

Trabajo científico

Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold. (Verbenaceae)

Physicochemical characterization and antioxidant activity of an *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold. (Verbenaceae) ethanolic extract

María Inés Aguado,¹ María Beatriz Nuñez,¹ Alberto José Bela,¹ Nora Beatriz Okulik,¹ Carlos Bregni²

¹Laboratorio de Farmagonosia y Farmacotecnia, Universidad Nacional del Chaco Austral, Argentina

²Universidad de Buenos Aires, Argentina

Resumen

Aloysia polystachya se usa popularmente para tratar diversas afecciones. El objetivo del estudio fue evaluar la composición química, algunas propiedades fisicoquímicas y la actividad antioxidante *in vitro* de un extracto etanólico de la especie. Los extractos conservan un mayor contenido de esencias que las infusiones o decocciones. Se detectaron cinco grupos de metabolitos (dos de ellos como trazas) y las propiedades fisicoquímicas resultaron similares a las del solvente. Se cuantificaron fenoles totales ($2,32 \pm 0,16$ mg EAG/ml E), flavonoides totales ($0,37 \pm 0,01$ mg EQ/ml E) y actividad antioxidante *in vitro* por espectrofotometría. La capacidad de captar radicales libres sería aproximadamente tres veces menor que la sustancia de referencia y la actividad antioxidante total equivaldría a 0,83 mg de Trolox/ml de extracto.

Abstract

Aloysia polystachya is popularly used to treat various conditions. The aim of the study was to evaluate the chemical composition, some physicochemical properties and *in vitro* antioxidant activity of an ethanolic extract of the species. Extracts retain a higher content of essences than infusions or decoctions. It was detected five groups of metabolites (two of them as traces) and the physicochemical properties were similar to those of the employed solvent. It was quantified total phenols (2.32 ± 0.16 mg GAE/mL E), total flavonoids (0.37 ± 0.01 mg QE/mL E) and *in vitro* antioxidant activity by UV-visible spectrophotometry. The free radical scavenging capacity would be about three times smaller than the reference substance and the total antioxidant activity equivalent to 0.83 mg of Trolox/mL extract.

Palabras clave: Capacidad antioxidante, extractos vegetales, fenoles totales, flavonoides totales.

Key words: Antioxidant capacity, herbal extracts, total content of phenols, total content of flavonoids.

Correspondencia:

Mg Farm. María Inés Aguado
Güemes 1199, CP 3700, Presidencia Roque Sáenz Peña,
Chaco, Argentina.
Teléfono: +543644440209
Email: marynes@uncaus.edu.ar

Fecha de recepción: 14 de enero de 2013
Fecha e recepción de modificaciones: 21 de julio de 2013
Fecha de aceptación: 29 de julio de 2013

Introducción

Aloysia polystachya (Griseb.) Mold. (Verbenaceae), conocida comúnmente como “burrito” en Argentina, es un arbusto perenne. Se localiza preferentemente en la región noroeste del país. También crece en Paraguay, Bolivia y Brasil.¹⁻³

Sus hojas contienen terpenos^{2,4} y la infusión de las mismas se emplea como tónico, digestivo y carminativo, para dolores de estómago y digestiones lentas,^{5,6} contra trastornos hepáticos, para el tratamiento del “empacho”⁷ y como sedativo.⁸

Los principales componentes del aceite esencial son carvona y/o tuyaona,⁹⁻¹⁴ existiendo diversos estudios que refieren bioactividad del mismo.¹³⁻¹⁸

Publicaciones relacionadas con un extracto hidroalcohólico de hojas de *A. polystachya* procedente de Paraguay,¹⁹⁻²¹ informan sobre su efecto sedante, ansiolítico y antidepresivo en ratas. También ha sido reportada la bioactividad de los extractos hexánico y etanólico sobre un coleóptero²² y los efectos antiespasmódicos de extractos acuosos y de tinturas en ratas.²³

En el presente trabajo se ajustó el método de producción de un extracto etanólico, se realizó caracterización fitoquímica elemental, determinación de algunas propiedades fisicoquímicas, cuantificación del contenido de fenoles y flavonoides y un estudio *in vitro* de la actividad antioxidante.

El objetivo fue realizar una evaluación cualitativa y cuantitativa preliminar del extracto en relación con su composición química, propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante *in vitro*. En la Farmacopea Argentina no se registran monografías de esta especie ni de preparados realizados con la misma.

