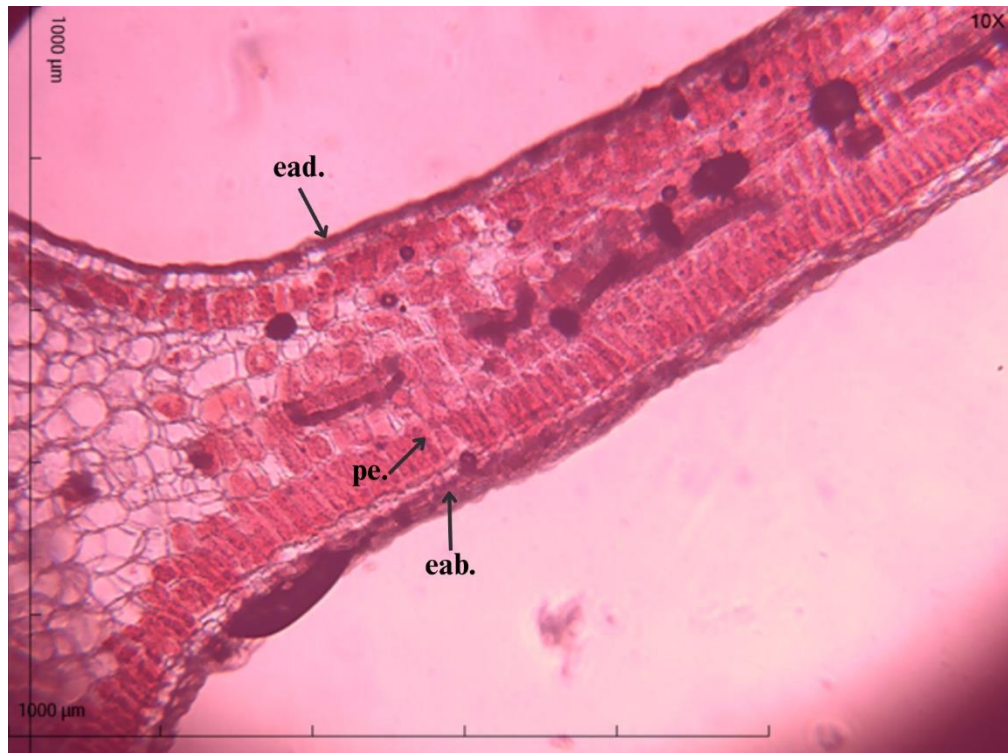


Figura 24: Corte transversal de lámina de hoja de *N. Glauca*, foto de autora.

5.3.3 Corte de la nervadura central

En el corte transversal de la nervadura central se puede observar un plano-convexo, la epidermis adaxial (ead.) uniestratificada, seguido por el parénquima empalizado (pe.), seguido del parénquima fundamental (pf.). En el centro se puede ver al sistema vascular está formado por un único haz bicolateral en forma de semiarco, el xilema (xi.) cuyo floema externo (fl.), este está organizado en estratos celulares separados por células parenquimáticas radiales. El cámbium vascular es biestratificado, y separa el floema externo del xilema, que está formado por elementos de vaso y radios parenquimáticos. Además, se puede observar idioblastos (id.) de oxalato de calcio, del tipo arena cristalina, estos se observan en el parénquima fundamental. Se puede observar también la epidermis abaxial (eab.)

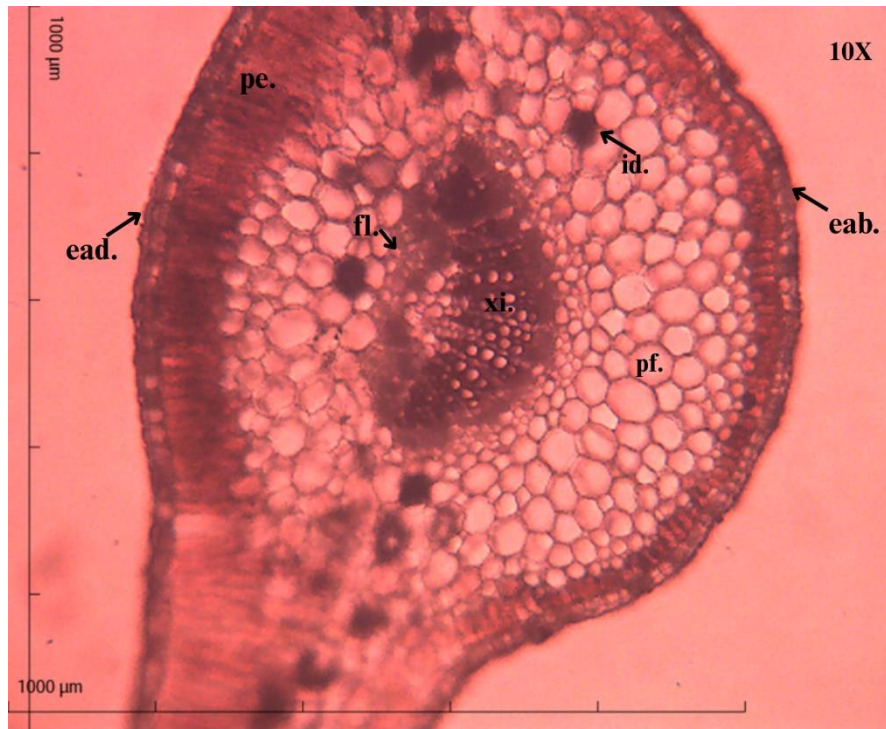


Figura 25 : *nervadura central Nicotiana Glauca vista microscopio a un aumento de 10 X. Foto de autora.*

5.3.4 Corte del borde foliar

Corte transversal de borde foliar, se puede apreciar que es arredondeado, con células epidérmicas (ce.) en la base del borde, y parénquima empalizado rodeando la base del borde (pe).

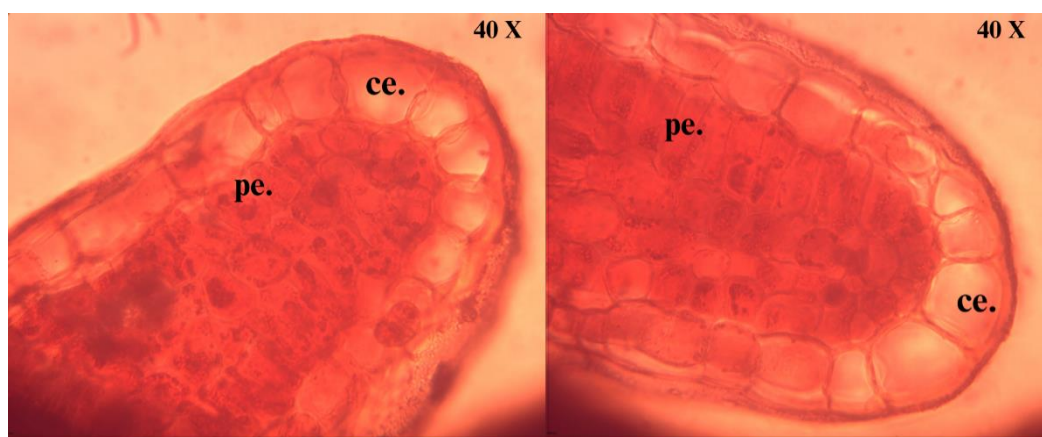


Figura 26: *borde foliar, vista microscopio 40 X. Foto de autora.*

5.3.5 Corte del peciolo

En la figura 15 se puede observar el corte transversal del peciolo, en la imagen A se puede observar desde la parte externa la epidermis, seguido del parénquima empalizado, a continuación, el colénquima (col.) y más hacia el centro el parénquima fundamental. En el centro el sistema vascular, formado por un único haz bicolateral en forma de semiarco el xilema (xi.), y el floema (fl.).

