



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Farmacia - Doctorado en Ciencias y Tecnología Analítica

**DESARROLLO DE TÉCNICAS PREPARATIVAS DE SEPARACIÓN
CROMATOGRÁFICAS PARA CONFIRMAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE LAS PLANTAS CHILENAS PEUMUS BOLDUS Y BUDDLEJA
GLOBOSA MEDIANTE LA SUSTRACCIÓN QUÍMICA DE SUS
COMPUESTOS BIOACTIVOS**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias y Tecnología Analítica

POR:

JENIFFER PAULINA TORRES VEGA

Profesor Guía interno: Dra. Carola Andrea Vergara Rosales
Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Profesor Guía externo: Dr. Edgar Rafael Pastene Navarrete
Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias
Universidad del Bío-Bío

Mayo 2020
Concepción, Chile

© Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.





DEDICATORIA:

A Dios por darme la fuerza y fortaleza. A mis queridos padres Mirta Vega y Sergio Torres, por su infinito amor y preocupación. A mi hermano Sergio Torres Vega, a mi abuelito Juan Vega y mi abuelita Etelinda Seguel que me cuidan y protegen desde el cielo. Y al amor de mi vida Gonzalo Cárcamo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por regalarme la vida y por la gran oportunidad de realizar este doctorado.

A la Beca Conicyt Doctorado Nacional N° 21150990 por seleccionarme en la convocatoria del año 2015, gracias por permitir la formación de capital humano. A los proyectos Fondecyt 1150948 y Fondecip EQM 150025 los cuales contribuyeron a la realización del estudio analítico de esta tesis.

A mi querido profesor guía Dr. Edgar Pastene Navarrete, a quien tengo un infinito agradecimiento y cariño. Gracias por su tiempo, dedicación, por su paciencia, y comprensión y por el trabajo en conjunto que hicimos en esta tesis y por compartir sus experiencias en la investigación. Siempre destinó tiempo para orientarme en la realización de esta tesis, por ayudarme a cuestionar, interpretar y discutir mis resultados para lograr sacar de ellos el máximo provecho, por contribuir con su ejemplo a mi formación académica y profesional ayudándome a ser más crítica. Ha sido un honor y privilegio ser su “discípula”. Quedaran grabados en mi mente y corazón todos los consejos, pláticas, momentos y experiencias compartidas.

Un especial agradecimiento al Dr. Sergio Gómez-Alonso de la Universidad de Castilla-La-Mancha, Ciudad Real, España por permitirme realizar la pasantía en el laboratorio del Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA) y por la colaboración en la instrumentación y por la ayuda en la identificación de los compuestos, así como también agradezco al Dr. José Pérez-Navarro por su gran ayuda con las muestras y por su paciencia en enseñarme.

A la Dra. Claudia Mardones, Dra. Carola Vergara y Dietrich Vonbaer, gracias por la oportunidad, por todo lo aprendido y por creer en mí.

A la Dra Berta Schulz y Cristian Silva por su colaboración en los ensayos del cometa, también a Barbara Alarcón compañera de doctorado por su colaboración en el ensayo de la herida, muchas gracias.

A Vania y Diana por sus consejos y por siempre ayudarme, en los años del doctorado.

A mis compañeras del laboratorio de farmacognosia: Romina, Lina, Diana y Maira por todos los momentos compartidos, por sus consejos y su gran alegría.

A mi familia por su cariño y comprensión. Y a mi amor Gonzalo por su gran apoyo incondicional, sobretodo en los momentos más difíciles.

Tabla de contenidos.

Dedicatoria	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
Índice de figuras	x
Índice de tablas	xiv
Resumen	xvi
Abstract	xvii
Capítulo 1: Introducción	1
1.1. Plantas medicinales y compuestos bioactivos.....	2
1.2. Clasificación y síntesis de compuestos bioactivos.....	4
1.2.1. Compuestos fenólicos.....	5
1.2.1.1. Flavonoides.....	6
1.2.2. Alcaloides.....	7
1.3. Plantas medicinales chilenas utilizadas en la medicina popular.....	9
1.3.1. Peumus boldus Mol.....	10
1.3.1.1. Monografía.....	11
1.3.1.2. Composición química.....	11
1.3.1.3. Antecedentes farmacológicos y de actividad biológica.....	12
1.3.2. Buddleja globosa.....	15
1.3.2.1. Monografía.....	15
1.3.2.2. Composición química.....	16
1.3.2.3. Antecedentes farmacológicos y de actividad biológica.....	16
1.4. Métodos de extracción de compuestos bioactivos desde plantas medicinales.....	18
1.4.1. Métodos de extracción convencional.....	18
1.4.2. Métodos de extracción no convencional.....	20
1.4.3. Los NADES como solventes no-convencionales para la extracción de compuestos bioactivos.....	21
1.5. Aislamiento de compuestos bioactivos.....	24
1.5.1. Cromatografía contracorriente.....	25
1.5.2. Cromatografía contracorriente: modo refinamiento en la zona de pH.....	31
1.5.3. Sustracción química usando CCC.....	34
1.6. Ensayos biológicos para confirmar la actividad biológica de los extractos diseñados.....	38
1.6.1 Ensayos para evaluar la citotoxicidad.....	38
1.6.2. Ensayo del cometa para evaluar el daño en el ADN.....	39
1.6.3. Ensayos para evaluar la actividad antioxidante.....	40
1.6.3.1. Ensayo ORAC.....	40
1.6.3.2. Ensayo DPPH.....	41

1.6.4. Ensayo inhibición de la acetilcolinesterasa (ACHe)	41
2. Hipótesis y Objetivos.....	43
2.1. Hipótesis:	43
2.2. Objetivo General:	43
2.3. Objetivos específicos:	44
3. Estrategia analítica para el análisis para la sustracción química de compuestos bioactivos en plantas medicinales chilenas (boldo y matico).....	45
3.1. Obtención de los extractos ricos en compuestos bioactivos desde plantas medicinales (boldo y matico)	46
3.2. Análisis y caracterización del perfil cromatográfico.....	46
3.3. Sustracción química de los compuestos bioactivos utilizando CPC.....	47
3.4. Identificación de las fracciones sustraídas (extractos diseñados) por HPLC-DAD-QTOF	47
3.5. Ensayos de actividad biológica.....	48
4. Referencias.....	49

Capítulo 2: Sección 1, Green extraction and purification of phenolic compounds from *Buddleja globosa* (Matico) leaves using Natural Deep Eutectic Solvents and Centrifugal Partition Chromatograph.....

Abstract.....	67
1. Introduction.....	69
2. Material and methods.....	73
2.1 Plant material.....	73
2.2 Chemicals and reagents.....	74
2.3 Preparation of NADES.....	74
2.4 Extraction of phenolic compounds of <i>B. globosa</i> leaves with different NADES.....	75
2.5 Instruments and chromatographic conditions.....	76
2.5.1 Qualitative and quantitative HPLC-DAD-IT-MS/MS analysis.....	76
2.5.2 Q-ToF high-resolution mass spectrometry measurements.....	77
2.6 Centrifugal Partition Chromatography (CPC)	78
2.6.1 General procedure.....	78
2.6.2 Kd calculations.....	79
2.7 Statistical analysis.....	81
3. Results and Discussion.....	82
3.1 Qualitative analysis in <i>Buddleja globosa</i> methanol extract.....	82
3.2 Comparison of the extractability of phenolic compounds with NADES.....	96
3.3 Isolation of polyphenols from <i>B. globosa</i> by Centrifugal Partition Chromatography.....	99
4. Conclusions.....	103
Acknowledgments.....	104
References.....	105

Capítulo 2: sección 2, Evaluación de la actividad biológica de los extractos knock-out diseñados mediante la sustracción química de sus compuestos bioactivos a partir de las hojas de <i>Buddleja globosa</i> (matico).....	111
Resumen.....	111
1. Materiales y métodos.....	112
1.1. Solventes y reactivos.....	112
1.2. Material vegetal y extracción.....	112
1.3. Aislamiento de los compuestos bioactivos, mediante CPC.....	113
1.4. Identificación de los extractos diseñados por HPLC-DAD-IT-MS y HPLC-Q-TOF.....	113
1.5. Preparación de los extractos diseño para evaluar su actividad biológica.....	113
1.6. Cultivo de las líneas celulares HaCaT y HDF.....	114
1.6.1. Curva de densidad celular.....	114
1.6.2. Curva de citotoxicidad celular con DMSO y extractos de diseño....	115
1.6.3. Cuantificación celular con ensayo de sulforodamina B.....	116
1.7. Ensayo de la herida en células HaCaT y HDF.....	117
1.8. Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPHy ORAC.....	118
1.9. Análisis estadístico.....	120
2. Resultados y discusión.....	120
2.1. Extracción del material vegetal.....	120
2.2. Aislamiento de los compuestos bioactivos mediante CPC.....	120
2.3. Ensayos biológicos.....	124
2.3.1. Curva de densidad celular de células HaCaT y HDF.....	124
2.3.2. Curva de citotoxicidad celular con DMSO.....	127
2.3.3. Curva de citotoxicidad celular con extractos de diseño.....	128
2.3.4. Ensayo de la herida en células HaCaT y HDF.....	131
2.4. Capacidad antioxidante de los extractos diseñados.....	135
3. Conclusiones.....	138
4. Referencias.....	138
Material Suplementario.....	141

Capítulo 3: Sección 2, Green Extraction of Alkaloids and Polyphenols from <i>Peumusboldus</i> Leaves with Natural Deep Eutectic Solvents and Profiling by HPLC-PDA-IT-MS/MS and HPLC-QTOF-MS/MS.....	144
Abstract.....	145
1. Introduction.....	146
2. Materials and Methods.....	151
2.1. Chemicals and Reagents.....	151
2.2. Preparation of NADES.....	152
2.3. Plant material and extraction.....	152

2.4. Analysis of Extracts.....	154
2.4.1. Total Polyphenol Content.....	154
2.4.2. Qualitative and Quantitative HPLC-PDA-IT-MS/MS analysis.....	155
2.4.3. Q-ToF high-resolution mass spectrometry measurements.....	156
2.5. Statistical Analysis.....	157
3. Results and Discussion.....	158
3.1. Phytochemical profiling of <i>Peumus boldus</i> methanol extract.....	158
3.1.1. Identification of <i>P. boldus</i> phenolic compounds.....	162
3.1.2. Identification of <i>P. boldus</i> Alkaloids.....	165
3.2. Extractability of boldine from <i>Peumus boldus</i> leaves with diverse NADES.....	168
3.3. Extraction yields of total polyphenols from <i>Peumus boldus</i> leaves...	175
4. Conclusions.....	178
Acknowledgments.....	179
References	180
Supplementary material.....	188

Capítulo 3: Sección 2: Evaluación de diferentes actividades farmacológicas de los extractos de *Peumus boldus* utilizando la estrategia de sustracción química.....

Resumen.....	194
1. Materiales y métodos.....	194
1.1. Reactivos y solventes.....	195
1.2. Material vegetal.....	196
1.3. Extracción del material vegetal.....	196
1.4. Aparato de CPC.....	197
1.4.1. Refinamiento de la zona de pH usando CPC (pHZR CPC).....	197
1.4.2. Determinación del coeficiente de partición (Kd).....	198
1.5. Análisis e identificación de las fracciones.....	199
1.6. Preparación de los extractos diseños (<i>knock-out</i>).....	199
1.7. Ensayos biológicos.....	200
1.7.1. Ensayo de citotoxicidad con resazurina.....	200
1.7.2. Ensayo del cometa.....	201
1.7.3. Actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa (AChE).....	202
1.8. Determinación de la actividad antioxidante.....	203
1.9. Análisis estadístico.....	203
2. Resultados y discussion.....	203
2.1. Selección del sistema de solventes.....	203
2.2. Fraccionamiento del extracto de metanol de <i>P. boldus</i> por pHZR CPC.....	206
2.3. Análisis e identificación de las fracciones por HPLC-DAD-IT-MS/MSy HPLC-DAD-QTOF.....	208
2.4. Ensayos biológicos.....	210
2.4.1. Ensayo de citotoxicidad.....	210

2.4.2. Ensayo del cometa.....	213
2.4.3. Ensayo inhibición de la acetilcolinesterasa.....	215
2.5. Ensayos capacidad antioxidante de los extractos diseñados.....	216
3. Conclusiones.....	219
4. Referencias.....	220
Información suplementaria.....	222
Capítulo 4: Conclusiones finales.....	224



Índice de figuras.