Material y métodos

Obtención de la materia prima

Para la recolección, el procesado y la conservación de la materia prima se procedió de modo similar al descrito en trabajos anteriores.^{24,25} En esta oportunidad, la materia prima provino de un cultivo en tierra (vivero de la Universidad Nacional del Chaco Austral). El material utilizado consistió en una mezcla de partes iguales de vegetal de dos recolecciones realizadas en verano (primeros días de los meses de diciembre y de marzo), sometido a un período de desecación de siete días. El polvo obtenido de las hojas secas procesadas tuvo una granulometría comprendida entre 1410 y 2000 μ .

Obtención del extracto

El extracto se preparó según el procedimiento de lixiviación hidroalcohólica simple de la Farmacopea Argentina²⁶, empleando etanol (EtOH) de 70° y 100 g de polvo, usándose un lixiviador cilíndrico de vidrio oscuro (capacidad 500 ml). Para que el método general de obtención fuera más práctico, la

humectación y la maceración (con 250 ml de solvente extractivo) se realizaron en el lixiviador durante 24 hs, no se efectuó tamización ni compresión fuerte del polvo húmedo previo a la lixiviación y se practicó extracción con un volumen fijo de solvente extractivo (200 ml). El resto del proceso de obtención fue según la normativa, obteniéndose un volumen final de 100 ml de extracto, el cual fue filtrado a presión reducida. El mismo se conservó en frasco color caramelo, a temperatura ambiente, hasta el momento de su estudio.

Ensayos cualitativos

Se realizó análisis sensorial de las características organolépticas del extracto y se efectuaron reacciones químicas mediante cambios de color o formación de precipitados²⁷ para determinar la presencia de metabolitos secundarios. Las reacciones químicas realizadas al extracto fueron las siguientes: detección de triterpenos y esteroides (prueba de Liebermann-Burchard), compuestos fenólicos (ensayo con cloruro férrico al 1%), flavonoides (prueba de Shinoda), saponinas (prueba de la espuma²⁸), lactonas (reacción de Baljet), quinonas (reacción de Bornträger), lípidos y aceites esenciales (ensayo con Sudán III), aminas (ensayo con ninhidrina al 0,1%), azúcares reductores (con reactivo de Fehling), alcaloides (con reactivos de Dragendorff, de Mayer y de Bouchardat) y leucoantocianidinas (ácido clorhídrico 2 N en alcohol propílico).

Ensayos cuantitativos

A- Determinación de propiedades fisicoquímicas

Se efectuó la medición de las siguientes propiedades: densidad relativa (por picnometría), viscosidad cinemática (con viscosímetro Saybolt Jonomex® AVS 88 y según la Farmacopea Argentina²⁶) y pH (con pHmetro Altronix® modelo TPA III).

B- Cuantificación de fenoles totales y de flavonoides totales

Las determinaciones de fenoles totales, de flavonoides totales y de la actividad antioxidante fueron realizadas por espectrofotometría (espectrofotómetro Beckman DU® 640B). En la determinación del contenido de fenoles totales se efectuó la reacción colorimétrica de oxido-reducción con el reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante.^{29,30} Se utilizó una solución estándar de ácido gálico (3 mg/ml) en EtOH 70°, a partir de la cual se prepararon cinco diluciones (rango de concentración entre 0,11 y 0,95 mg/ml), con las que se construyó la curva de calibración. Para la estimación de fenoles totales, en un matraz aforado de 10 ml, se colocaron 100 μ l de cada muestra (extracto diluido 1:10 con EtOH 70°), 0,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich®, diluido 1:5), 1 ml de carbonato de sodio al 20% y agua destilada hasta llevar a volumen, agitando durante 1 min. Las soluciones resultantes se mantuvieron en reposo durante 30 min a temperatura ambiente

y en oscuridad y luego se leyeron las absorbancias a 760 nm. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por mililitro de extracto (mg EAG/ml E).

El contenido de flavonoides totales se determinó mediante el ensayo de complejación con nitrato de aluminio.³¹ Para la curva de calibración se preparó una solución de quercetina en EtOH 80° (2,7 mg/ml), de la cual se realizaron cinco diluciones (rango de concentración entre 0,13 y 1,08 mg/ml). Las muestras se prepararon de la siguiente manera: en un matraz de 10 ml se colocaron 100 μ l del extracto, 200 μ l de acetato de potasio 1 M y 200 μ l de nitrato de aluminio al 10 %, llevando a volumen con EtOH 80° y agitando durante un minuto. Se dejó reposar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 40 min y se leyó la absorbancia a 438 nm. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por mililitro de extracto (mg EQ/ml E).