En la imagen B se puede apreciar con más detalle el arco del xilema, (xi.).

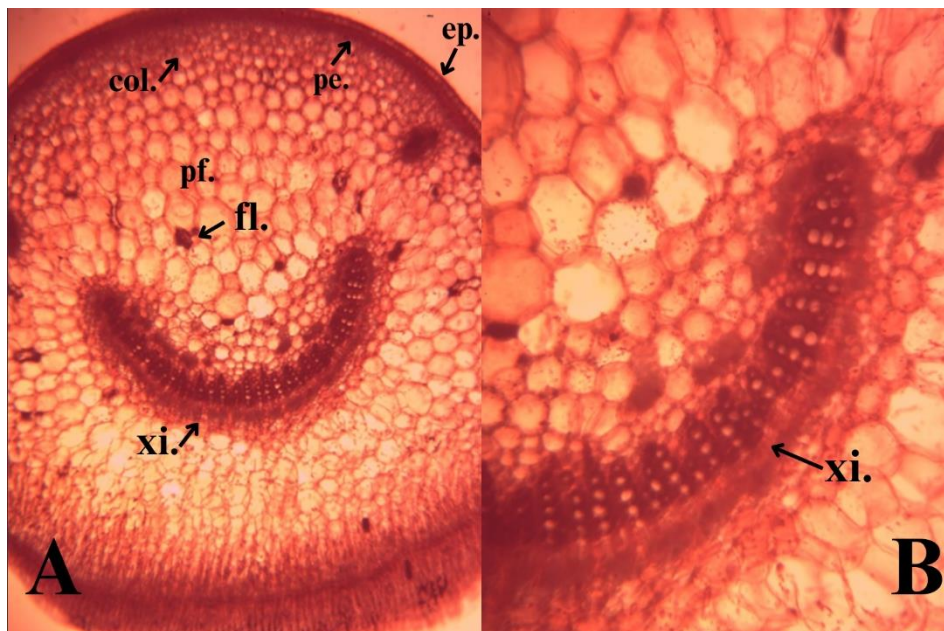


Figura 27: Corte transversal de peciolo. Foto de autor. Vista 10 X figura A, vista 40 X figura B. Foto de autora.

5.3.6 Tallo

En ambas imágenes corresponden a cortes transversales de tallo de *N. glauca*, desde la parte externa se puede observar primero la epidermis (ep.), seguido por el colénquima (col.); el haz vascular tiene forma de anillo, es de tipo anfifloica, donde el floema (fl.) rodea externa e internamente al xilema (xi.).

Al centro se puede apreciar la medula (me.) y en la figura 17 se puede apreciar un idioblasto (id.) en la medula interna del tallo.

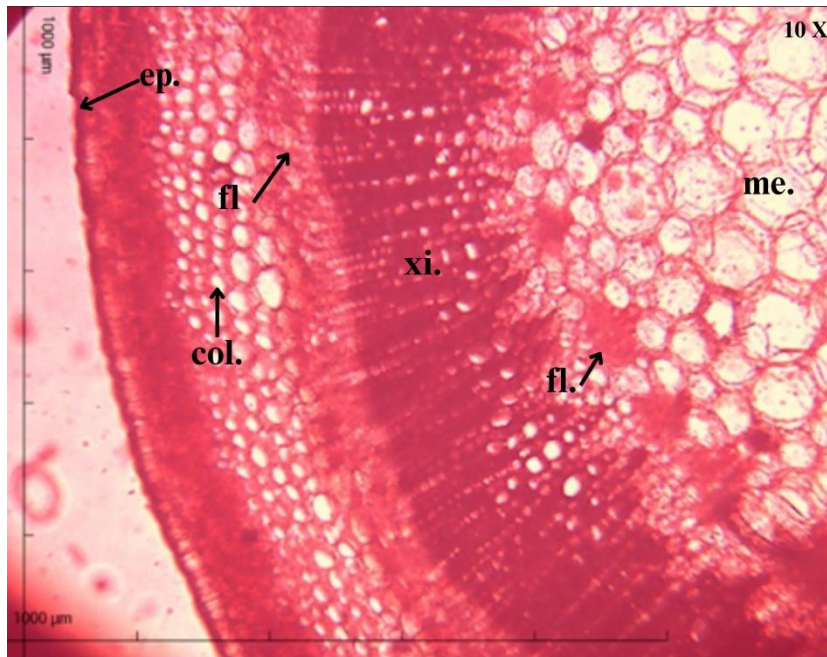


Figura 28: Corte transversal tallo *N. Glauca*. Foto de autor, vista 10 X.

Foto de autora.

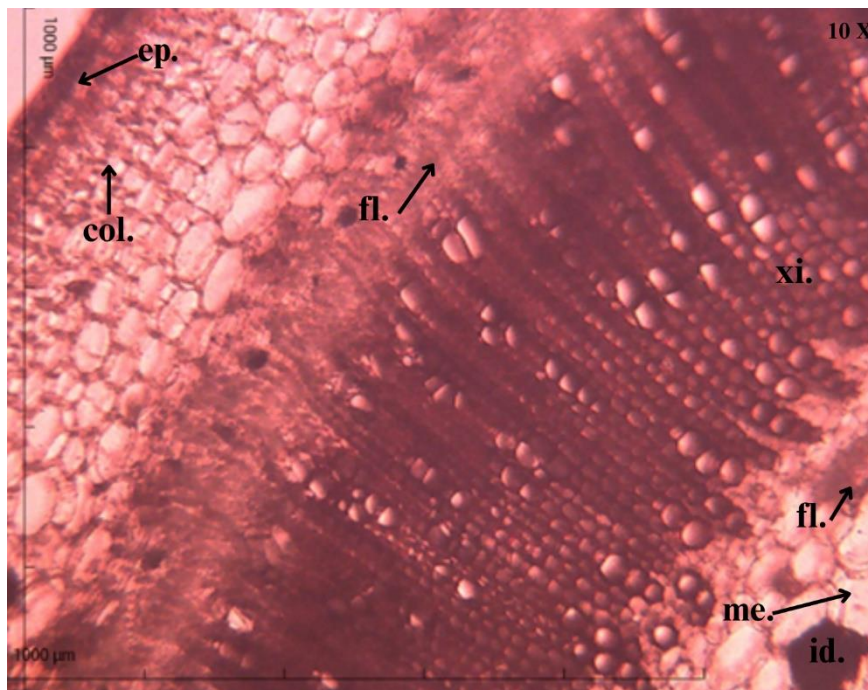


Figura 29: Corte transversal tallo *N. Glauca*. Foto de autor, vista 10 X.

Foto de autora.

5.3.7 Flor



Figura 30: Vista de lupa de flor de *N. glauca*. Vista bajo lupa. Foto de autora.