Capítulo 1: Introducción

Figura 1: Clasificación de los metabolitos secundarios en sus tres categorías (Adaptado de Ávalos y Pérez-Urria, 2009).....	4
Figura 2: Vista esquemática del movimiento del líquido en columnas CCCA) Columnas hidrostáticas o CPC. B) Columnas hidrodinámicas (Adaptado de Berthod et al., 2009).....	28
Figura 3: El fenómeno líquido-líquido es la base de la distribución a contracorriente (y la cromatografía en contra-corriente). (Adaptado de Bojczuk et al., 2017).....	29
Figura 4: Representación esquemática de la sustracción química y la producción de extractos de DISEÑADOR. (DESIGNER). (Adaptado de Ramos et al., 2014).....	36
Figura 5: Estrategia analítica propuesta.....	45

Capítulo 2, sección 1: Green extraction and purification of phenolic compounds from *Buddlejaglobosa* (Matico) leaves using Natural Deep Eutectic Solvents and Centrifugal Partition Chromatography.

Figure 1: (A) HPLC shows UV Chromatogram obtained at 320 nm in the extract <i>Buddlejaglobosa</i> . (B) Total ion chromatogram (TIC) 100-1000 m/z of the methanolic extract of <i>Buddleja globosa</i>	83
Figure 2: Chemical structures of the identified compounds in the methanol extract of leaves <i>Buddleja globosa</i>	84
Figure 3: Most representative MS-MS spectra of <i>B. globosa</i> compounds not reported previously. The spectra correspond to: (a) caffeoylglucoside, (b) caffeoylshikimic acid, (c) B-hydroxy-verbascoside y B-hydroxy isoverbascoside, (d) quercetin-3-O-glucoside, (e) campneoside I, (f) forsythoside B, (g) lipedoside A, (h) forsythoside A, (i) eukovoside and (j) martynoside.....	95
Figure 4: HPLC-DAD chromatogram (320 nm) of phenolic compounds from <i>Buddlejaglobosa</i> leaves extracted with different solvents. Peaks 10, 12 and 13 correspond to luteolin 7-O-glucoside, forsythoside B and verbascoside, respectively.....	98
Figure 5: Extraction yields of NADESs in comparison with the control (methanol) for luteolin 7-O-glucoside (A) and verbascoside (B). Data correspond to the means \pm SD (n = 3).....	99
Figure 6: (A) Pareto chart showing the standardized effect of independent variables on the stationary phase retention response. (B) Effect of flow rate and rotation speed on stationary phase.....	101
Figure 7: (A) CPC trace of <i>B. globosa</i> extract (B) HPLC of forsythoside B (1) and verbascoside (2) isolated from <i>B. globosa</i> by CPC in ascending mode.....	102

Capítulo 2, sección 2: Evaluación de la actividad biológica de los extractos knock-out diseñados mediante la sustracción química de sus compuestos bioactivos a partir de las hojas de *Buddleja globosa* (matico).

Figure 1: Cromatograma UV obtenido de la cromatografía de partición centrifuga, del extracto total (soxhlet) de <i>Buddleja globosa</i>	121
Figure 2: Cromatograma HPLC-DAD (320 nm) de los polifenoles de las hojas de <i>Buddleja globosa</i> correspondiente al extracto total.....	122
Figure 2.a: Cromatograma HPLC-DAD (320 nm) de los polifenoles de las hojas de <i>Buddleja globosa</i> correspondiente al extracto <i>knock-out</i> 1.....	122
Figura 2b. Cromatograma HPLC-DAD (320 nm) correspondiente a las fracciones agrupadas por CPC en los tubos 8 al 12 (extracto <i>knock-out</i> 2), cuyo compuesto mayoritario es el forsitosido (compuesto 12).....	123
Figura 2c. Cromatograma HPLC-DAD (320 nm) correspondiente a las fracciones agrupadas por CPC (extracto <i>knock-down</i>). En realidad este es un <i>knock out</i> para 12 y 13.....	123
Figura 3. Curva de densidad celular de células HaCaT. Las células HaCaT fueron sembradas durante 24 horas en cantidades crecientes, para determinar la curva de densidad celular. Cada punto corresponde a cada valor de unidades de absorbancia arbitraria (u.a.) a 510 nm. A) Curva de densidad celular. B) Grafica de relación lineal entre número de células y unidades de absorbancia.....	125
Figura 4. Curva de densidad celular de células HDF. Las células HDF fueron sembradas durante 24 horas en cantidades crecientes, para determinar la curva de densidad celular. Cada punto corresponde a cada valor de unidades de absorbancia arbitraria (u.a.) a 510 nm. A) Curva de densidad celular. B) Grafica de relación lineal entre número de células y unidades de absorbancia.....	126
Figura 5. Curva de citotoxicidad de células HaCaT y HDF con concentraciones crecientes de DMSO de 0,156 a 16 % v/v. A: células HaCaT; B: células HDF. Para ambas líneas celulares se observa una citotoxicidad estadísticamente significativa sobre 1% v/v de DMSO sobre el porcentaje de viabilidad celular.....	128
Figura 6. Curva de citotoxicidad sobre células HaCaT para extractos de diseño de matico. A: Extracto total, B: <i>knock-out</i> 1. C: <i>knock-out</i> 2, D: <i>Knock-down</i>	129
Figura 7. Curva de citotoxicidad sobre células HDF para extractos de diseño de matico. A: Extracto total, B: <i>knock-out</i> 1. C: <i>knock-out</i> 2, D: <i>Knock-down</i>	130
Figura 8. Ensayo de la herida para la línea celular : A) Extracto total, B) Extracto <i>Knock-out</i> 1 C) Extracto <i>Knock-out</i> 2, D) Extracto <i>Knock-down</i> . Se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control positivo (rojo) y negativo (azul) a las 6 horas, donde el control positivo tuvo un	

efecto de cierre de herida de un $6 \pm 3,6$ % del área.....	132
Figura 9. Ensayo de la herida. A) Extracto total, B) Extracto Knock-out 1, C) Extracto Knock-out 2, D) Extracto Knock-down. El control positivo corresponde a la línea de color rojo y el negativo a la línea de color azul. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para ningún extracto respecto de los controles y respecto del tiempo analizado.....	133
Figura 10. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), la gráfica presenta el promedio \pm desviación estándar (SD) de tres replicas, para las fracciones sustraidas por CPC para el extracto de matico: extracto total, fracción <i>knock-out</i> 1, fracción <i>knock-out</i> 2 y fracción <i>knock-down</i>	137
Capítulo 3: Sección 2, Green Extraction of Alkaloids and Polyphenols from <i>Peumusboldus</i> Leaves with Natural Deep Eutectic Solvents and Profiling by HPLC-PDA-IT-MS/MS and HPLC-QTOF-MS/MS	
Figure 1. Structure of main alkaloids identified from <i>Peumusboldus</i> leaves.....	151
Figure 2. Representative HPLC-PDA trace of <i>Peumusboldus</i> leaf extract obtained with methanol. The trace corresponds to the signals recorded at 304 nm. Numbers refers to the compounds listed in Tables 1 and 2. HPLC separation was performed in reverse phase under gradient.....	159
Figure 3. Illustrative HPLC-PDA chromatograms of boldine standard (a) and <i>Peumusboldus</i> leaves extracted with NADES6 (b). HPLC-IT/MS chromatograms of boldine standard and <i>Peumusboldus</i> leaves extracted with NADES6 (c). HPLC separation was performed in reverse phase under gradient. The trace corresponds to the signals recorded at 304 nm.	170
Figure 4. HPLC-PDA chromatograms of the alkaloids from <i>Peumusboldus</i> leaves extracted with different NADES solvents. HPLC separation was performed in reverse phase under gradient. The trace corresponds to the signals recorded at 304 nm.....	171
Figure 5. Representative HPLC-ESI-IT-MS chromatograms of the alkaloids from <i>Peumusboldus</i> leaves extracted with different NADES solvents. Control solvent (methanol) correspond to the chromatogram depicted in the first frame traced in blue color.....	172
Figure 6. Effect of different NADESs on the extraction of boldine from <i>Peumusboldus</i> leaves with using heat + stirring (H+S, blue bars) and ultrasonic assisted extraction (UAE, green bars). In all extraction performed with NADES 1-7, 20% water was added to reduce viscosity. White and black bars correspond to extraction performed with water and methanol, respectively.....	173
Figure 7. Effect of different NADESs on the extraction of polyphenols from <i>Peumusboldus</i> leaves using heat + stirring (H+S, blue bars) and	

ultrasonic assisted extraction (UAE, green bars). In all extraction performed with NADES 1λ7, 20% water was added to reduce viscosity. White and black bars correspond to extraction performed with water and methanol, respectively.....	178
Figure S1: MS-MS spectra of <i>P. boldus</i> alkaloids. The spectra correspond to: (a) coclaurine, (b) <i>N</i> -methylcoclaurine, (c) laurilitsine, (d) isoboldine, (e) boldine, (f) reticuline, (g) isocoridine,(h) laurotetanine (i) <i>N</i> -methyllaurotetanine.....	190
Figure S2: HPLC-PDA-QTOF-MS of <i>P. boldus</i> . UV trace is at 280 nm.....	191
Figure S3: QTOF MS/MS spectra of <i>P. boldus</i> alkaloids. The spectra correspond to: (a) coclaurine, (b) <i>N</i> -methylcoclaurine, (c) laurilitsine, (d) isoboldine, (e) boldine, (f) reticuline, (g) isocoridine, (h) laurotetanine (i) <i>N</i> -methyllaurotetanine.....	191
Figure S4. General scheme of fragmentation for isoquinoline alkaloids identified in <i>P. boldus</i> . Numbers between round brackets correspond to the alkaloids listed in Table 1 and 2 in the main manuscript.....	192
Figure S5. General scheme of fragmentation for aporphine alkaloids identified in <i>P. boldus</i> . Numbers between round brackets correspond to the alkaloids listed in Table 1 and 2 in the main manuscript.....	193

Capítulo 3: Sección 2: Evaluación de diferentes actividades farmacológicas de los extractos de *Peumus boldus* utilizando la estrategia de sustracción química.

Figura 1. Registro de un refinamiento de zona de pH obtenido desde CPC, de la separación del extracto metanólico de <i>Peumus boldus</i> , cuyo peak a los 30 minutos corresponde al extracto <i>knock-out</i> polifenoles (solo con alcaloides) y alrededor de los 5 minutos al del extracto <i>knock-out</i> alcaloides (solo con polifenoles).....	207
Figura 2. Cromatograma UV, en el extracto total de metanol (650 ppm) de <i>P. Boldus</i> usando un HPLC-DAD-IT-MS obtenido a 304 nm.....	209
Figura 3. Cromatograma UV del extracto <i>knock-out</i> alcaloides (polifenoles) de 700 ppm de <i>P. boldus</i> usando un HPLC-DAD-IT-MS obtenido a 304 nm.....	209
Figura 4. Cromatograma UV del extracto de <i>knock-out</i> polifenoles de <i>P. boldus</i> usando un HPLC-DAD-IT-MS obtenido a 304 nm.....	210
Figura 5. Efecto citotóxico de las fracciones de <i>P. boldus</i> en células AGS.	211
Figura 6. Imágenes del daño en el ADN observado después del tratamiento de células de linfocitos humanos con extracto diseñados de <i>P. boldus</i> a) Control; b) peróxido de hidrógeno (100 μM); c1) <i>knock-out</i> (alcaloides) 0.28 mg/mL, c2) <i>knock-out</i> (alcaloides) 0.56 mg/mL d1) <i>knock-out</i> alcaloides (polifenoles) 0.983 mg/mL, d2) <i>knock-out</i> alcaloides (polifenoles) 1.97 mg/mL y e) extracto total (0.50 mg/mL).....	214
Figura 7. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) usando fluoresceína como sonda. Para las fracciones sustraídas por	

refinamiento de la zona de pH- CPC para el extracto de total de boldo, fracciones <i>knock-out</i> polifenoles (alcaloides), <i>knock-out</i> alcaloides (polifenoles) y boldina estandar. (n=3)	218
--	-----

Indice de tablas

Capítulo 1: Introducción

Tabla 1: Ejemplo de algunos compuestos bioactivos extraidos mediante diferentes solventes orgánicos (adaptado de Cowan (1999)).....	19
--	----

Capítulo 2: sección 1, Green extraction and purification of phenolic compounds from *Buddlejaglobosa* (Matico) leaves using Natural Deep Eutectic Solvents and Centrifugal Partition Chromatography.