C- Evaluación de la actividad antioxidante por el método del DPPH

La capacidad de captar radicales libres se cuantificó³²⁻³⁴ por la medida de la disminución de la absorbancia del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH, Sigma Aldrich®) a 517 nm en presencia del extracto. Para la construcción de la curva de calibración de DPPH se preparó una solución madre de DPPH (0,12 mg/ml) en EtOH 70°, a partir de la cual se realizaron cinco diluciones (rango de concentración entre 0,02 y 0,04 mg/ml) en idéntico solvente.

Las muestras se prepararon del siguiente modo: a volúmenes variables (entre 20 y 80 μ l) de una dilución 1:10 del extracto en EtOH 70°, se les incorporó 750 μ l de DPPH y el volumen necesario de EtOH 70° para completar 3 ml. Se mantuvo en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 10 min y luego se realizó lectura de la absorbancia. El porcentaje de inhibición del DPPH se calculó mediante la expresión:³³

% Inhibición DPPH = $[(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$, siendo A_{control} la absorbancia de la solución de DPPH y A_{muestra} , la absorbancia de cada dilución 1:10 del extracto. Los resultados se expresaron como concentración inhibitoria IC_{50} (en mg/ml), esto es, la cantidad de sustancia en 1 ml de reacción, necesaria para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH.³³ Como estándar de referencia se empleó una solución etanólica (EtOH 70°) de ácido 6- hidroxí- 2, 5, 7, 8- tetrametilcromancarboxílico- Trolox- Sigma Aldrich® (0,025 mg/ml), de la cual se utilizaron cinco diluciones (rango de concentración 1,04 a 2,08 μ g/ml).

La capacidad antioxidante se estableció como capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC), usando la siguiente expresión:³⁵ $TEAC = IC_{50 \text{ Trolox}} / IC_{50 \text{ extracto}}$ y los resultados se indicaron como miligramos equivalentes de Trolox por mililitro de extracto (mg ET/ml E).

Análisis estadístico

Todas las determinaciones cuantitativas fueron realizadas por triplicado. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Para el tratamiento estadístico de los datos se usó el programa Statgraphics Plus versión 4.0 (licencia tipo demo), realizándose el análisis de varianza (ANOVA) y el test de comparación múltiple, con un nivel de confianza del 95%.

Resultados y discusión

Ensayos cualitativos

El extracto obtenido resultó un líquido verde oscuro, opaco, con olor característico de la especie y de sabor ardiente, con un dejo dulce.

En el tamizaje fitoquímico efectuado en el extracto, tomando como criterio la intensidad de la coloración o la cantidad de precipitado formado en los respectivos ensayos, fueron detectados triterpenos/esteroides, fenoles/taninos, flavonoides y trazas de saponinas y de lactonas, en tanto que hubo ausencia de los demás metabolitos ensayados. Por otra parte, cabe acotar que, en cuanto a terpenos, en un trabajo anterior de los autores²⁵ se mencionó tanto la ausencia del componente tóxico tuyona, como la presencia de alto contenido de carvona en extractos fluidos de esta especie.

Ensayos cuantitativos

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la determinación de algunas propiedades fisicoquímicas.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del extracto

Densidad relativa a 15°C	Viscosidad cinemática a 37,8° C (centiStokes)	pH a 20°C
0,9139 \pm 1.10 ⁻⁴	1,037.10 ⁻⁴ \pm 4.10 ⁻⁶	6,95 \pm 1.10 ⁻²

Los resultados de las propiedades analizadas en el extracto mostraron valores bastante aproximados a los correspondientes al EtOH 70°.³⁶⁻⁴⁰

Las propiedades como la densidad y la viscosidad de los líquidos afectan a la transferencia de masa y de calor en las soluciones, lo cual influye en muchos procesos químicos y farmacéuticos. Así, la disponibilidad de datos relacionados con las mismas es útil en el diseño e ingeniería de tales procesos.³⁶

Además, la viscosidad cinemática suministra información sobre el grado de fluidez de un líquido;³⁷ el bajo valor de viscosidad del producto obtenido indicaría una elevada fluidez. Por otra parte, el valor del pH del extracto etanólico estuvo en concordancia con el hecho de que los alcoholes son ácidos mucho más débiles que el agua y en sistemas biológicos se considera que son neutros.⁴¹ También resultaría un indicio de las características levemente ácidas del conjunto de sustancias extraídas con EtOH de 70°.