En la figura 30 A, se puede observar la flor completa compuesta por la corola tubulosa de color amarillo, el cáliz y el pedúnculo. En la figura B se puede apreciar la cubierta suave de pubescencia, en la C se observa más de cerca el cáliz acampanado, con 5 dientes triangulares.

En la figura 31 A se puede observar el Gineceo compuesto por el Estigma, estilo y ovulo; en la parte B se observa el Androceo compuesto por 5 estambres, cada uno formado por la antera y filamento.

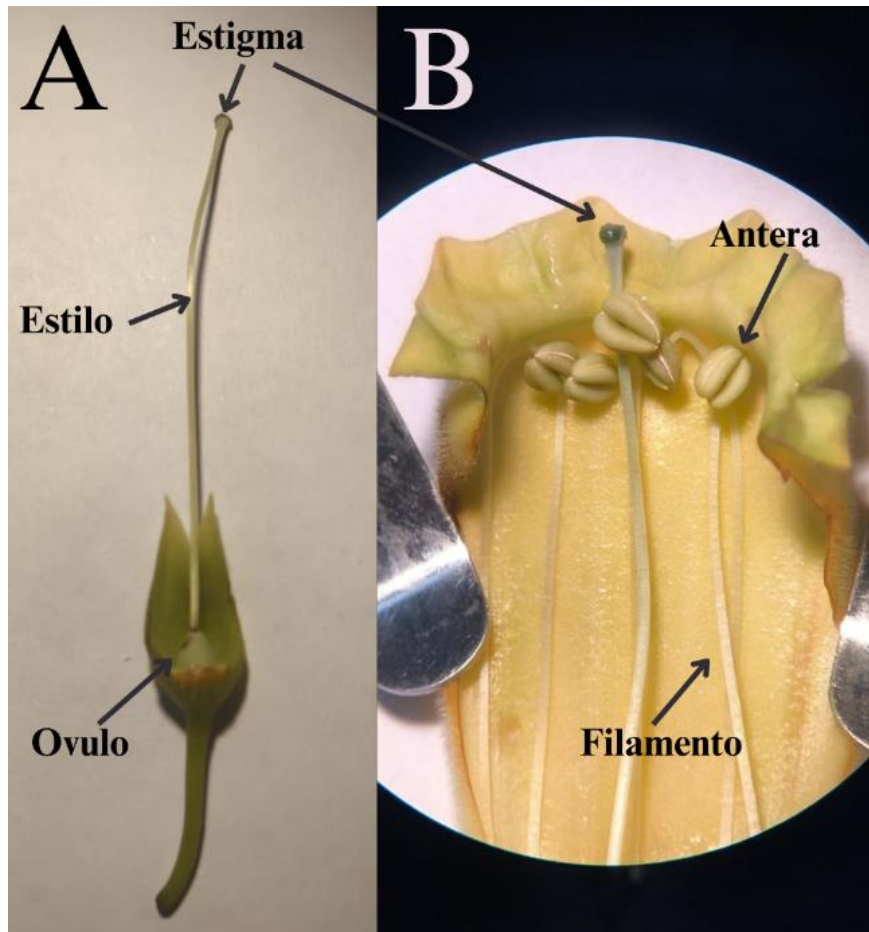


Figura 31: Gineceo (A) y Androceo (B) de flor de *N. Glauca*. Vista bajo lupa; foto de autora.

5.4 Resultado de Volumetría

Se obtuvieron los siguientes resultados:

5.4.1 Para alcaloides:

Presencia positiva tanto para el extracto de flor como el de hija y tallo, se evidencia por la aparición de un precipitado de color rojizo en los tubos de ensayo. (Figura 32).

5.4.2 Para taninos:

Resultado positivo para ambos extractos, el resultado se evidencia por la aparición de un enturbiamiento en los extractos luego de haber agregado el ClFe₃. (Figura 33).

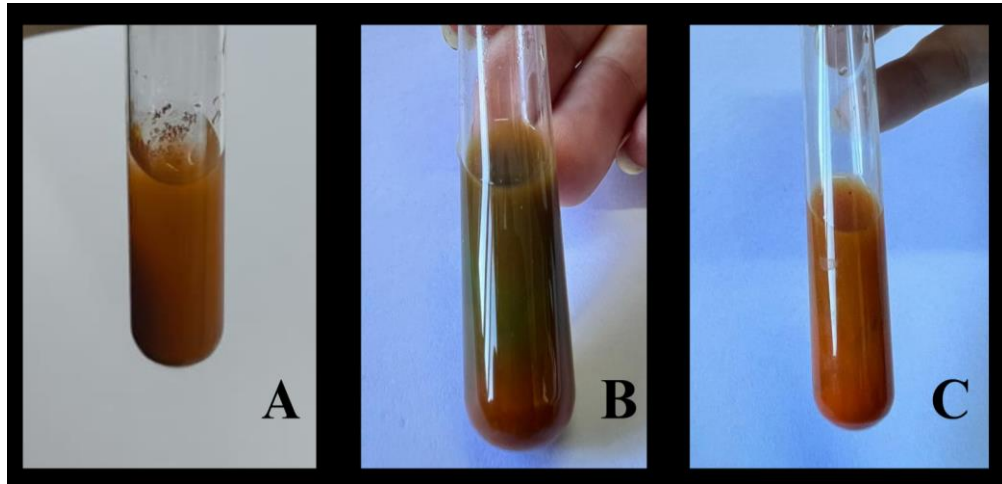


Figura 32: Volumetría positiva alcaloides; A) patrón atropina, B) extracto de hoja y tallo, C) extracto de flor. Foto de autora.

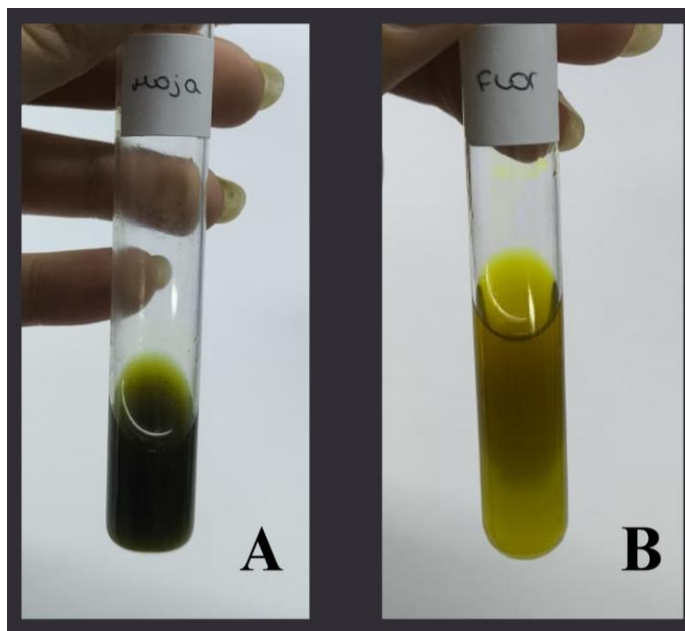


Figura 33: Volumetría positiva Taninos, A) extracto de hoja y tallo, B) extracto de flor. Foto de autora.

5.5 Resultado de Extractos

Los pesos Obtenidos como dato:

- Para el vial 1 vacío: 11,021 g. usado para el extracto de flor.
- Para el vial 2 vacío: 11,061 g. usado para el extracto de hoja.