Table 1: Composition of the natural deep eutectic solvents (NADES) used in the present study.....	75
Table 2: Partition coefficients (KD) of compounds 12 and 13 in two-phase solvent systems.....	81
Table3: Identification of targeted phenolic compounds by LC-IT-MS-MS for phenolic compounds from <i>B.globosa</i>	85
Table 4: Identification of targeted phenolic compounds by LC-ESI-QTOF/MS-MS for phenolic compounds from <i>B. globosa</i>	87
Tabla 1S: HPLC-DAD-QToF de la fracción <i>knock-out</i> 1 obtenida de la separación por CPC.....	130
Tabla 2S: HPLC-DAD-QToF de la fracción <i>knock-out</i> 2 obtenida de la separación por CPC.....	131
Tabla 3S: HPLC-DAD-QToF de la fracción <i>knock-down</i> obtenida de la separación por CPC.....	131

Capítulo 2, Sección 2: Evaluación de la actividad biológica de los extractos *knock-out* diseñados mediante la sustracción química de sus compuestos bioactivos a partir de las hojas de *Buddleja globosa* (matico)

Table 1: DPPH para las fracciones aisladas por CPC para el extracto dematico: extracto total, fracción <i>knock-out</i> 1, fracción <i>knock out</i> 2 y fracción <i>knock-down</i> . (n=3)	136
Tabla 1S: HPLC-DAD-QToF de la fracción <i>knock-out</i> 1 obtenida de la separación por CPC.....	141
Tabla 2S: HPLC-DAD-QToF de la fracción <i>knock-out</i> 2 obtenida de la separación por CPC.....	142
Tabla 3S: HPLC-DAD-QToF de la fracción <i>knock-down</i> obtenida de la separación por CPC.....	142

Capítulo 3, sección 1: Green Extraction of Alkaloids and Polyphenols from *Peumusboldus* Leaves with Natural Deep Eutectic Solvents and Profiling by HPLC-PDA-IT-MS/MS and HPLC-QTOF-MS/MS

Table 1. Alkaloids identified from <i>P. boldus</i> with the high-performance liquid chromatography coupled with Ion Trap mass spectrometry (HPLC-IT-MS/MS) method in positive ionization mode.....	160
Table 2. Alkaloids identified from <i>P. boldus</i> with the high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight high-resolution mass spectrometry (HPLC-QTOF-MS/MS) method in positive ionization mode.....	161
Table 3. Composition of the Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) used in the present study.....	169
Table 4. Bibliographic data on the efficiency of various methodologies regarding boldine recovery from <i>P. boldus</i>	169
Table S1: HPLC IT-MS and MS/MS data for <i>P. boldus</i> phenolics compounds and their proposed structures.....	188
Table S2: HPLC QTOF-MS for the phenolics compounds of <i>P. boldus</i> and their proposed structures.....	189

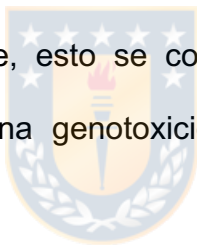
Capítulo 3, Sección 2: Evaluación de diferentes actividades farmacológicas de los extractos de *Peumus boldus* utilizando la estrategia de sustracción química.

Tabla 1. Experimentos de refinamiento de zona de pH 1 al 3, sistema de solventes usando n-heptano: acetato de etilo: n-propanol y agua (1: 3: 1: 3 v/v/v/v) con diferentes concentraciones de retenedor y desplazante.....	205
Tabla 2. Coeficiente de partición para el alcaloide.....	206
Tabla 3. Alcaloides identificados en el extracto <i>knock-out</i> polifenoles (alcaloides) mediante HPLC-QTOF-MS/MS) modo de ionización positivo..	210
Tabla 4: Daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes dosis de control, peroxido de hidrogeno (control positivo) y los extractos diseñados <i>knock-out</i> polifenoles (alcaloides), <i>knock-out</i> alcaloides (polifenoles) y el total (soxhlet) de hojas de <i>Peumus boldus</i> , (n=3, *p<0.05).....	214
Tabla 5. Inhibición de la acetilcolinesterasa.....	215
Tabla 6: Resultados del ensayo DPPH de las fracciones sustraídas mediante refinamiento de la zona de pH-CPC, para las el extrato total (obtenido por soxhlet), fracción <i>knock-out</i> alcaloides (polifenoles), <i>knock-out</i> polifenoles (alcaloides), (n=3)	217
Tabla 1S: HPLC-DAD-IT-MS/MS para la fracción <i>knock-out</i> alcaloides (polifenoles) de <i>P. boldus</i>	221

Resumen

Las plantas medicinales *Peumus boldus* (boldo) y *Buddleja globosa* (matico) son ampliamente utilizadas en medicina popular, debido a que producen metabolitos secundarios que serían los responsables de sus actividades biológicas. Los solventes naturales eutécticos profundos (NADES) tuvieron una buena eficiencia para extraer polifenoles desde el matico (verbascosido y 7-O-glucósido de luteolina) siendo el NADES L-prolina: ácido cítrico y cloruro de colina: 1,2-propanodiol los solventes más efectivos. Así también para el boldo se obtuvieron buenos resultados para la extracción de alcaloides siendo el NADES Prolina: ácido oxálico el que mostró mayor aumento en la extracción de boldina superando 8 veces a la extracción con metanol. Por otro lado, debido a que no está 100% comprobado la actividad de boldo y matico, es que se decide sustraer selectivamente sus compuestos bioactivos utilizando CPC y refinamiento zona de pH-CPC, pudiendo de esta forma aislar los alcaloides (*knock-out* polifenoles) y los polifenoles (*knock-out* alcaloides). Un total de 9 alcaloides fueron identificados y 22 polifenoles para el boldo y para el matico se pudo sustraer 3 fracciones denominadas *knock-out* 1 (extracto que contiene verbascósido como compuesto mayoritario), *knock-out* 2 (extracto que contiene forsitósido como compuesto mayoritario) y *knock-down* (extracto reducido en fenilpropanoides) y también se identificaron 17 compuestos, de los cuales 13 es primera vez que han sido reportados. La identidad de estos compuestos se confirmó a través de HPLC-Q-TOF. De los

extractos diseñados para el matico se comprobó que el compuesto forsithoside B, tiene un gran poder antioxidante al igual que el verbascosido, por lo que esté compuesto también contribuye a está actividad, con respecto a los ensayos celulares (migración celular) no permitieron evidenciar efectos claros para ninguno de los extractos. Por otro lado, los extractos diseñados de boldo permitieron comprobar que el extracto alcaloideo presenta una citotoxicidad y genotoxicidad moderada y también para la actividad inhibitoria en el ensayo inhibición de la acetilcolinesterasa. Por otro lado, se pudo corroborar que los polifenoles presentes en el boldo serían los responsables de su actividad antioxidante, esto se comprobó en el ensayo cometa en donde estos no tuvieron una genotoxicidad significativa, sino que tienen efectos citoprotectores.



Abstract

The medicinal plants *Peumus boldus* (boldo) and *Buddleja globosa* (matico) are widely used in folk medicine, because they produce secondary metabolites that would be responsible for their biological activities. The Natural deep eutectic solvents (NADES) had a good efficiency to extract polyphenols from leaves matico (verbascoside and luteolin 7-O-glucoside) with NADES L-proline: citric acid and choline chloride: 1,2-propanediol being the most effective solvents. Likewise, for boldo, good results were obtained for the extraction of alkaloids, with NADES proline: oxalic acid showing the greatest

increase in boldin extraction, exceeding 8 times that of methanol extraction. On the other hand, since the activity of boldo and matico is not 100% verified, it is decided to selectively subtract their bioactive compounds using CPC and CPC-refinement pH zone, thus being able to isolate the alkaloids (*knock-out* polyphenols) and polyphenols (*knock-out* alkaloids). Also, a total of 9 alkaloids were identified and 22 polyphenols for boldo. For the matico was obtained 3 fractions called *knock-out* 1 (extract containing verbascoside), *knock-out* 2 (extract containing forsytoside as the main compound) and knock-down (extract reduced in phenylpropanoids) using CPC and a total of 25 compounds were also identified, of which 17 is the first time that they have been reported. The identity of these compounds was confirmed through HPLC-Q-TOF. From the extracts designed for the matico, it was found that the compound forsithoside B, has a great antioxidant power as well as the verbascoside, so that this compound also contributes to this activity, with respect to cell assays (cell migration) did not allow evidence clear effects for none of the extracts. On the other hand, it was possible to corroborate that the polyphenols present in boldo would be responsible for its antioxidant activity, this was verified in the comet trial where they did not have significant genotoxicity, but rather have cytoprotective effects.

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN



1.1. Plantas medicinales y compuestos bioactivos

La historia de las plantas usadas por la humanidad es tan antigua como el comienzo de la humanidad. Inicialmente, las personas usaron las plantas para sus propósitos nutricionales pero después del descubrimiento de sus propiedades medicinales, esta flora natural se convirtió en una fuente útil para la curación de enfermedades y mejora de la salud. En el siglo XIX la Farmacopea Rumana introdujo productos herbarios, y en 1904 se estableció el primer Instituto de Hierbas Medicinales en la ciudad de Cluj (Vinatoru, 2001). El uso de plantas en la antigüedad ilustra la historia de las moléculas bioactivas. En el pasado, la comunidad no tenía conocimiento de moléculas bioactivas, pero el uso de estos compuestos era lo suficientemente diverso en diferentes perspectivas. Tradicionalmente, los compuestos bioactivos de las plantas se producen como metabolitos secundarios (Bernhoft, 2010). Cada organismo vivo, desde una bacteria a millones de plantas, procesan diversos compuestos químicos para su supervivencia y subsistencia. Todos los compuestos del sistema biológico se pueden dividir en dos amplias áreas. Uno de ellos son los metabolitos primarios, que corresponden a las sustancias químicas dirigidas al crecimiento y desarrollo, tales como carbohidratos, aminoácidos, proteínas y lípidos. Otro es el de los metabolitos secundarios, que son un grupo de compuestos distintos de los metabolitos primarios que ayudan a las plantas a aumentar su capacidad general para

sobrevivir y superar los desafíos locales, permitiéndoles interactuar con su entorno (Harborne, 1993). A diferencia de los metabolitos primarios como la clorofila, los aminoácidos, los nucleótidos etc., los metabolitos secundarios no tienen un papel fundamental en procesos tales como la fotosíntesis o la respiración celular. Durante muchos años se pensó que los metabolitos secundarios no tenían función alguna o que eran productos finales o de desecho del metabolismo de la planta. Sin embargo, en los dos últimos siglos (XIX y XX) estos compuestos llamaron la atención de los químicos por su importancia como sustancias medicinales, venenos, saborizantes y material industrial. Diversos autores han sugerido que muchos de los metabolitos secundarios desempeñan un papel importante en las plantas protegiéndolas contra el ataque de herbívoros, insectos, y microorganismos patógenos, además de servir como sustancias atrayentes para polinizadores (Tahara, 2007; Bhooshan y Rizvi, 2009; Kliebenstein y Osbourn, 2012).

Los metabolitos secundarios tienen efecto sobre los sistemas biológico, y se consideran bioactivos. Los compuestos bioactivos pueden definirse como aquel conjunto de sustancias naturales que ejercen una actividad biológica que conduce a efectos metabólicos asociados con propiedades beneficiosas sobre la salud, como pueden ser la mejora de ciertas funciones en el organismo o la reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad. Así, una definición simple de compuestos bioactivos en plantas es: metabolitos de

plantas que producen efectos farmacológicos o toxicológicos en humanos y animales (Bernhoft, 2010).