En general, las propiedades fisicoquímicas contribuirían a corroborar la identidad del extracto, dada su estrecha relación con la composición cualitativa y cuantitativa del mismo. La caracterización fisicoquímica es parte del proceso de estandarización de un producto, fundamentalmente con vista a posteriores fines de aprovechamiento.

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la determinación del contenido de metabolitos tales como fenoles y flavonoides.

Tabla 2. Contenido de fenoles totales y de flavonoides totales en el extracto

Metabolitos	
Fenoles totales (mg EAG/ml E)	Flavonoides totales (mg EQ/ml E)
2,32 ± 0,16	0,37 ± 0,01

mg EAG/ml E: miligramos equivalentes de ácido gálico/mililitro de extracto

mg EQ/ml E: miligramos equivalentes de quercetina/mililitro de extracto

Los resultados de flavonoides totales muestran valores menores que los obtenidos para el análisis de fenoles totales, lo cual se explicaría por ser los flavonoides uno de los subgrupos de los compuestos fenólicos.

La Tabla 3 muestra los valores de la actividad antiradicalaria, indicada como IC₅₀ del extracto y de la sustancia de referencia.

Tabla 3. Actividad antiradicalaria del extracto y de la sustancia de referencia

Sustancia	IC ₅₀ (mg/ml)
Extracto	5,30.10 ⁻³ ± 1,13. 10 ⁻⁴
Trolox (concentración 0,025 mg/ml)	1,90. 10 ⁻³ ± 9,80.10 ⁻⁵

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50, miligramos de sustancia antioxidante en 1 ml de reacción, necesaria para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH³³.

Se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las medias de los valores de IC₅₀ presentados en la tabla. Dichos valores sugieren que el extracto tendría una actividad antiradicalaria aproximadamente tres veces menor que la sustancia de referencia, a la concentración utilizada en esta experiencia. Aún así, dicho extracto podría considerarse como viable para el aislamiento de sustancias activas como antioxidantes, dado que en este caso la actividad observada equivaldría al efecto total (sinérgico o no) de la mezcla de componentes del mismo.⁴²

En cuanto a la actividad antioxidante total en relación al Trolox

(TEAC-DPPH), la misma resultó ser de $8,32.10^{-1} \pm 2,52.10^{-2}$ mg ET/ml E. Esto es, cada mililitro del extracto tendría una actividad antioxidante total equivalente a la de aproximadamente 0,83 mg de Trolox. La actividad antioxidante podría atribuirse, en parte, a la presencia de polifenoles, cuya estructura química es especialmente adecuada para actuar como atrapadores de radicales libres o donadores de hidrógenos o electrones.⁴³

Existen publicaciones^{44,45} que dan cuenta del contenido de fenoles totales, de flavonoides totales y de la actividad antioxidante de extractos acuosos (infusiones y decocciones) de esta especie, empleando fenoles y flavonoides de referencia distintos a los utilizados en este trabajo. A efectos de establecer comparaciones válidas, no se han encontrado en la literatura científica referencias similares para extractos etanólicos. Lo mencionado anteriormente pondera la relevancia de la información aportada en este trabajo.

Conclusiones

El estudio del extracto etanólico de *A. polystachya* reveló la presencia de cinco grupos de metabolitos (dos de ellos en carácter de trazas) y valores de las propiedades fisicoquímicas similares a los del solvente extractivo.

El extracto tendría una capacidad captadora de radicales libres aproximadamente tres veces menor que la sustancia de referencia y una actividad antioxidante total de 0,83 mg equivalentes de Trolox por mililitro de extracto. Ello se atribuiría, en parte, a la presencia de los fenoles y los flavonoides cuantificados.

Los resultados del trabajo contribuirían a ampliar el conocimiento científico de los extractos de la especie. Sin embargo, es necesario profundizar el estudio de la composición química de los mismos y su relación con la actividad antioxidante por otras metodologías, tarea ya iniciada por el grupo de investigación.