Pesos después de haber recolectado todo el extracto:

- 11,250 g de extracto seco de flor.
- 12,478 g de extracto seco de hoja.

Esto permitió calcular, a través de la aplicación de una diferencia (ver **Ecuación 1**), el valor del peso del extracto seco de *N. Glauca*.

Ecuación 1. Cálculo del peso de extracto seco de hoja de *N. Glauca*.

$$PES = PVES - PV$$

Donde:

- PES, es el peso del extracto seco (g)
- PVES, es el peso del vial con extracto seco (g)
- PVV, es el peso del vial vacío (g)
- Peso extracto seco hoja y tallo

$$PES = PVES - PVV = 12,478 \text{ g} - 11,061 \text{ g} = 1,417 \text{ g}$$

Para el extracto de flor:

$$PES = PVES - PVV = 11,250 \text{ g} - 11,021 \text{ g} = 0,229 \text{ g}$$

Otro cálculo efectuado fue el porcentaje de rendimiento de la maceración del extracto seco, mediante la siguiente **Ecuación 2**:

Ecuación 2. Determinación del porcentaje de rendimiento del extracto seco de hojas y del extracto seco de flor de *N. Glauca* obtenido a partir de la maceración.

$$\% R \text{ maceración} = \frac{g \text{ obtenidos}}{g \text{ de muestra}} \times 100$$

Donde:

- %R maceración, es el porcentaje del rendimiento de extracto seco de tallo de *N. Glauca*, obtenido a partir de la maceración.
- g obtenidos, son los gramos obtenidos del extracto seco de tallo de *N. Glauca* obtenido de la Ecuación 1.

g muestra, es el peso en gramos de partida de la droga vegetal.

Para el extracto de tallo y hoja:

Datos:

- 1,417 g de extracto seco.
- 10 g de muestra seca de tallo y hoja.

$$\% R \text{ maceración} = \frac{g \text{ obtenidos}}{g \text{ de muestra}} \times 100$$

$$\% R \text{ maceración} = \frac{1,417 \text{ g de extracto seco}}{10 \text{ g de muestra seca}} \times 100 = \mathbf{14,170\%}$$

Para el extracto de flor:

Datos:

- 0,229 g de extracto seco.
- 2,010 g de muestra seca de flor.

$$\% R \text{ maceración} = \frac{\text{g obtenidos}}{\text{g de muestra}} \times 100$$

$$\% R \text{ maceración} = \frac{\text{g de extracto seco}}{10 \text{ g de muestra seca}} \times 100 = \mathbf{11,393\%}$$

Obteniéndose así un % de Rendimiento de maceración de 14,170% para el extracto seco de hoja y tallo; y un 11,393% para el extracto seco de flor.

5.6 Resultados de la puesta a punto ensayo autobiográfico.

Como resultado del análisis preliminar del extracto vegetal de hoja y tallo y el extracto de flor de *N. Glauca*, se pudo determinar la presencia de compuestos flavonoides y antioxidantes de la especie vegetal.

5.6.1 Compuestos flavonoides y ácidos hidroxicinámicos

En cuanto al comportamiento del perfil de polifenoles en el extracto de tallo de *N. Glauca*, fue variando la intensidad de los colores; naranja, amarillo, celeste y verde; donde un color naranja y amarillo corresponde a la presencia de flavonoides y los colores verde y celeste corresponden a la presencia de ácidos hidroxicinámicos (Harborne, 1998; Wagner & Blatt, 1996).

5.6.2 Resultados del perfil cromatográfico

5.6.2.1 TLC unidimensional

La TLC unidimensional fue realizada con el fin de ver si había presencia de flavonoides y compuestos antioxidantes en los extractos de hoja y tallo, y en el extracto de flor. En la figura 34 se puede observar las placas de corrida unidimensional previo a la aplicación de los reveladores.

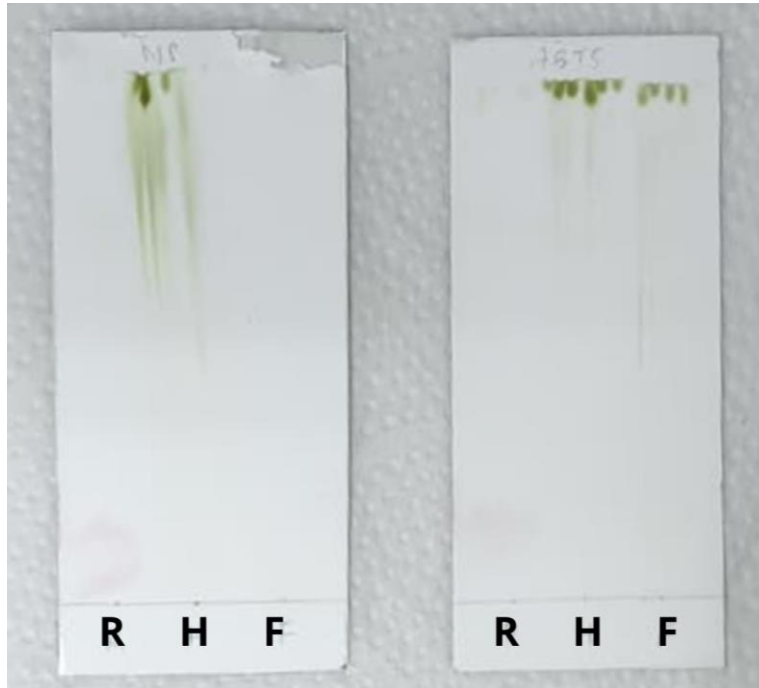


Figura 34: *corrida cromatográfica unidimensional, R (rutina), H (hoja), F (flor), foto de autora.*

5.6.2.2 Antioxidantes:

Como fue mencionado en la sección 4.9.3 de materiales y métodos se utilizó ABTS como revelador de la placa de TLC unidimensional, en la figura 35 se puede observar por la presencia de la coloración amarilla que tanto el extracto de hoja y tallo, como el extracto de flor podría tener actividad antioxidante.

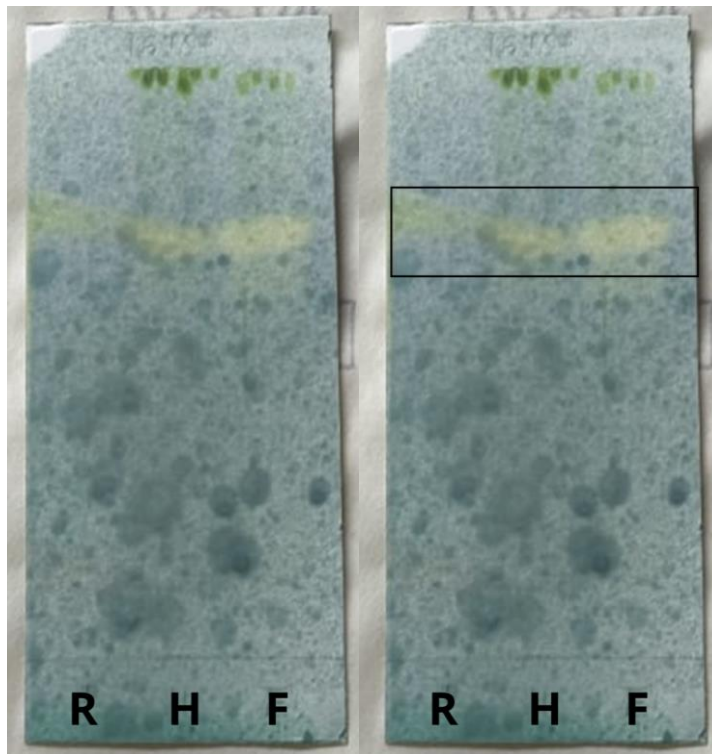


Figura 35: Revelado de placa cromatográfica con ABTS, para determinar presencia de antioxidantes. Foto de autora.