1.2. Clasificación y síntesis de los metabolitos secundarios

Desde el punto de vista de la biosíntesis es posible clasificar a los metabolitos secundarios en tres grupos distintos (Fig. 1). Terpenos o terpenoides, alcaloides (compuestos que contienen nitrógeno) y los compuestos fenólicos o fenilpropanoides.

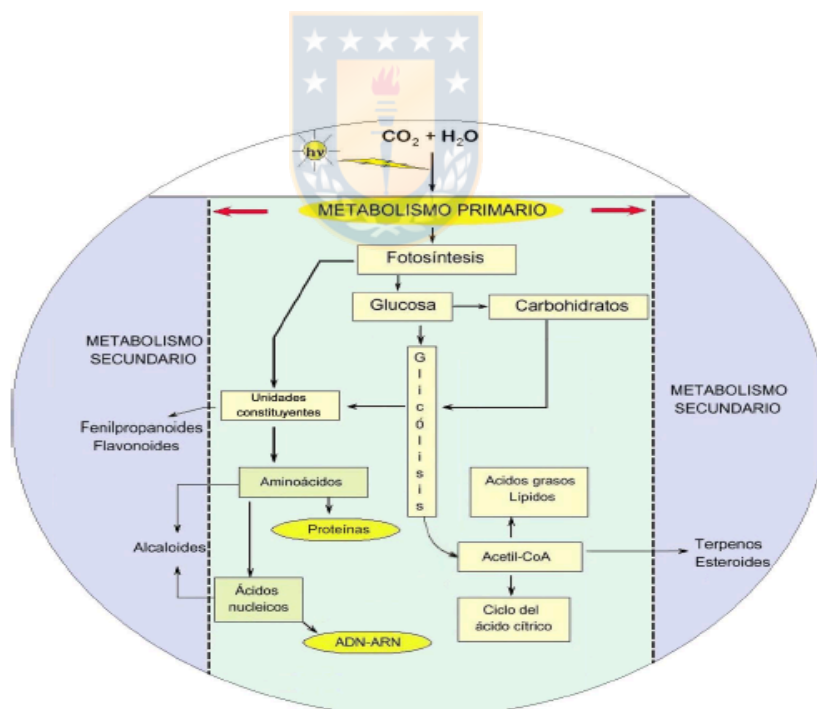


Figura 1: Clasificación de los metabolitos secundarios en sus tres categorías (Adaptado de: Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Cabe mencionar que no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.

1.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, conocidos también como polifenoles conforman uno de los principales grupos de metabolitos secundarios de las plantas. Estos compuestos exhiben una gran diversidad de funciones y estructuras químicas, pero la mayoría presenta un esqueleto básico común conformado por un anillo aromático con uno o más hidroxilos como sustituyentes. Son biosintetizados en la vía de los fenilpropanoides /ácido shikímico. Son un grupo químicamente heterogéneo, se conocen alrededor de 10,000 compuestos y en la naturaleza pueden existir como derivados glucosilados o acilados o como estructuras poliméricas. También pueden encontrarse en componentes de estructuras celulares como la pared celular, o bien, asociados a moléculas como carbohidratos o proteínas (Pérez-Jiménez y Torres, 2011; Santos-Buelga *et al.*, 2012). Estos compuestos sintetizados por las plantas durante su desarrollo normal cumplen una serie de funciones muy variadas, entre las que destacan su acción como atrayentes para la polinización o como fitoalexinas, sustancias generadas por las plantas en

respuesta al ataque de patógenos y algunos tienen una función alelopática inhibiendo el crecimiento de plantas competitivas (Zhao *et al.*, 2010).

1.2.1.1. Flavonoides

Los flavonoides merecen una atención especial por ser la familia de polifenoles más importantes y ampliamente distribuida en la naturaleza. Poseen una estructura base de 15 carbonos, que comprende dos anillos aromáticos unidos a una cadena de tres carbonos (C₆-C₃-C₆) que puede ser o no parte de un anillo. A su vez pueden dividirse de acuerdo con el grado de oxidación que puede tener el anillo pirano. Los flavonoides comprenden a las flavonas, flavonoles, flavanonas, flavonoles, flavanes, flavanoles, antocianos y antocianidinas. Se incluyen además las chalconas y las dihidrochalconas. Debido a la alta complejidad de las estructuras existen otras clasificaciones, dependiendo si están conjugadas o no (Garrido & Borges 2013). En las plantas estos compuestos son muy importantes como parte de los mecanismos de defensa contra el daño oxidativo y proveen a la planta de color atractivo para polinizadores, así como para repeler ataques de insectos y microbios. Investigaciones recientes sugieren que los flavonoides son benéficos para la salud humana principalmente en padecimientos tales como: el síndrome metabólico y diversos tipos de cáncer, además refuerzan el sistema inmune. (Serafini *et al.*, 2010).

1.2.2. Alcaloides

La palabra alcaloide fue utilizada por primera vez por W. Meissner en el primer cuarto del siglo XIX para designar algunos compuestos con actividad que se encontraban en los vegetales y que poseían carácter básico (Sujata, Nagasampagi, & Meenakshi, 2009). Más tarde los alcaloides se definieron en un sentido amplio, como compuestos básicos, nitrogenados, de origen vegetal o animal. Desde el punto de vista químico, todos los alcaloides son compuestos nitrogenados, estando en la mayoría de los casos el nitrógeno formando parte de un heterociclo y en algunas ocasiones formando parte de una cadena abierta (Sujata et al., 2009). Están constituidos además por carbono e hidrógeno, muchos llevan oxígeno, lo que les confiere una serie de propiedades físicas (sólidos cristalizables de diferentes colores, aromas y polaridades), y raramente suelen contener azufre. Algunos autores hacen una diferenciación entre alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides. Los primeros serían compuestos de origen vegetal, con nitrógeno heterocíclico, con carácter básico y siempre procedente de aminoácidos. Los protoalcaloides son aminas simples, con nitrógeno no heterocíclico, también con carácter básico y formado biogenéticamente a partir de aminoácidos, y los pseudoalcaloides tendrían las propiedades de los alcaloides, pero su biosíntesis no sería a partir de aminoácidos. Esta diferencia entre los alcaloides no es compartida por muchos autores ya que

excluye auténticos alcaloides como son la efedrina, colchicina o cafeína, por citar algunos de interés.

La mayor parte de los alcaloides conocidos son de origen vegetal, si bien se han aislado de algunos animales, como la samandarina de las glándulas de la piel de *Salamandra maculosa* o diversos alcaloides de artrópodos. Generalmente en las plantas no se encuentran como bases libres sino en forma de sales unidos a ácidos orgánicos como el ácido cítrico, málico, succínico, etc. Los alcaloides cumplen diversas funciones en las plantas, como defensas naturales contra animales y hongos, suelen producir efectos fisiológicos en los animales. La mayoría de las plantas medicinales, tóxicas y alucinógenas deben sus efectos a la actividad biológica de los alcaloides. (Azcón y Talón, 2000). Los alcaloides poseen estructuras químicas muy diversas, lo que además de dificultar su definición, explica el abanico de actividades farmacológicas que pueden presentar. Entre las diferentes actividades podemos destacar: actividad sobre el sistema nervioso central como, por ejemplo, la morfina aislada de las cápsulas de adormidera y del opio, que deprime el SNC y produce una marcada analgesia (Cowan, 1999), o la cafeína, que, por el contrario, estimula el SNC.



1.3. Plantas medicinales chilenas utilizadas en medicina popular.

Nuestro país posee una gran cantidad de plantas medicinales, muchas desconocidas, que crecen en forma natural en nuestros campos, y que desde siempre han sido utilizadas para el tratamiento de algunos síntomas de enfermedades, sobre todo por nuestros pueblos originarios. El uso de hierbas y otras plantas medicinales ha aumentado durante las últimas tres décadas en Chile (Caiozzi et al., 2002). Aunque el uso de especies vegetales con fines medicinales se remonta a miles de años, es sólo en este siglo que se han realizado esfuerzos científicos sistemáticos para evaluar el alcance real del beneficio terapéutico asociado con su uso. Si bien esto ha significado un renovado interés por la medicina natural, existen muchas plantas que, aunque disfrutan de amplia aceptación, carecen todavía del apoyo científico necesario para justificar su uso continuado o, al menos, las reivindicaciones terapéuticas asociadas en general con respecto a ellas. Un gran número de compuestos con actividad biológica derivan de plantas que se utilizan en la medicina tradicional para preparar infusiones, extractos o bebidas (Gurib-Fakim 2006).

1.3.1. *Peumus boldus* Mol.

El interés por estudiar esta planta medicinal se debe a que tiene alto impacto en su uso popular, siendo una de las principales plantas medicinales en Chile. Además, es una de las plantas chilenas más apetecidas y nombradas en las farmacopeas extranjeras, especialmente la europea. Químicamente es una de las plantas más estudiadas, conocidas y valoradas en Europa. (Schirckel-Bittner, 2010). Por otro lado, existe una gran controversia con respecto a su actividad biológica de uno de sus principios activos, el alcaloide boldina. Si bien se sabe que la boldina es un muy buen antioxidante, éste no funciona bien *in vivo* debido a su pobre farmacocinética (O'Brien et al 2006), por otro lado, la hoja (parte usada en medicina) tiene ascaridol que es un reconocido hepatotóxico. No obstante, lo anterior, el uso del boldo (particularmente sus hojas), se encuentra difundido prácticamente en todo el mundo.

1.3.1.1. Monografía:

 <p style="text-align: center;">Foto</p>	 <p style="text-align: center;">Dibujo Botánico</p>
Especie (Familia):	<i>Monimiaceae</i>
Nombres comunes	Boldo, boldu
Historia:	Endémico de Chile, se desarrolla entre la zona del Aconcagua y Osorno. Se utiliza como estimulantes digestivos, diuréticos, relajantes y en el tratamiento de trastornos que afectan el hígado, vesícula biliar y páncreas (Van Ginkel, 1999)
Parte utilizada:	Hojas
Farmacopeas:	Chilena, Europea, Británica, Española, Argentina, Brasileña.
Constituyentes químicos	Aceites esenciales, alcaloides, taninos y flavonoides (Roach, 2001, Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann 2010). Boldina y aceites esenciales (Speisky 1991), proantocianidias (Pastene <i>et al.</i> , 2014).

1.3.1.2. Composición química

Los diferentes estudios realizados desde Claude Verne (1872) indican que el boldo contiene diferentes tipos de metabolitos secundarios como ácido cítrico, azúcar, boldina y aceites esenciales. Estudios posteriores han permitido afirmar que el boldo contiene alcaloides, taninos, el heterósido boldoglucina y

compuestos fenólicos de tipo flavonoide. Las hojas de boldo contienen de 2,0 a 2,6% de aceite esencial, el que se compone principalmente de ascaridol (34,8%), limoneno (16,1%) y eucaliptol (11,9%) (Bittner et al., 2009), también se han identificado otros componentes como cimol, canfeno, entre otros. Se describen además alcaloides isoquinolínicos (-)-pronuciferina, (+)-reticulina, N-metil-laurotetanina, sinoacutina, isocoridina, isocoridina N-óxido, nor-isocoridina y boldina, siendo éste último el más importante. También se han identificado otros tales como: isoboldina, laurotetanina y laurolitsina. Entre los flavonoides asilados se mencionan peumósido, boldósido y glucósidos de ramnetina e isoramnetina y kampferol-3-glucósido-7-ramnósido. Además de las geninas, kaempferol, quercetina e isoramnetina (Schirckel-Bittner, 2010). Recientemente Fuentes- Barros et al. (2018) detectaron otros alcaloides en la corteza, hojas, madera y raíces del boldo los cuales no habían sido informados como constituyentes de esta especie. Estos son la N-metilsecoboldina, glaucina, norreticulina, además de trazas de secoboldina.