Referencias

- Alonso J, Desmarchelier C. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. 2ª. Ed., Argentina: Ediciones Fitociencia; 2006, pp.88, 89, 91.
- Martínez Crovetto R. Las plantas utilizadas en la medicina popular en el NO de Corrientes (República Argentina). Fundación Miguel Lillo, Tucumán. Misc. 1981; (69):89.
- Souza Pina E, Da Silva Coppede J, Sartoratto A, Fachin AL, Bertoni BW, De Castro França S, Soares Pereira AM. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke grown in Brazil. J Med Plants Res 2012; 6(41):5412-5416.
- Gatto ZH, Retamar JA. Essential oil constituents of *Aloysia polystachya*. Ess Deriv Agrum. 1988; (58):16-33.

5. Ratera EL, Ratera MO. Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular. Argentina: Editorial Hemisferio Sur, S.A.; 1980, p.150.
6. Hernández M, Colares MN, Civitella M. Plantas utilizadas en medicina popular en un sector del Partido de Berisso, Buenos Aires, Argentina. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromáticas, 2009; 8(5):440-41.
7. Scarpa GF. Plantas empleadas contra trastornos digestivos en la medicina tradicional criolla del Chaco Noroccidental. Revista Dominguezia, 2002; 18(1):36-50.
8. González Torres DM. 1996. Catálogo de plantas medicinales usadas en Paraguay. Citado en Mora S, Díaz Véliz G, Millán R, Lungenstrass H, Quirós S, Coto Morales T, Hellión Ibarrola MC. Anxiolytic and antidepressant like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. Pharmacol Biochem Behav. 2005; 82:373-378.
9. Fester GA, Martinuzzi EA, Retamar JA, Ricciardi A. The Essential Oils of Cordoba and San Luis Argentina. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias. 1956; (39): 375.
10. Gatto ZH, Retamar JA, Catalán C. Essential oil of *Aloysia polystachya* and chemical rearrangement of thujone. Ess Deriv Agrum.1981; (5):109-120.
11. Huergo HH, Retamar JA. Essential oils of Tucumán province. Essence of *Aloysia polystachya*. Arch Biol Quím Farm. UNT. 1973; (18):15-18.
12. Cabanillas CM, Lopez ML, Daniele G, Zygadlo JA. Essential oil composition of *Aloysia polystachya* (Griseb) Moldenke under rust disease. Flavour and Fragr. 2003; 18(5):446.
13. Gleiser RM, Zygadlo JA. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2007; 101(5):1349-1354.
14. Juárez MA, Viturro CI, Heit C, Elechosa MA, Molina MA, Martínez AI, Molina AC, Aguirre E. Estudio del aceite esencial de *Aloysia polystachya* Griseb. Moldenke obtenido de ocho poblaciones naturales de Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 2011; (46):173.
15. López AG, Theumer MG, Zygadlo JA, Rubinstein HR. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* *Fumonisin*_{B1} production in corn grain. Mycopathologia. 2004; 158(3):343-349.
16. Benzi V, Chopa CS, Ferrero AA. Comparación del efecto insecticida de dos especies de *Aloysia* (Verbenaceae) sobre *Rhizopertha dominica* (Insecta, Coleoptera, Bostrichidae). Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromáticas. 2009; 8(2):151-153.
17. Werdin González JO, Gutiérrez MM, Murray AP, Ferrero AA. Biological activity of essential oils from *Aloysia polystachya* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae) against the soybean pest *Nezara viridula* (hemiptera: pentatomidae). Nat Prod Commun. 2010; 5(2):301-306.
18. Gleiser RM, Bonino MA, Zygadlo JA. Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2010; 108(1):69-78.
19. Mora S, Díaz Véliz G, Millán R, Lungenstrass H, Quirós S, Coto Morales T, Hellión Ibarrola MC. Anxiolytic and antidepressant like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. Pharmacol Biochem Behav. 2005; (82): 373-378.
20. Hellión Ibarrola MC, Ibarrola DA, Montalbetti Y, Kennedy ML, Heinichen O, Campuzano M, Tortoriello J, Fernández S, Wasowski C, Marder M, De Lima TC, Mora S. The anxiolytic like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. J Ethnopharmacology. 2006; (105):400-408.
21. Hellión Ibarrola MC, Ibarrola DA, Montalbetti Y, Kennedy ML, Heinichen O, Campuzano M, Ferro EA, Alvarenga N, Tortoriello J, De Lima TC, Mora S. The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. Phytomedicine. 2008; 15(6-7):478-483.
22. Ferrero AA, Gutierrez FS, Murria AP, Stefanazzi N. Bioactividad de extractos de hojas de *Aloysia polystachya* (Verbenaceae) en larvas y adultos de *Tribolium castaneum* Hernst (Coleoptera: Tenebrionidae). Bol San Veg Plagas. 2008; 34(4):501-508.
23. Consolini AE, Berardi A, Rosella MA, Volonté MG. Antispasmodic effects of *Aloysia polystachya* and *A. gratissima* tinctures and extracts are due to non-competitive inhibition of intestinal contractility induced by acetylcholine and calcium. Rev Bras Farmacogn. 2011; 21(5):889-900.
24. Aguado MI, Nuñez MB, Bela AJ, Sosa A del C, Sansberro PA. Ensayos preliminares en *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold.(Verbenaceae) y sus tinturas. Lat Am J Pharm. 2007; 26(3):411-414.
25. Aguado MI, Nuñez MB, Dudik NH, Bela AJ, Raisman JS, Sansberro PA. Diseño de comprimidos de extracto de *Aloysia polystachya* por compresión directa. Acta Farm Bonaerense. 2006; 25(2):225-230.
26. Ministerio de Bienestar Social. Farmacopea Nacional Argentina. Sexta Ed. Argentina; 1978, pp.469-471, 483-484, 629-631, 1060.
27. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. 4ª. Ed., México: Editorial Limusa; 1988, pp.42, 43, 97, 98.
28. Instituto Argentino de Normalización y Certificación. Norma IRAM 37514. Drogas vegetales. Detección de saponósidos en plantas medicinales. Argentina. 1997.
29. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 1999; (299):152-178.