5.6.2.3 Flavonoides:

Como se puede observar en la figura 36 la placa cromatográfica revelada químicamente NP y observada bajo luz UV 365 nm, comparando con el patrón de rutina se podría decir que tanto el extracto de hoja y tallo como el extracto de flor podrían tener presencia de flavonoides, estos estarían representados por el color naranja-amarillo.

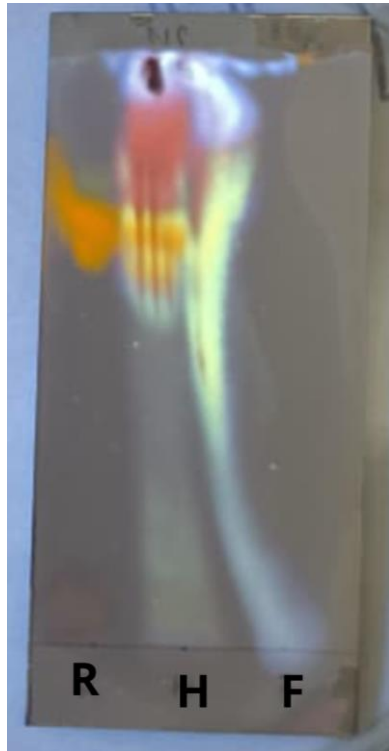


Figura 36: *Corrida cromatográfica unidimensional revelada con NP, vista bajo luz UV- 365 nm, R (patrón rutina), H (extracto de hoja), F (extracto de flor). Foto de autora.*

5.6.2.4 TLC bidimensional

Se realizó con el fin de separar mejor los compuestos de los extractos, realizando dos placas por separado uno para la corrida del extracto de hoja y tallo y otro para el extracto de flor.

Primero se realizó un revelado físico con luz UV 254 nm, se puede observar en la figura 37, según Wagner & Bladt, (1996) en las placas sometidas a revelado físico a UV 254 nm la presencia de flavonoides provoca extinción de la fluorescencia, que se ve como zonas oscuras sobre un fondo amarillo o verdoso, en este caso no se observan por revelado físico los compuestos de interés.

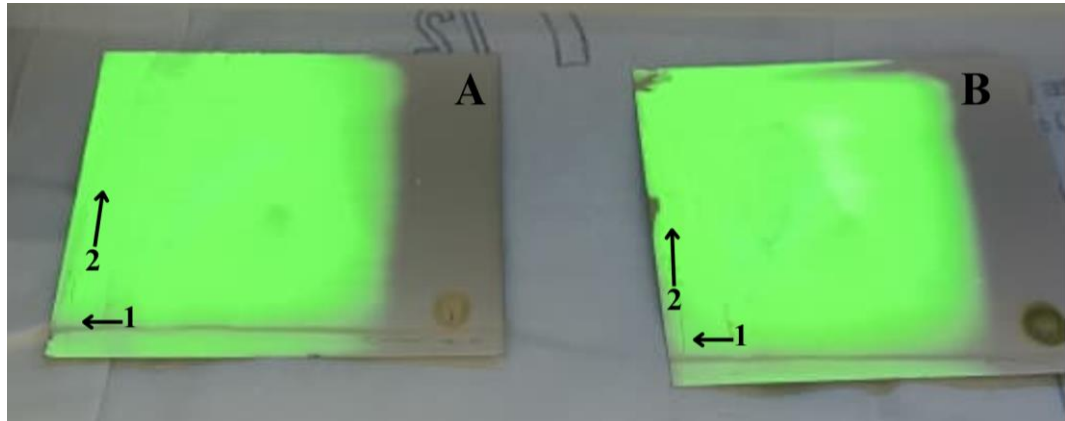


Figura 37: Revelado físico luz UV-254 nm, corrida bidimensional, A es el extracto de flor y el B pertenece al extracto de hoja y tallo. N° 1 y 2 sentido de la corrida. Foto de autora.

Seguido se hizo un revelado químico con NP y físico luz UV 356, para determinar presencia de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos.

En la figura 38 se puede observar que en la de hoja (A) se puede observar que si hay presencia de flavonoides representados por la aparición de la coloración naranja-amarrillo, además podría decir que hay presencia de ácidos hidroxicinámicos por la observación del color celeste y verde representante de estos compuestos.

En el caso de la flor (B), la presencia de flavonoides es en comparación con el de la hoja mucho menor, ya que la presencia de la franja color naranja es mucho menor, en la flor predomina los colores verde- celeste que podrían corresponder a y ácidos hidroxicinámicos.

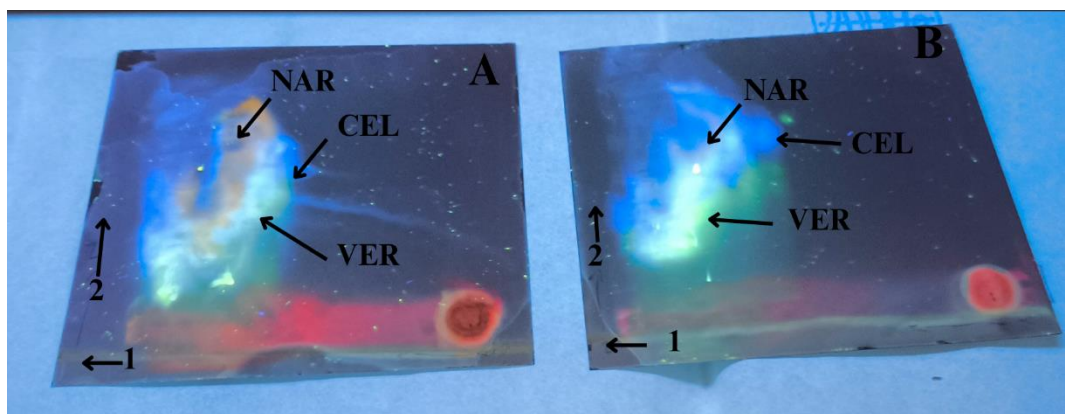


Figura 38: Revelado químico y físico Luz UV-356 nm, A extracto de hoja y tallo, B extracto de flor, NAR (naranja), CEL (celeste), VER (verde), N° 1 y 2 sentido de la corrida cromatográfica, foto de autora.

5.7 Resumen de la información obtenida a partir del revelado y registro.

5.7.1 TLC unidimensional:

5.7.1.1 Presencia de antioxidantes:

Según lo observado en la figura 35 la presencia de la franja amarillo confirma la presencia de antioxidantes.

5.7.1.2 Presencia de flavonoides:

Según lo observado en la figura 36, por la aparición de color naranja se podría confirmar la presencia de flavonoides en hoja y flor, comparando con el patrón que es Rutina.