1.3.1.3. Antecedentes farmacológicos y de actividad biológica

En Chile, el uso del boldo se encuentra difundido en todo su territorio. Lo que se emplea de este árbol son sus hojas que una vez extraídas son secadas (Simon and Chopra 2000). El líquido obtenido por cocción de la corteza es muy aplicado contra debilidades nerviosas; por otro lado, las hojas secas y



finamente trituradas constituyen un excelente remedio contra los resfriados (Hoffmann et al 1992). Está especialmente indicado en problemas hepáticos, digestiones lentas, flatulencias, problemas urinarios y trastornos nerviosos e insomnio provocados por trastornos hepáticos. También se utiliza en casos de reumatismo y gota, aliviando al actuar como estimulante de la expulsión de la urea. También actúa en la diuresis y posee cierto efecto antiinflamatorio y antiséptico urinario, gracias a la acción de los flavonoides y del aceite esencial que lo componen (Chiej 1983). Tienen una acción marcadamente hepatoprotectora actuando como tónico y estimulante de la función digestiva y hepática, así como para tratar trastornos de la vesícula biliar e hígado y como preventiva en la formación de cálculos biliares. Por otro lado, tiene acción antiinflamatoria, antipirética, antiséptica, diurética y fungicida (Rocha et al., 2004). Es colerético y colagogo, además de laxante suave, sedante del sistema circulatorio, debido a la boldina y antihelmíntico por el ascaridol. Es antilitiásico y carminativo (Del Sol 1995). El aceite ha demostrado tener propiedades antiinflamatorias, carminativas y fungistáticas (Bittner et al., 2009). Según Gupta (1996), el aceite esencial de boldo posee actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Estudios de extractos de hojas de boldo presentaron actividad antimicótica contra: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger* y *Trichophyton mentagrophytes*. Además es ligeramente sedante del sistema nervioso

(Alonso 2004). La boldina, principal alcaloide presente en las hojas y corteza del boldo, es bien conocida por sus propiedades antioxidantes y su actividad tripanocida (O'Brien et al., 2006; Konrath et al., 2008). En estudios biológicos *in vitro* de la boldina se ha demostrado que actúa contra la peroxidación de radicales libres (Schirckel-Bittner, 2010). Las hojas de Boldo contienen taninos y flavonoides, de los cuales la catequina ha sido reportada como una de las más abundantes. Dado que el contenido de catequina, ácido gálico y ácido tánico en boldo es mucho mayor que el de boldina, los primeros compuestos parecen contribuir en mayor medida a la capacidad antioxidante total de las infusiones de boldo (Quezada et al., 2004). No obstante, hasta ahora no se ha generado evidencia pre-clínica o clínica que permita resolver esta disyuntiva. En estudios recientes de Soto et al. (2013) muestran que el alcaloide más concentrado encontrado en las hojas de boldo no es boldina sino que es isocoridina, un agente anticancerígeno que está actualmente bajo evaluación (Lu et al., 2012). También poseen glucósidos de quercetina, canferol, e isorhamnetina, ácidos fenólicos y proantocianidinas, que ejercen efectos antioxidantes y quimiopreventivos (Fernández et al., 2009 ; Schmeda-Hirschmann, 2010). En otro estudio reciente realizado por Pastene et al., (2014), descubrieron que las proantocianidinas son muy activas sobre *Helicobacter pylori*, llegando a la conclusión que *Peumus boldus* tiene potentes propiedades anti-*H.pylori* mediante la inhibición de la actividad ureasa y de la adhesión a las células AGS gástricas humanas.

1.3.2. *Buddleja globosa*

Se escogió esta planta medicinal debido a sus múltiples usos en la medicina tradicional, como enfermedades del estómago, colitis, así como heridas y úlceras de diferente localización (piel, estómago). Según la etnomedicina, las hojas de matico son consideradas como una de nuestras mejores plantas vulnerarias (cicatrizante y antiséptico), se emplea para lavar heridas y para ayudar a la cicatrización de las úlceras y heridas antiguas (Schirckel-Bittner, 2010).

1.3.2.1. Monografía:

	
Foto	Dibujo Botánico
Especie (Familia):	<i>Buddlejaceae</i>
Nombres comunes:	Matico, pañil, palguín.
Historia:	Árbol nativo de Chile, Perú y Argentina. En Chile habita desde Santiago hasta la Patagonia (Navas, 1979). Se utilizada para curar heridas, úlceras y trastornos digestivos, como diurético, antiinflamatorio y
Parte utilizada:	Hojas, frutos y corteza.
Constituyentes químicos	Flavonoides, Cumarinas, terpenos, entre otros.

1.3.2.2. Composición química:

En las hojas se ha detectado la presencia de los siguientes metabolitos: flavonoides, cumarinas, terpenos, entre otros (Escribano et al., 2006; Miranda et al., 2002). Otros compuestos encontrados son los flavonoides, glucósidos de cianidina, delfidina, malvidina, petunidina, cumarina y triterpenos (Silva-Bittner 1992), así como también fenilpropanoides, iridoides (Montes – Wilkomirsky 1987; Mensah et al., 2000).

1.3.2.3. Antecedentes farmacológicos y de Actividad Biológica:

Sus hojas contienen fenilpropanoides, iridoides, terpenos y flavonoides (Montes – Wilkomirsky 1987; Mensah et al., 2000) y muestran propiedades antihepatotóxicas, bactericidas, antioxidantes, antiinflamatorias, cicatrizantes de heridas y actividades analgésicas (Pardo et al., 1997, Liao et al., 1999, Mensah et al., 1998, Backhouse et al., 2008). Por otro lado a los taninos (5,7 %) y glucósidos de flavonoides se les atribuye actividad antidiurética, cicatrizante y antiinflamatoria. También presenta iridoides con actividad antibacteriana y fenilpropanoides con propiedades analgésicas, antibacteriana y antihipertensiva.

El angarósido A es el responsable de tener actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Hoffman et al., 1992; Muñoz et al., 2001). Presenta, además, terpenos con actividad antifúngica contra *Trichophyton rubrum*,

Trichophyton interdigitale y *Epidermophyton floccosum* (Mensah et al., 2000).

Por otra parte se han podido aislar derivados del ácido cafeico como el verbascósido con capacidad de estimular el crecimiento de los fibroblastos *in vitro* (Mensah et al., 2000). Algunos ensayos *in vitro* demostraron actividad antibacteriana contra gérmenes Gram (+) y (-), lo cual se debería a la presencia de diterpenos y triterpenos principalmente (Alonso, 2004).

En la actividad analgésica y antiinflamatoria del matico se encontró que el flavonoide linarina posee una actividad antiinflamatoria apreciable, pero esto no ha sido confirmado clínicamente. (Mensah et al., 2001). Recientemente se patentó el “Uso de un extracto seco normalizado de hojas de *Buddleja globosa* Hope, BG-126, para el tratamiento y prevención de trastornos gastrointestinales causados por el tratamiento con nitrofurantoína y otros antimicrobianos”. Esta invención se refiere al uso de una composición que contiene extractos de *Buddleja globosa* Hope (matico) y aditivos farmacológicamente aceptados para el tratamiento o prevención de varios trastornos gastrointestinales, en particular los asociados con el tratamiento del paciente con nitrofurantoína, en particular contra *Escherichia coli*. (Letelier y Salas 2014).

1.4. Métodos de Extracción de compuestos bioactivos desde plantas medicinales

Es posible realizar una separación, identificación y caracterización de compuestos bioactivos desde las plantas medicinales chilenas a través de un proceso de extracción apropiado. La extracción de los compuestos bioactivos corresponde a una técnica empleada para separar un producto orgánico de una mezcla o aislarlo de su fuente natural. Así, los extractos vegetales se definen como preparados concentrados de soluciones extractivas. Que se obtienen extrayendo los compuestos activos de las plantas con solventes apropiados. La base teórica del proceso de extracción es la difusión.

De esta forma los métodos de extracción tienen algunos objetivos comunes: (a) extraer compuestos bioactivos específicos de una muestra vegetal compleja, (b) aumentar la selectividad de los métodos analíticos (c) aumentar la sensibilidad del bioensayo, incrementando la concentración de compuestos diana, y (d) proporcionar métodos robustos y reproducibles que sean independiente de las variaciones en la matriz de la muestra (Smith, 2003).

1.4.1. Métodos de extracción convencional

Los compuestos bioactivos de los materiales vegetales pueden extraerse mediante diversos métodos clásicos de extracción. La mayoría de estos métodos se basan en el uso del poder de extracción de diferentes

disolventes, en la aplicación de calor y/o agitación. Algunas son: Extracción Soxhlet, Maceración e Hidrodestilación, de las cuales las que se utilizarán serán extracción soxhlet y maceración, ya que lo que se busca es obtener un extracto global de la planta. Por otro lado, la selección del disolvente va a depender principalmente de la polaridad del o los compuesto/s objetivos, así como también de la afinidad con los compuestos bioactivos, la transferencia de masa, la seguridad del solvente (que sea amigable con el medioambiente). Por otro lado, la recuperación del solvente, la toxicidad y la viabilidad financiera también deben considerarse en la selección del disolvente para la extracción de compuestos bioactivos. Algunos ejemplos de compuestos bioactivos extraídos utilizando diferentes disolventes se dan en la Tabla 1

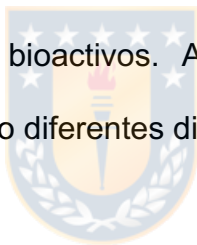


Tabla 1. Ejemplo de algunos compuestos bioactivos extraídos mediante diferentes solventes orgánicos (adaptado de Cowan (1999)).

Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Diclorometano	Acetona
Polifenoles: Antocianinas	Polifenoles:	Terpenos	Terpenos	Alcaloides	Taninos
Taninos Cumarinas	Taninos Flavonoides Terpenos	Polifenoles: Flavonoides Ácidos fenólicos	Alcaloides	Terpenos	
Saponinas					

1.4.2. Métodos de extracción no convencionales

La extracción convencional tiene grandes desafíos que superar como son: los largos tiempo de extracción, el requerimiento de disolventes costosos y de alta pureza, la evaporación de una enorme cantidad de disolvente, la baja selectividad de extracción y la descomposición térmica de compuestos termo lábiles (Luque de Castro y Garcia-Ayuso, 1998). Para superar estas limitaciones de los métodos de extracción convencionales, se introducen nuevas y prometedoras técnicas de extracción. Estas técnicas se denominan técnicas de extracción no convencionales. Algunas de las técnicas más prometedoras son la extracción asistida por ultrasonidos (UAE), la extracción asistida por enzimas (EAE), la extracción asistida por microondas (MAE), la extracción con fluido supercrítico (SFE) y la extracción líquida presurizada (PLE). Algunas de estas técnicas son consideradas como "técnicas verdes", ya que cumplen con los estándares establecidos por Environmental Protection Agency, USA (http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/about_gc.html). Éstos incluyen síntesis química menos peligrosa; diseño de productos químicos más seguros, uso de materias primas renovables, reducción de derivados, catálisis, diseño para prevenir la degradación, economía en cuanto al tiempo de análisis y de solventes, prevención de la contaminación y química inherentemente más segura para la prevención de accidentes. El ultrasonido se elige como medio de extracción no convencional, para compararlo con los métodos no convencionales. Por otro lado, un aspecto innovador e

interesante desde punto de vista de la utilización de disolventes orgánicos, es que se introducirá en este proyecto el uso de NADES (Natural Deep Eutectic Solventes) como medio de extracción “Verde”, como sigue a continuación.

1.4.3. Los NADES como solventes no-convencionales para la extracción de bioactivos.

Los NADES (Natural Deep Eutectic Solventes) son líquidos formados de metabolitos primarios (por ejemplo, azúcares, alcoholes de azúcar, ácidos orgánicos, aminoácidos y aminas) unidos entre sí por interacciones intermoleculares fuertes, particularmente enlaces de hidrógeno. Estos han demostrado presentar muchas ventajas sobre los disolventes convencionales actualmente utilizados para la extracción (Dai et al., 2013) por ejemplo, tiene una volatilidad despreciable, viscosidad ajustable y alta solubilización. Algunos NADES han mostrado una capacidad solubilizante muy alta, en algunos casos hasta 12.000 veces mayor que el agua (Choi et al., 2011; Dai et al., 2013) Desde el punto de vista ambiental y económico, también presentan grandes ventajas, con respecto a su biodegradabilidad, sustentabilidad, bajo costo y simple preparación. Todas estas propiedades indican su gran promesa como disolventes de extracción para productos naturales (Dai et al., 2013) y sus posibles aplicaciones en áreas relacionadas con la salud, tales como alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos.