30. Garcia Nava MA. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. 2007.
http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/.../56_1UAQGarciaNava.pdf. Acceso 20 Mayo 2013.
31. Lock O, Cabello I, Doroteo VH. Análisis de flavonoides en plantas. Pontificia Universidad Católica del Perú. Departamento de Ciencias. Sección Química. Lima. Perú. 2006.
http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-VI-6.pdf. Acceso 20 Mayo 2013.
32. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol Leb*. 1995; (28):25-30.
33. Lim YY, Lim TT, Tee JJ. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chem*. 2007; (103):1003-1008.
34. Yang J, Paulino R, Janke-Stedronsky S, Abawi F. Free-radical-scavenging activity and total phenols of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder in processing and storage. *Food Chem*. 2007; (102):302-308.
35. Wijngaard HH, Röble C, Brunton N. A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Chem*. 2009; (116):202-207.
36. Ethyl alcohol handbook. 6th Edition. Texas, Estados Unidos: Equistar Chemical. A Lyondell Company; 2003, p.75.
http://www.itecref.com/pdf/Ethyl_Alcohol_Handbook_Equistar.pdf. Acceso 20 Mayo 2013.
37. Khattab IS, Bandarkar F, Abolghassemi Fakhree MA, Jouyban A. Density, viscosity, and surface tension of water + ethanol mixtures from 293 to 323K. *Korean J Chem Eng*. 2012; 29(6):812-817.
28. Santanera A.N. Nuestra amiga la viscosidad. <http://www.oocities.org/tehiceentrar/Viscosidad.htm>. Acceso 20 Mayo 2013.
39. Dizechl M, Marschall E. Viscosity of Some Binary and Ternary Liquid Mixtures. *J Chem Eng Data*. 1982; (27):358-363.
40. Ficha de datos de seguridad Ethanol 70% pure TECHNISOLV - VWR International.
https://es.vwr.com/msds/es_msds/P83801es.pdf. Acceso 20 Mayo 2013.
41. Cairns D. Physicochemical properties of drugs. In: *Essentials of Pharmaceutical Chemistry*, 4th Ed. London. Pharmaceutical Press, 2012, p 59.
<http://www.pharmpress.com/files/docs/php-epc-c03-sample%20chapter.pdf>. Acceso 20 Mayo 2013.
42. Vázquez Cardeño A., Cala Molina M, Miranda I, Tafurt García G, Martínez Morales J, Stashenko E.E. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. *Scientia et Technica*. 2007; (33):205-207.
43. Gutiérrez Maydata BA. Chocolate, polifenoles y protección a la Salud. *Acta Farm Bonaerense*, 2002; 21(2):149-52.
44. Dadé MA, Fioravanti DE, Schinella GR, Tournier HA. Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromáticas*. 2009; 8(6):529-539.
45. Ricco RA, Wagner MI, Portman E, Reides C, Llesuy S, Gurni AA, Carballo MA. Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad de especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromáticas*. 2010; 9(5):388-396.