5.7.2 TLC bidimensional

Presencia de flavonoides y compuestos hidroxycumarinicos.

Observando la figura 37 para el extracto de hoja se podría confirmar la presencia de flavonoides por la aparición de color naranja, además de la de la aparición del color verde y celeste correspondiente a compuestos hidroxycumarinicos.

En el caso de la flor la presencia de flavonoides es apenas apreciable, pero se podría decir que es rica en compuestos hidroxycumarinicos, por la presencia de color verde y celeste.

5.8 Propuesta Farmacológica

Basándonos en la detección cualitativa de alcaloides, taninos, flavonoides y compuestos hidroxycumarinicos en los extractos metanólicos de hoja y flor de *Nicotiana glauca*, así como en su demostrada actividad antioxidante, propongo el desarrollo de una formulación tópica (parche o solución) para el tratamiento de forúnculos y brotes de acné.

Esta propuesta se fundamenta en que los compuestos identificados son conocidos por sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes,

las cuales son directamente relevantes para combatir las etiologías bacterianas y la inflamación asociadas con los forúnculos y el acné.

Adicionalmente, el estudio de Alghamdi (2020) valida el potencial antimicrobiano de los extractos de hoja y flor de *Nicotiana glauca* al demostrar su actividad contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus*.

El uso tradicional de *Nicotiana glauca* en diversas regiones para el tratamiento de afecciones cutáneas similares.

Con esta propuesta se busca ofrecer una alternativa para el tratamiento de enfermedades tópicas y, en el caso de los forúnculos, brindar una opción terapéutica que no requiera antibióticos. De esta manera, se favorecería su uso únicamente cuando sea estrictamente necesario, contribuyendo así a reducir la resistencia bacteriana frente a estos fármacos.

Para la formulación tópica, se debería tener en consideración el solvente a utilizar, ya que en este trabajo se utilizó una mezcla de metanol anhidro con agua, el metanol anhidro es un compuesto que presenta toxicidad en caso de contacto con la piel, (Metanol MSDS - 106012 - Merck, s. f.), por lo cual sugeriría hacer pruebas con otros solventes como mezclas en diferentes proporciones de etanol con agua, mezclas de glicerina/propilenglicol con agua que son solventes mas seguros para el uso tópico.

La selección final del solvente o combinación de estos dependerá de rendimiento de extracción de los compuestos bioactivos deseados y la evaluación de la toxicidad del extracto resultante. Es fundamental priorizar solventes que sean GRAS (Generally Recognized As Safe) o de bajo riesgo residual para aplicaciones dérmicas.

Además, se deberían llevar a cabo ensayos de toxicidad para su aplicación tópica, ya que como se mencionó anteriormente en este trabajo la planta de *Nicotiana Glauca* es rica en alcaloides principalmente en Anabasina, y se han reportados casos de intoxicación por uso de esta planta de manera tópica como el caso informado por Imane et al. (2021). También considero que se podrían llevar a cabo ensayos donde se separen los demás compuestos (flavonoides, taninos y



ácidos hidroxianímicos) de los alcaloides y comprobar su función farmacológica por separado.

6 DISCUSIÓN

En el análisis micrográfico de *Nicotiana glauca* se observaron características anatómicas que coinciden con lo previamente reportado por Silva et al. (2007) y Rojas Pinto et al. (2019) en relación con los cortes foliares. No obstante, este trabajo incorpora observaciones que no se hallan registradas en la bibliografía consultada ni en otros estudios disponibles hasta el momento. Entre ellas, se destaca la descripción del corte transversal del tallo, en el cual se reconoce, desde la periferia hacia el centro, una epidermis uniestratificada seguida por un tejido colenquimático. El sistema vascular se dispone en forma de anillo y presenta una organización anfifloica, donde el floema rodea interna y externamente al xilema. En la región central se observa una médula prominente, en la cual pueden identificarse idioblastos, estructuras que también se evidencian en los cortes de hoja.

Asimismo, se realizó la observación bajo lupa de diversas estructuras florales, del Gineceo y el Androceo aportando información anatómica complementaria agregado al conocimiento morfoanatómico de la especie.

En cuanto al ensayo volumétrico, se evidenció la presencia de alcaloides y taninos en los extractos metanólicos de hoja y flor. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Alghamdi (2020), quien trabajó con extractos acuosos de hoja, lo que demuestra la consistencia de la presencia de estos metabolitos secundarios en diferentes condiciones de extracción.

El análisis fitoquímico permitió confirmar la actividad antioxidante, así como la presencia de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos. Mediante cromatografía en capa delgada unidimensional (TLC), se determinó que tanto la hoja como la flor contienen compuestos flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, detectados con el reactivo Natural Products (NP). Asimismo, el revelador ABTS+ corroboró la presencia de actividad antioxidante, hallazgo que resulta coincidente con lo reportado por Özdenefe et al. (2023). Cabe destacar que la mayoría de los antecedentes disponibles refieren únicamente a extractos de hoja, mientras que el presente trabajo incorpora la evaluación de extractos metanólicos de flor.

Finalmente, en la cromatografía bidimensional (TLC) se evidenció una clara diferencia en el perfil fitoquímico de los extractos. El extracto metanólico de hoja mostró una mayor proporción de flavonoides, mientras que el de flor presentó una concentración relativamente superior de ácidos hidroxicinámicos y una menor proporción de flavonoides. Estos resultados resaltan la importancia de analizar diferentes órganos de la planta, dado que cada uno presenta un perfil químico característico y potencialmente complementario.

En relación con el contenido fitoquímico, es importante considerar que las condiciones de recolección pueden haber influido en los resultados obtenidos. La muestra utilizada en este estudio fue recolectada en el mes de noviembre, en la región Ruiz de Montoya, Misiones. De acuerdo con lo descrito por Nasr (2014), tanto el tipo de suelo como el nivel de estrés hídrico al que se encuentra sometida la planta son factores determinantes en la proporción y concentración de metabolitos secundarios presentes en *Nicotiana glauca*. En este sentido, las condiciones climáticas específicas de la zona de recolección podrían haber condicionado el perfil fitoquímico observado en los extractos analizados.

Respecto a los resultados obtenidos, se puede observar que el extracto metanólico crudo de tallo de *Nicotiana Glauca* extraído a través de la maceración, es un método general y rápido, pero inespecífico, ya que extrae flavonoides tanto lipofílicos como hidrofílicos y otros compuestos solubles en metanol (Wagner y Bladt, 1996).

Como se detalló anteriormente, el método de extracción con metanol utilizado es inespecífico. Andersen y Markham (2005) detallan que, para la extracción, el disolvente se elige en función del tipo de flavonoide requerido, donde la polaridad es una consideración importante. Los flavonoides menos polares (por ejemplo, isoflavonas, flavanonas, flavonas metiladas y flavonoles) se extraen con cloroformo, diclorometano, éter dietílico o acetato de etilo, mientras que los glucósidos flavonoides y las agliconas más polares se extraen con alcoholes o mezclas de alcohol y agua.

Para la realización de este trabajo se utilizó como disolvente el metanol, un alcohol altamente tóxico y contaminante. Pero a los fines prácticos el uso de

metanol como solvente extractivo fue sencillo, permitiendo el ahorro en equipamiento y tiempo.