En general, los componentes de NADES se caracterizan por la presencia de varios grupos funcionales tales como grupos hidroxilo, carboxilo o amino (Choi et al., 2011; Dai et al., 2013). Estos grupos pueden formar un enlace de hidrógeno intermolecular, conduciendo a líquidos viscosos altamente estructurados, lo que explica sus propiedades físicas específicas y su comportamiento solubilizante diferente en comparación con los disolventes convencionales. Estos líquidos también pueden formar enlaces de hidrógeno con solutos, aumentando de este modo en gran medida la solubilidad de compuestos en NADES, por ejemplo: compuestos fenólicos. Según sus componentes, se puede dividir en cinco grupos: tipos de líquido iónico compuestos por un ácido o una base, aquellos con compuestos neutros, mezclas a base de azúcar con un ácido, mezclas a base de azúcar con una base y a base de azúcar con un aminoácido (Dai et al., 2013). Las diferentes composiciones de NADES resultan en un amplio rango de propiedades físicas, probablemente llevando a diferentes comportamientos en aplicaciones como la extracción, análisis y almacenamiento de productos naturales. Si bien para ambas plantas no se han utilizado estos tipos de solventes, existen varios ejemplos en los cuales se han obtenido buenos resultados de extracción, algunos ejemplos son lo realizado por Dai *et al.*(2013), quienes estudiaron la extracción de compuestos fenólicos de *Carthamus tinctorius*, utilizando diferentes NADES, como ácido láctico: glucosa; glucosa: cloruro de colina y fructosa: glucosa: sacarosa. En ese trabajo, se encontró que los

NADES tiene una alta capacidad para extraer compuestos fenólicos, y que está relacionado con las interacciones de enlace-H que se establecen entre los compuestos fenólicos y las moléculas de los NADES. Las propiedades físicas de los NADES también tienen una gran influencia en la extracción, tales como. la viscosidad, la polaridad y la temperatura. Optimizando todos los parámetros estos autores reportan mayores rendimientos de extracción de compuestos fenólicos usando NADES en comparación con solventes convencionales como agua y etanol. Estudio reciente realizado por Radosevic *et al.*(2016) donde se prepararon extractos fenólicos de piel de uva utilizando cinco NADES a base de cloruro de colina que contenían glucosa, fructosa, xilosa, glicerol, ácido málico y se valoraron mediante pruebas de su actividad biológica *in vitro* usando dos líneas celulares tumorales humanas. Entre los NADES basados en cloruro de colina usados, el que contenía ácido málico mostró el mejor desempeño con respecto a la eficiencia de extracción (el total de antocianinas fenólicas y totales fue de 91 y 24 mg/g de peso seco). Por primera vez se mostró que los componentes de los NADES podían ser elegidos no sólo para ajustar las características fisicoquímicas del disolvente sino también para potenciar la actividad biológica de extractos preparados en NADES. Por lo tanto, esta investigación confirmó que los NADES son una excelente y prometedora opción de solventes para una extracción sostenible y verde, lo que dará lugar a su novedosa aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.

1.5. Aislamiento de compuestos bioactivos

La metodología de aislamiento más frecuentemente utilizada, consiste en repetidas cromatografías en columnas rellenas de gel de sílice (fase normal), en las cuales la fase móvil es impulsada por la gravedad. Por otro lado, también se hace cada vez más frecuente el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en modo preparativa. Sin embargo, todos estos métodos tienen limitaciones. La cromatografía de adsorción tiene una tendencia a retener analitos en la fase estacionaria, dando como resultado pérdida de muestras y relaciones cuantitativas. Finalmente, aunque la HPLC tiene un alto poder de resolución, no es ni muy económica ni respetuosa con el medio ambiente cuando se lleva a escala de cromatografía preparativa (Qiu *et al.*, 2012).

Todas estas observaciones reflejan la necesidad de un equipamiento más sofisticado y especializado, como lo es la cromatografía en contra-corriente, que si bien podría no estar ampliamente disponible incluso para laboratorios bien equipados. Otra consideración es que, las técnicas de separación en contra-corriente requieren algún tiempo para ser optimizadas. Si bien esto puede percibirse como desventajoso, recientemente se han hecho progresos significativos en aspectos claves, tales como la selección de sistemas disolventes, el diseño de instrumentos y los modos de operación, y hay una gran cantidad de reportes recientes sobre protocolos eficientes de purificación

de productos naturales que emplean técnicas contracorrientes. La metodología en contracorriente se aplica principalmente en esquemas de aislamiento más complejos y no como una alternativa a otras técnicas. (Pauli *et al.*, 2012).

1.5.1. Cromatografía contracorriente

La cromatografía en contracorriente (CCC) es un término genérico que abarca todas las formas de cromatografía líquido-líquido que utilizan una fase estacionaria líquida sin soporte mantenida en su lugar por un simple campo centrífugo o complejo campo de fuerza centrífuga. Se basa en un proceso de partición repetido (semejante al que se verifica en la cromatografía tradicional) pero en ausencia de un soporte sólido. El inventor de la técnica, Yoichiro Ito, lo nombró por el método de partición a contracorriente de Craig que también usaba la división entre dos fases líquidas para separar solutos (Ito 2002). Utilizando instrumental diseñado *ad hoc* (la centrifuga planetaria) es posible retener una de las fases que constituyen un ATPS (sistema de dos fases acuosas) dentro de un tubo espiralado por aplicación de fuerza centrífuga (fase líquida estacionaria). Por otra parte, la segunda fase (móvil) fluye en forma continua por irrigación del sistema, generando una serie de pasos extractivos a través de la primera y asegurando la existencia de un número importante de platos teóricos. La inexistencia de una matriz sólida minimiza problemas de adsorción inespecífica y reduce los costos asociados a los

adsorbentes comerciales. La cromatografía líquido-líquido se aplicó fundamentalmente a la separación de productos naturales a partir de extractos vegetales, utilizando sistemas de solventes orgánicos inmiscibles con el agua (incompatibles con la presencia de biopolímeros), bajo condiciones analíticas y preparativas.

La cromatografía de partición centrífuga (CPC) es una de las diversas técnicas utilizadas en la cromatografía líquido-líquido. Es un desarrollo de CCC, una clase de técnicas, la primera de las cuales fue inventado en 1970 por Ito y Bowman. Todas éstas técnicas son basados en la partición entre dos fases inmiscibles de un sistema solvente (Ito y Boowman 1970).

Al igual que otras técnicas de CCC, como la cromatografía de contracorriente de gotas o cromatografía de contracorriente de bobina toroidal, la cromatografía de partición centrífuga también es un tipo de cromatografía de contracorriente hidrostática. En los sistemas hidrostáticos, existe sólo un eje de rotación generando un campo centrifugo constante, por lo que pueden encerrar volúmenes geométricos, tubos, canales o lóbulos que se repiten a través de tubos de conexión que forman un patrón. Este diseño reduce el tiempo de contacto para el intercambio de soluto con la fase estacionaria Fig. A: Se puede ver que los conductos de conexión sólo contienen la fase móvil (no hay intercambios de fase en los conductos de conexión). Por lo cuál, hay una mayor capacidad de carga y es más rápida. También construye una pequeña presión hidrostática que explica la importante caída de presión

necesaria para operar centrifugas hidrostáticas. Todas las centrifugas hidrostáticas contienen dos juntas rotatorias; uno en la parte superior y el otro en la parte inferior, las cuales permiten una operación silenciosa que los aparatos de HSCCC. (Berthod *et al.*, 2009).

Los sistemas de cromatografía contracorriente hidrodinámica, se caracterizan principalmente por un movimiento de rotación planetaria de los carretes alrededor de dos ejes giratorios, (Bojczuk *et al.*, 2017), un eje principal y uno planetario, cada eje planetario tiene una bobina o un carrete montado en él que contiene las bobinas de tubería de teflón continuamente arrollada, lo que genera un campo de fuerza centrífuga variable. Éste campo produce zonas de mezcla y de sedimentación a lo largo de toda la longitud de la columna enrollada como se indica en la Fig. 2B, por lo que hay un contacto continuo entre las dos fases líquidas a lo largo de la columna sin ninguna acumulación de presión significativa, es decir, las centrifugas hidrodinámicas funcionan con baja presión de fase móvil pero pueden generar ruido del conjunto de engranajes, que puede reducirse en centrifugas bien diseñadas (Berthod *et al.*, 2009). Estas columnas se denominan frecuentemente columnas CCC (HSCCC) de alta velocidad, ya que pueden funcionar mucho más rápidamente que las columnas Craig, DCCC y gravedad. (Ito 2005; Conway 1990). Una de las ventajas HSCCC es su resolución.

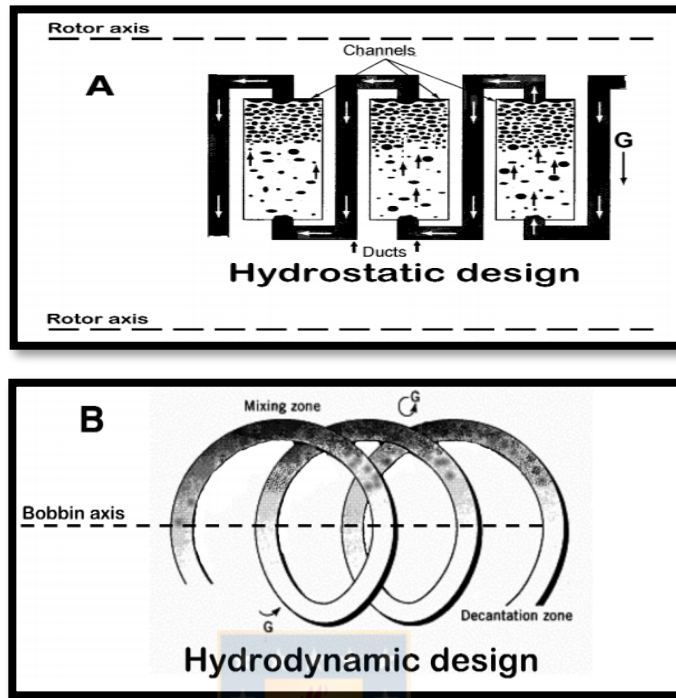


Figura 2. Vista esquemática del movimiento del líquido en columnas CCC. A) Columnas hidrostáticas o CPC. B) Columnas hidrodinámicas. (Adaptado de Berthod et al., 2009)

La separación de los solutos, contenidos en una fase móvil, se logra de acuerdo con sus coeficientes de partición (K_d), expresados como la relación de sus concentraciones en la fase estacionaria a su concentración en la fase móvil (Figura 5). Dependiendo de la densidad de las fases, se puede operar en dos modos. Cuando la fase más ligera (menos densa) es fase móvil, se denomina modo ascendente, mientras que cuando la de mayor densidad fluye a través de la menos densa se denomina descendente (Bojczuk et al., 2017).

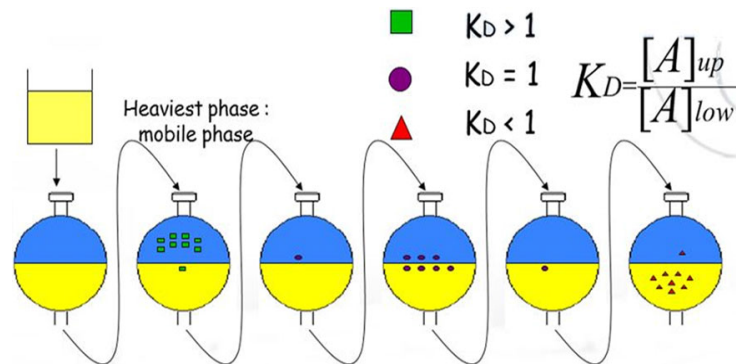


Figura 3. El fenómeno líquido-líquido es la base de la distribución a contracorriente (y la cromatografía en contra-corriente). (Adaptado de Bojczuk et al., 2017)

Un punto muy importante para considerar es la solubilidad de los compuestos a separar y su razón de K_D entre las fases inmiscibles. Si bien existen diversas combinaciones de sistemas de solventes, una de las más usadas para fraccionar extractos ricos en polifenoles se compone de heptano (o n-hexano), acetato de etilo, agua y metanol, formando 23 posibles combinaciones (A hasta la Z), llamado comúnmente sistema Arizona (Bojczuk et al., 2017). Debido a la modalidad de usos, la posibilidad de generar un sistema bifásico en un amplio rango de polaridades, CPC es una técnica idónea para la separación y purificación de (poli) fenoles desde extractos de plantas.

Esta técnica ha sido usada ampliamente en otras plantas para separar verbascósido, este fenilpropanoide presente y el cuál nos interesa sustraer

desde el matico, algunos ejemplos de ello son: desde un extracto de semillas de *Plantago psyllium* mediante el uso de HSCCC utilizando el sistema de solvente acetato de etilo agua (1: 1), (Li et al 2005), pero esto se realizó en dos pasos. Xi y colaboradores (2012) también usaron HSCCC y usaron un sistema de fases de acetato de etilo: n-butanol: agua mediante la adición de ácido acético glacial para purificar verbascósido y equinacosido (Xi et al., 2012). HSCCC fue exitosamente desarrollado para el aislamiento verbascosido e isoactiósido de la planta medicinal tibetana *Pedicularis longiflora* Rudolph. var. *tubiformis* (Klotz), utilizando cloroformo: n-butanol: metanol: agua (4: 3: 4: 5, v/v) como sistema de disolvente de dos fases, los dos compuestos objetivo, se resolvieron satisfactoriamente en una separación de un solo paso (Chen et al., 2014).

En otro trabajo se aislaron y purificaron plantamajosida y acteósido (verbascósido) de las partes aéreas de *Plantago asiático* mediante cromatografía de partición centrífuga de alto rendimiento (HPCPC) con acetato de etilo, n-butanol, etanol y agua (0.5: 0.5: 0.1: 1, relación de volumen) como sistema solvente. (Li et al., 2009).

En conclusión, al comparar los reportes en la literatura para el aislamiento de verbascósido y otros derivados fenilpropanoides desde variadas fuentes, es posible señalar que para diferentes matrices se requieren distintos procedimientos de purificación. Además de observa que por lejos la técnica

más usada es la HSCCC (acá sólo se han puesto algunos ejemplos) y el sistema de solvente acetato de etilo: *n*-butanol: agua, por lo que en la presente tesis se considerará probar esa fase como punto de partida. Dado los antecedentes presentado queda de manifiesto que los sistemas HSCCC y CPC pese a tener un mismo principio de separación, poseen diferencias en lo que respecta a mecánica de fluidos, por lo que es esperable tener que hacer ajustes cuando se use su protocolo diseñado originalmente para HSCCC.

1.5.2. Cromatografía contracorriente : modo refinamiento zona de pH

En la década de 1990, Ito introdujo un nuevo modo de separación preparativa llamado, refinamiento de la zona de pH CCC como una modificación de HSCCC, empleada como una técnica preparativa a gran escala para separar analitos ionizables. (Weisz et al., 1994; Ito and Ma 1996). El modo de "refinamiento de la zona de pH" se refiere a un modo de desplazamiento dedicado a la separación de compuestos ionizables (Ito and Ma 1996) que muestra una exagerada polaridad y diferencia de solubilidad entre sus formas neutras y la sal. Se ha aplicado principalmente a la purificación de productos naturales, particularmente alcaloides (Ito 2005; Fang et al., 2013)

El principio de esta técnica se basa en el uso de un retenedor introducido en la fase estacionaria y un desplazador solubilizado en la fase móvil para realizar el proceso cromatográfico de desplazamiento. En el caso de la purificación de alcaloides en el modo descendente (es decir, la fase acuosa

inferior con desplazador ácido es la fase móvil y la fase orgánica superior que contiene una base, el retenedor, es la fase estacionaria), el retenedor debe tener una constante de acidez aparente más pequeña que las de los alcaloides para desprotonar y obligarlos a dividirse en la fase orgánica estacionaria (Toribio et al., 2007). El proceso de desplazamiento requiere también un ácido fuerte o débil en la fase móvil para de esta forma desplazar los alcaloides en el orden decreciente de pKa. Dado que los analitos están organizados dentro de la columna de acuerdo con sus respectivas constantes de acidez e hidrofobicidad, el modo de refinamiento de la zona de pH puede ser un proceso selectivo.



Una característica de la cromatografía de desplazamiento es la liberación de los productos de la columna mediante bloques contiguos dispuestos según sus valores de pKa y también coeficientes de partición. En un bloque, la concentración de las diferentes especies (y, por lo tanto, el pH) son constantes y fijas por las constantes de equilibrio ácido-base y de reparto. La superposición entre bloques es mínima y no varía con la cantidad de inyección simple. (Renault y otros 1999).

Este método ofrece una serie de ventajas sobre el CPC convencional, como un aumento de más de diez veces en la capacidad de carga de la muestra, alta pureza y concentración de fracciones, constituyentes menores e impurezas (Maurya y Srivastava 2009). El CPC de refinamiento de zona de pH se ha utilizado con éxito para la separación de una amplia variedad de

productos naturales, alcaloides, isómeros estructurales y geométricos, aminoácidos, péptidos, colores sintéticos (colorantes) y compuestos quirales (Maurya y Srivastava 2009; Hamzaoui et al., 2013), por esta razón es que se pretende usar en la planta boldo, para separar los alcaloides de los polifenoles.

En la literatura podemos encontrar una amplia gama de sistema de fases utilizados para separar alcaloides, en especial el sistema HSCCC, es el más utilizado algunos ejemplos son: utilizando cromatografía de partición centrífuga de refinamiento de zona de pH se usó para separar los alcaloides del helecho *Huperzia serrata* (Thunb. Ex Murray) Trevis, se utilizaron n-heptano / acetato de etilo / n-propanol / agua (5: 15: 35: 45 v / v / v / v) como sistema disolvente. También se añadieron trietilamina (8 mM) y ácido metanosulfónico (6 mM) al sistema disolvente. El pH de la fase superior e inferior se ajustó a pH 10 mediante la adición de solución de amoníaco. Una cantidad de 0,4 g de extracto de planta seca dio 9 mg de huperzina A y 7 mg de huperzina pura B (Toribio et al., 2007). En otra investigación se separaron cinco alcaloides derivados de isoquinolina de un extracto crudo de *Stephania yunnanensis* usando CCC- refinamiento de zona de pH en un solo paso. Con un sistema disolvente compuesto de metil-tert-butil-éter (MtBE) -acetonitrilo-agua (2: 2: 3, v / v) donde se añadió trietilamina (10 mM) a la fase orgánica superior como retenedor y ácido clorhídrico (5 mM) a la fase móvil acuosa

como eluyente. Los alcaloides aislados fueron: isocorydina, corydina, tetrahidropalmatina, N-metilasimilobina y anonaína. (Hu et al., 2010)

Renault y colaboradores implementaron en modo de refinamiento zona la purificación de alcaloides indólicos del extracto alcaloideo crudo de la planta *Catharanthus roseus* (L.), separando vindolina, vindolinina, catharantina y vincaleucoblastina. En el estudio se utilizó un aparato HPCPC y el sistema de solventes: metil-tert-butil éter, acetonitrilo y agua (4: 1: 5 v / v / v) (la fase acuosa inferior se acidificó). (Renault et al 1999)

1.5.3. Sustracción química usando cromatografía contracorriente (CCC)



En el año 2008, se introdujo el concepto de sustracción química utilizando la separación en contracorriente (CS) para la eliminación selectiva de un solo compuesto desde una mezcla bioactiva de metabolitos (Chen et al., 2008).

El término "sustracción química" refleja la similitud con la sustracción aritmética y se aplica a una operación química destinada a remover o eliminar ciertos componentes, pero también implica que no se producen modificaciones químicas, en virtud de la ventaja sólo líquida de CS (Chen et al., 2008). Como se indicó en la sección anterior, la cromatografía a contracorriente (CCC) en la separación cromatográfica de extractos naturales es una metodología que posee gran capacidad para eliminar quirúrgicamente (resta o sustracción) uno o más componentes potencialmente disruptivos

dentro un extracto con el fin de examinar detalladamente la bioactividad de un producto natural.

Una ventaja importante de CCC resulta del hecho de que ambas fases en la cromatografía son líquidas; no hay ninguna posibilidad para la adsorción irreversible de sus metabolitos para medios cromatográficos sólidos. Esto significa que todos los analitos introducidos en la columna pueden ser recuperados.

El enfoque de remoción selectiva (también llamada "knockout") de una o varias entidades químicas representa una alternativa convincente al estudio de los productos metabolómicos naturales. Sin embargo, aunque la eliminación completa y selectiva de una sola entidad puede ser deseable, hacerlo con una alta especificidad es bastante difícil y/o laborioso. También resulta lógico pensar que las sustancias sustraídas pueden ser incorporadas a un extracto para enriquecerlo, lo que sirve como estrategia comprobatoria de su importancia en la bio-actividad del extracto. Así, en el presente trabajo se busca introducir el concepto de agotamiento y enriquecimiento de ingredientes selectos (DESIGNER) como un nuevo enfoque para explorar la biología de extractos complejos. (Ramos et al., 2014).

El concepto integra métodos modernos de separación avanzada en contracorriente (CS, incluye cromatografía en contracorriente [CCC] y cromatografía de partición centrífuga [CPC]), complementados con el análisis

metabolómico por LC-MS, UHPLC-UV y RMN ^1H cuantitativa (qHNMR), para el diseño dirigido de extractos selectivamente preparados. Este proceso produce materiales de “DISEÑADOR” que son derivadas de otra manera como mezclas metabólicas inalteradas, tales como extractos de productos naturales (Figura 4).

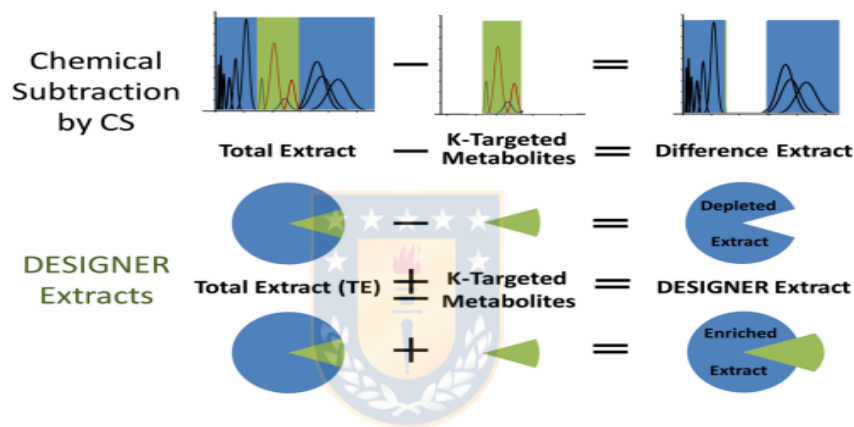


Figura 4. Representación esquemática de la sustracción química y la producción de extractos de DISEÑADOR. (DESIGNER). (Adaptado de Ramos et al., 2014).

El concepto de extractos de DISEÑADOR utiliza la flexibilidad de posibles ajustes de la selectividad cromatográfica, la polaridad y la ortogonalidad y puede así dirigirse a metabolitos únicos y múltiples, produciendo único y múltiples extractos *knock-out*, *knock-down*, y *knock-in*. (Ramos et al., 2014). El extracto *knock-out*, hace referencia al extracto que es removido, *knock-*

down se refiere al extracto reducido, es decir, el que nos queda y *knock-in* al extracto enriquecido.

La generación de extractos *knock-out* ha recibido atención, ya que representa una forma directa de estudiar la contribución biológica de un compuesto dado a la actividad global (TOTAL) de su extracto original.

Un componente antibacteriano conocido, el ácido benzoico, se eliminó selectivamente mediante CS del jugo de arándano (*Vaccinium macrocarpon*), con una pureza de 97,47% medida por QHNMR (Chen et al., 2008). Desde entonces, esta técnica cromatográfica ha evolucionado aún más con respecto a la determinación del analito basada en los coeficientes de partición (K, K-targeting), como en el caso de la separación preparativa y/o analítica de bilobalido y ginkgolidos A, B, C y J, de *Ginkgo biloba* (Qiu et al., 2012). Rara vez es posible eliminar un solo metabolito en un solo paso.