Para la puesta a punto del ensayo autográfico, se usó como revelador NP para compuestos flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, el propuesto por Wagner y Bladt (1996).

Si bien los solventes orgánicos empleados y los reveladores químicos utilizados resultaron adecuados para la detección de los compuestos de interés y permitieron cumplir con los objetivos del presente estudio, se debe considerar que se trata de sustancias con un grado considerable de toxicidad. En este sentido, se plantea como alternativa el uso de solventes eutécticos naturales (NADES), los cuales representan una opción más segura y sostenible. Estos solventes, alineados con los principios de la Química Verde, se destacan por su origen natural, bajo costo, facilidad de preparación y carácter biodegradable, lo que los convierte en candidatos prometedores tanto para procesos de extracción como para la preparación de reveladores cromatográficos (Espino, 2019).

En esta experiencia, si bien con la TLC tanto unidireccional como bidireccional se obtuvieron los resultados esperados, trabajar con este tipo de cromatografía, supone un desafío debido a nuestro clima, ya que en el tiempo en el que se llevó a cabo la experiencia fueron días de elevada humedad, provocando que para realizar la TLC se tenga que estar secando las placas en estufa previo a sembrado para eliminar la humedad que pudiera tener el papel utilizado en la cromatografía y adecuar el ambiente bajo la campana de extracción.

En relación con la propuesta farmacológica, los resultados obtenidos permiten sustentar la hipótesis de que *Nicotiana glauca* podría constituir una fuente de compuestos con potencial aplicación en formulaciones tópicas. La detección cualitativa de flavonoides, taninos, alcaloides y ácidos hidroxicinámicos, sumado a la confirmación de actividad antioxidante, respalda el desarrollo de productos destinados al tratamiento de afecciones cutáneas como forúnculos y acné. La elección de estas patologías se fundamenta en la relevancia clínica que presentan, dado que implican procesos inflamatorios y, en muchos casos, etiologías bacterianas que suelen requerir el uso de antibióticos. Una alternativa terapéutica basada en extractos vegetales podría contribuir a disminuir el empleo



indiscriminado de estos fármacos, reduciendo así el riesgo de generar resistencia bacteriana. No obstante, es imprescindible considerar la toxicidad inherente a *N. glauca*, principalmente asociada a la anabasina, lo que hace necesario avanzar hacia estudios complementarios que evalúen tanto la eficacia como la seguridad de formulaciones derivadas de la especie. De esta manera, el presente trabajo sienta bases preliminares para futuras investigaciones orientadas a la validación farmacológica de la planta.

7 CONCLUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo general realizar un análisis micrográfico y fitoquímico de *Nicotiana glauca* Graham.

En relación con los **objetivos específicos**, se logró acondicionar el material vegetal recolectado en la provincia de Misiones, preparar la droga mediante técnicas farmacobotánicas, elaborar los extractos metanólicos de hojas y flores y analizarlos mediante métodos cromatográficos y volumétricos.

El ensayo volumétrico permitió confirmar la presencia de alcaloides y taninos en ambos extractos, así como la existencia de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos mediante el ensayo de cromatografía en capa delgada. Asimismo, la aplicación del revelador ABTS corroboró la capacidad antioxidante de los extractos, lo cual resalta el potencial biológico de la especie.

El análisis micrográfico complementó estos hallazgos al describir características anatómicas propias de la especie, aportando registros adicionales respecto de tallos y estructuras florales, que constituyen un valor agregado al conocimiento previo.

Los resultados obtenidos muestran que los extractos de hoja presentan mayor proporción de flavonoides, mientras que los de flor contienen principalmente ácidos hidroxicinámicos, lo que evidencia perfiles fitoquímicos diferenciales según el órgano vegetal. Este hallazgo subraya la importancia de analizar distintos órganos de la planta para comprender mejor su composición química.

Como limitante, se destaca la escasez de estudios previos que utilicen cromatografía en capa delgada (TLC) en *N. glauca*, lo que dificultó comparaciones directas con otros trabajos. Otra limitante adicional es la escasez de investigaciones sobre *Nicotiana glauca* en el área farmacológica y sus posibles aplicaciones terapéuticas, ya que la mayoría de los estudios disponibles se enfocan en su uso como insecticida, fuente de biomasa o en la caracterización de su morfología.

En síntesis, se puede concluir que se cumplieron los objetivos planteados, y que *Nicotiana glauca* posee un conjunto de metabolitos secundarios de interés farmacológico, entre ellos flavonoides con actividad antioxidante. Al mismo tiempo, se resalta la necesidad de considerar su elevada toxicidad, atribuida a la



anabasina, lo que justifica la importancia de continuar investigando esta especie para evaluar tanto sus posibles aplicaciones farmacéuticas como los riesgos asociados a su uso.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Alharthi, A.S., Abd-ElGawad, A.M. & Assaeed, A.M. (2021). Influence of the invasive shrub *Nicotiana glauca* Graham on the plant seed bank in various locations in Taif region, western of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 360-370. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.10.014
- Alonso J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Rosario: Corpus, 2004.
- Andersen, O. M. (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC press.
- Arias, T. D. (1999). *Glosario de Medicamentos: desarrollo, evaluación y uso*. Pan American Health Org.
- Castorena, J. L., Garriott, J. C., Barnhardt, F. E., & Shaw, R. F. (1987). A Fatal Poisoning from *Nicotiana glauca*. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 25(5), 429–435. <https://doi.org/10.3109/15563658708992646>
- Consolini, A., Migliori G. (2005). *Cardiovascular effects of the South American medicinal plant Cecropia pachystachya (ambay) on rats*. ELSEVIER.
- DiTomaso, J.M., Kyser, G.B., Oneto, S.R., Wilson, R.G., Orloff, S.B., Anderson, L.W., Wright, S.D., Roncoroni, J.A., Miller, T.L., Prather, T.S., Ransom, C., Beck, K.G., Duncan, C., Wilson, K.A. & Mann, J.J. (2013). *Weed control in natural areas in the Western United States*. Weed Research and Information Center, University of California, 544 pp.
- Falasca, S. U. (2011). "LA MALEZA *NICOTIANA GLAUCA* (GRAHAM) COMO CULTIVO ENERGÉTICO EN SECTORES ÁRIDOS Y SEMIÁRIDOS DE ARGENTINA" . Provincia de Buenos Aires - Argentina.
- Farmacopea Argentina. (2013). 7ma. Edición. Volumen I.
- Fernández Castalón, C. (2017, 20 febrero). *Plantas medicinales: ¿cómo las usan guaraníes, criollos y polacos?* CONICET NORDESTE. Recuperado 8 de

septiembre de 2025, de <https://nordeste.conicet.gov.ar/plantas-medicinales-como-las-usan-guaranies-criollos-y-polacos/>

- Furer, V., Hersch, M., Silvetzki, N., Breuer, G. S., & Zevin, S. (2010). *Nicotiana glauca* (Tree Tobacco) Intoxication—Two Cases in One Family. *Journal Of Medical Toxicology*, 7(1), 47-51. <https://doi.org/10.1007/s13181-010-0102-x>
- Gruszycki, M., Valenzuela, G., Báez, M., Leguiza, P., Gruszycki, A., & Alba, D. (2019). Evaluación de la actividad antioxidante en extractos hidroalcohólicos de *Portulaca oleracea* L. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(2), 425-435.
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall.
- Henning, C. P., Ringuelet, J. A., & Viña, S. Z. (2013). *Compuestos secundarios nitrogenados: alcaloides*. <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/155455>
- Herrera-Fuentes, I. A., Quimis-Ponce, K. L., Sorroza-Rojas, N. A., García-Larreta, F. S., Mariscal-Santi, W., & Mariscal-Garcia, R. E. (2017, 1 agosto). Determinación de Taninos y Cumarinas presente en la planta tres filos. *Herrera-Fuentes | Polo del Conocimiento*. <https://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/257/pdf>
- Hussain, A., Zaidi, S. S., Mahmood, T., & Khan, S. A. (2014). Phytochemical composition and biological activities of *Nicotiana glauca* (Solanaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(21), 746-753.
- Imane, I., Narjis, B., Abderahim, C., Naima, A. D., Mohamed, G., Naima, R., & Rachida, S.-B. (2021). Fatal outcome following the application of *Nicotiana Glauca*.L. in the framework of the traditional pharmacopoeia. *Toxicologie Analytique Et Clinique*, 34(1), ISSN 2352-0078. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352007821001931>

ITIS - Report: *Nicotiana glauca.* (s. f.).

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=30574#null

Janakat, S., & Al-Merie, H. (2002). Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *Journal Of Ethnopharmacology*, 83(1-2), 135-138. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00241-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00241-6)

Kuklinski, C. (2000). Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de origen natural. En C. Kuklinski, *Farmacognosia*. Ediciones Omega.

LA HOZ, M. D. P. M., & del Pilar, M. (2009). *Screening fitoquímico, antimicrobiano y antioxidante de plantas pre-andinas y del altiplano Chileno* (Doctoral dissertation, Universidad de Chile).

Lahitte H, Hurrell J, Belgrano M, Jankowski L, Haloua P, Mehlreter K. *Plantas medicinales rioplatenses*. BuenosAires: LOLA, 1998.

Martínez Crovetto R. *Estudios Etnobotánicos. II. Nombres de plantas y su utilidad según los indios Vilelas del Chaco*. *Bonplandia*. 1965; 2: 123.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278.

Marzocca A. *Vademécum de malezas medicinales de la Argentina*. Buenos Aires: Orientación Gráfica, 1997.

Metanol MSDS - 106012 - Merck. (s. f.)

https://www.merckmillipore.com/AR/es/product/msds/MDA_CHEM-106012?Origin=PDP

Miranda, M., & Cuellar, A. (2012). *Farmacognosia y Productos Naturales*. Guayaquil, Guayas, Ecuador: Felix Varela

Moerman. D. 1998. *Native American Ethnobotany*. Timber Press. Oregon.

- Morel, A., Machado, E., Navarro, C., Giacomelli, S., Monache, F., 1998. A new amide from *Nicotiana glauca*. *Planta Medica* 64, 284/ 285.
- Nasr, H. (2014). *ECOLOGICAL AND PHYTOCHEMICAL STUDIES ON NICOTIANA GLAUCA FROM EGYPT*.
https://www.semanticscholar.org/paper/ECOLOGICAL-AND-PHYTOCHEMICAL-STUDIES-ON-NICOTIANA-Nasr/59c484f8953749842a36a90a9093483e84b6dec8?utm_source=chatgpt.com
- Olivera, G. C., Zavala, D., & Inungaray, M. L. (2017). Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. *Tlatemoani: revista académica de investigación*, 8(24), 71-86.
- Rasgado-Bonilla, F., Soto-Hernández, R., Conde-Martínez, V., Vibrans, H., & Cibrián-Tovar, D. (2016). Variación estacional en la composición química de resinas y aceites esenciales de *Liquidambar styraciflua* de Hidalgo, México. *Botanical Sciences*, 94(2), 331-344.
- Reichman, L., Reif, S., Elbaz, G., & Aizenberg, D. (2008). *Nicotiana glauca* poisoning. *European Journal of Internal Medicine*, 19(3), 195-197.
<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2007.03.003>
- Rioja Antezana, A. P., Vizaluque, B. E., Aliaga-Rossel, E., Tejeda, L., Book, O., Mollinedo, P., & Peñarrieta, J. M. (2018). Determinación de la capacidad antioxidante total, fenoles totales, y la actividad enzimática en una bebida no láctea en base a granos de *Chenopodium quinoa*. *Revista Boliviana de Química*, 35(5), 168-176.
- ROJAS PINTO, Y., SALINAS, J. C., SUAREZ AÑEZ, J., & AGUILAR MOLINA, F. (2019). Caracterización de la anatomía foliar y densidad estomática de *Nicotiana glauca* Graham (SOLANACEAE). *Revista Boliviana de Investigación En Ciencias Naturales- Ex Revista Agrobiofor*, 8(2).
<https://observatorioambientaluagrm.org/wp->

<content/uploads/2021/10/Revi-Boliviana-de-Invest-en-Ciencias-Nat-Vol-8-No-2-2019.pdf>

Sgariglia, M. A., Soberon, J. R., Sampietro, D. A., & Vattuone, M. A. (2010). Cromatografía: conceptos y aplicaciones.

Shishkin, P., Kleszczynska, A., & Wiśniewski, J. (2015). Anabasine, a Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist: From Poison to Potential Therapeutic Agent. *Current Neuropharmacology*, 13(6), 724-734. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666150505221946>

Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.

Zampini, I. C., Ordoñez, R. M., & Isla, M. I. (2010). Autographic assay for the rapid detection of antioxidant capacity of liquid and semi-solid pharmaceutical formulations using ABTS•+ immobilized by gel entrapment. *Aaps Pharmscitech*, 11(3), 1159-1163.

**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
**“Farmacobotánica de Nicotiana glauca (Solanaceae). Especie con posible aplicación
 farmacéutica en formulaciones tópicas”**

Da FE de la autoría y originalidad de la obra mencionada, que fue dirigida por Dr. Farm.
 Altamirano, Carlos Gustavo y Co-dirigido por Farm. López, María Belén. Presentada y
 defendida en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad
 Nacional de Misiones (FCEQyN-UNaM), el (fecha) 31/10/2025, Acta/Expdte. N°197520 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 licenciante (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).

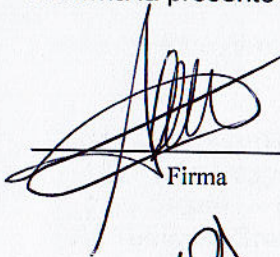
Dados personales (llenar un cuadro por cada autor)

Apellido y Nombres	Hartge, Lesley Ruth
Teléfono/Celular	3743499344
Correo electrónico	lhfacultad@gmail.com

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


Apellido y Nombres	López, María Belén
Teléfono/Celular	3757671432
Correo electrónico	mariabelenlm0@gmail.com

Se firma la presente en la Ciudad de Posadas a los 31 días del mes de Octubre de 2025.-


 Firma

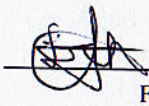
DNI 32730071
 Tipo y N° Documento

Altamirano Carlos Gustavo
 Aclaración


 Firma

39687611
 Tipo y N° Documento

Lopez Maria Belen
 Aclaración


 Firma

DNI 41.231.270
 Tipo y N° Documento

Hartge, Lesley Ruth
 Aclaración