La sustracción química permite una caracterización química y biológica adicional tanto de los extractos de DESIGNER como de la complejidad residual del (de los) compuesto (s) diana (s) purificado (s). Como resultado, la interacción del(los) objetivo(s) y los extractos de DESIGNER permiten la evaluación de relaciones sinérgicas/antagonistas (Ramos et al., 2014).

Un aspecto clave de la sustracción química se refiere a la evaluación de la pureza de los compuestos diana (Ts), así como a la evaluación de su complejidad residual (RC) (Cheng *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2008).

1.6. Ensayos biológicos para confirmar la actividad biológica de los extractos diseñados

1.6.1 Ensayos para evaluar la citotoxicidad.

Los test de proliferación y citotoxicidad *celular in vitro* son una herramienta para determinar si una molécula posee efectos directos sobre la proliferación celular o si poseen efectos citotóxicos que conlleven a la muerte celular.

El colorante de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) ha sido ampliamente utilizado como un indicador de viabilidad celular en varios tipos de ensayos de proliferación y citotoxicidad. (Nociari *et al* 1998). La reducción de resazurina se correlaciona con el número de organismos vivos, como las células bacterianas, de hongos y de mamíferos. Las enzimas mitocondriales, como portadores de actividades de diaforasa, como la NADPH deshidrogenasa, son responsables de la transferencia de electrones de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a resazurina, que se reduce a resorufina (O'Brien *et al* 2000).

Cuantificación de viabilidad celular basada en resazurina tiene ventajas, que incluyen rapidez, confiabilidad, sensibilidad, seguridad y costo. Además, mantiene las células intactas, lo que permite otros análisis paralelos, como

ARNm, estudio citogenético, determinación de apoptosis e inmunofenotipado. El nivel de reducción puede cuantificarse mediante espectrofotómetros utilizando filtros apropiados, ya que la resazurina exhibe un pico de absorción a 600 nm y la resorufina a 570 nm de longitud de onda (Zalata et al., 1998). Otro método de tinción es usando la sulforodamina B (SRB), es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, posee dos grupos sulfónicos $-SO_3^-$ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas (disuelta en ácido acético 1%), la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular si las células son previamente fijadas con ácido tricloroacético (TCA), y después de eliminar el colorante no fijado, el colorante unido a las células viables se extrae con medio alcalino (Solución de Tris pH 10,5) y se lee la absorbancia a 564 nm (Skehan et al., 1990; Monks et al., 1991).

1.6.2. Ensayo del cometa para evaluar el daño en el ADN

El bioensayo cometa, también conocido como electroforesis alcalina de células individuales (del inglés: Single Cell Gel Electrophoresis Assay), es una prueba que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos (Kassie et al., 2000). Se ha convertido hace varias décadas en un método establecido para el estudio del daño de ácido desoxirribonucleico, con múltiples aplicaciones en ensayos de genotoxicidad,

estudios de biomonitorio en humanos, epidemiología molecular y ecotoxicología; así como una herramienta fundamental para investigaciones sobre daño y reparación del ácido desoxirribonucleico. En la actualidad existen dos versiones del ensayo Cometa: una, introducida por Sing y colaboradores, y otra, desarrollada por Olive y colaboradores. Las dos versiones son similares en principio, pero la mayor diferencia está dada en los valores de pH de la electroforesis. El método de Sing, conocida como electroforesis alcalina porque emplea $\text{pH} > 13$, mientras que el método de Olive, emplea electroforesis con pH de 8,3 y se conoce como electroforesis neutra. Ambos métodos son capaces de detectar ruptura de las cadenas de ADN simples y dobles, pero el método alcalino detecta, además, sitios alcalinos lábiles. Por esta razón el ensayo en condiciones alcalinas es el más usado (Singh et al., 1991). Este ensayo se distinguió por tener algunas ventajas como: simplicidad, sensibilidad, versatilidad, rapidez y economía (Hartmann et al., 2003).

1.6.3. Ensayos para evaluar la actividad antioxidante

1.6.3.1. Ensayo ORAC

Este método ha sido testeado con muy buena precisión, exactitud, robustez, especificidad a la acción de antioxidantes y linealidad de la relación entre el área bajo la curva de las señales y la concentración de antioxidantes. Sin embargo, la fluorescencia de la fluoresceína es sensible al pH, debiendo ser

un factor cuidadosamente monitoreado. Básicamente el método consiste en mezclar la muestra con fluoresceína, se incuba a 37°C antes de agregar AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) hidrocloreuro) utilizado como radical estable para iniciar la reacción con la fluoresceína. Las muestras se leen por espectrofluorescencia con una λ_{ex} = 485 nm y λ_{em} = 525 nm. Así, la muestra que podría contener antioxidantes compite con la fluoresceína por el AAPH, disminuyendo lentamente la fluorescencia de la Fluoresceína si la muestra contenía una alta capacidad antioxidante, o disminuyendo rápidamente la fluorescencia de la fluoresceína si la muestra contenía una baja capacidad antioxidante. (Ou et al., 2001).



1.6.3.2. Ensayo DPPH

Este método se basa en el uso del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·), el cual presenta un color violeta oscuro. Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. Este radical, cuando se pone en contacto con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno se reduce, produciéndose la pérdida de este color característico, lo que se traduce en un descenso de la absorbancia. (Brand-Williams et al., 1995)

1.6.4. Ensayo inhibición de la acetilcolinesterasa (ACHs)

La proteína acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima que juega un papel esencial en el funcionamiento normal del sistema nervioso tanto en el ser humano como en otros vertebrados e invertebrados, incluyendo insectos. Pertenece al grupo de las esterasas, y es capaz de atacar el grupo éster presente en la molécula de acetilcolina (ACh), generando como producto de hidrólisis colina y acetato. Esta molécula actúa como mensajero químico, principalmente en las sinapsis colinérgicas que existen en las uniones entre nervios y músculos, entre nervios y glándulas, y en las sinapsis entre ciertos nervios en el sistema nervioso central. Los procedimientos analíticos desarrollados para la determinación de la actividad AChE *in vitro* más empleados actualmente son del tipo colorimétrico basados en la reacción de Ellman. Este método, que se ha utilizado con éxito para medir actividad AChE en gran cantidad de especies y en diferentes tipos de tejidos, emplea el ácido 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, también llamado Reactivo de Ellman) como sonda para hacer un seguimiento de la reacción catalizada por la enzima AChE, utilizando como sustrato alternativo a la molécula de acetiltiocolina (AThCh) (Ellman *et al.*, 1961).

2. Hipótesis y Objetivos

En base a los antecedentes que han sido planteados en las secciones que anteceden , se plantea la siguiente hipótesis para la presente tesis:

2.1. Hipótesis:

Usando estrategias de sustracción química mediante técnicas preparativa modernas de separación cromatográfica (CPC) se puede comprobar si los compuestos mayoritarios o aquellos que forman parte de la complejidad residual presentes en las plantas chilenas *Peumus boldus* (boldo) y *Buddleja globosa* (matico), son los responsables de su actividad biológica.

2.2. Objetivo General

Diseñar estrategias de separación preparativa que permita sustraer los compuestos bioactivos (DESIGNER) a partir de extractos de boldo y matico, para comprobar su actividad biológica.

2.3. Objetivos específicos

2.3.1. Extraer compuestos bioactivos presentes en boldo y matico, utilizando métodos clásicos (Soxhlet, maceración) y modernos (ultrasonido) y también mediante NADES (solventes verdes).

2.3.2. Analizar y cuantificar los extractos mediante HPLC-DAD-IT-MS/MS, polifenoles totales.

2.3.3. Desarrollar metodologías para la sustracción química de los compuestos bio-activos mediante técnicas como CPC y refinamiento de la zona de pH-CPC con el objeto de diseñar extractos (DESIGNER) desprovistos o reducidos en bio-activos (*Knock out* y *Knock down*) o enriquecidos en ellos (*Knock in*).

2.3.4. Identificar las fracciones sustraídas mediante HPLC-DAD-IT-MS/MS y HPLC-Q-TOF.

2.3.5. Comprobar si el proceso de sustracción de los compuestos bio-activos de las plantas seleccionadas afecta su actividad biológica.

3. Estrategia analítica para la sustracción química de compuestos bioactivos en plantas medicinales chilenas (matico y boldo)

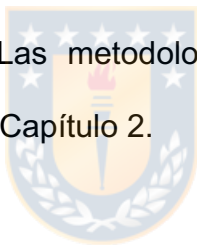
La estrategia analítica para dar cumplimiento con el objetivo general y específicos son detallados en la sección que antecede, se puede dividir en etapas, las cuales se observan en la figura 5.



Figura 5: Estrategia analítica propuesta.

3.1. Obtención de los extractos ricos en compuestos bio-activos desde las plantas medicinales (boldo y matico)

Debido a que soxhlet es el método convencional más utilizado, es que se empleará para extraer compuestos bio-activos y usarlo para ocuparlo con el CPC. Por otro lado a través de la utilización de stirring + heating y ultrasonidos se usarán como solventes verdes (NADES), ya que son economicamente más baratos y son amigables con el medio ambiente, el objetivo de esto es comparar los rendimientos de estos con los solventes orgánicos convencionales. Las metodologías empleadas y los resultados obtenidos se explicitan en el Capítulo 2.



3.2. Análisis y caracterización del perfil cromatográfico

Se utilizará HPLC-DAD para obtener el perfil cromatográfico de los extractos totales obtenidos por extracción soxhlet para boldo y matico. También se llevará a cabo la cuantificación de los compuestos mayoritarios presentes en el matico y boldo, así como el contenido de polifenoles totales, esto se realizará también para la extracción con los NADES.

3.3. Sustracción química de los compuestos bioactivos utilizando CPC

Para sustraer el o los compuestos bioactivos presentes en **boldo y matico**, se empleará cromatografía de partición centrifuga (CPC) permitiendo aislar él o los compuestos bioactivos presentes en las plantas.

3.4. Identificación de las fracción sustraidas (extractos diseñados)

Las fracciones sustraidas (extractos diseños) mediante CPC, serán identificadas mediante el uso de HPLC-DAD-IT-MS/MS y HPLC-DAD-QTOF, cuyas metodologías serán re-implementadas para los (poli)fenoles y alcaloides bioactivos.



3.5. Ensayos de actividad biológica

Para el boldo se evaluarán los extractos diseñados en cuanto a su citotoxicidad mediante el ensayo rezazurina en línea de células cancerosas humanas adenocarcinoma gastrointestinal (AGS), ya que esas células son las que se emplean para realizar ese tipo de ensayo con el boldo, también se realizarán ensayos de inhibición de la acetilcolinesterasa (AChEs), por otro lado además se evaluará el daño producido al ADN mediante el ensayo cometa y se medirá la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC y DPPH. Para el matico se evaluarán los extractos diseñados en cuanto su citotoxicidad, mediante la técnica de sulforodamina B (este método se elige porque no depende del metabolismo celular) se evaluará la migración celular asociado a células HaCaT y HDF, el uso de estas células es debido a su alta capacidad para diferenciar y proliferar *in vitro*, y se utilizan para evaluar el efecto de los extractos sobre la epidermis y la dermis, finalmente se medirá la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC.

4. Referencias:

Alonso. J. (2004). Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Argentina: Editorial Corpus. 1,359p. (p.244-246) 1ªEdición.

Avello, M., Valladares, R., Ordonez, J., (2008). Capacidad antioxidante de *Aristolelia chilensis* (Molina) Stuntz. Rev. Cub. Plant Med. 13, ISSN 1028-4796.

Avello, M., López, C.; Gatica, C.; Bustos, E.; Brieva, A.; Pastene, E. y Bittner, M. (2012). Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 17(1)73-83.

Azcón-Bieto, J & Talón, M. (2000). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill Interamericana de España SAU. ISBN 84-486-0258-7.

Backhouse, N., Rosales, L., Apablaza, C., Goity, L., Erazo, S., Negrete, R. (2008). Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. Journal Ethnopharmacology, 116:263-269.

Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway.

Berthod, A., Maryutina, T., Spivakov, B., Shpigun, O., Sutherland, I. (2009). Countercurrent chromatography in analytical chemistry. Pure and Applied Chemistry. 81, 355–387.

Bittner, M., Aguilera, M., Hernández, V., Arbert, C., Becerra, J., Casanueva, C. (2009). Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus* Mol. Chilean journal of agricultural research, 69, 30–37.

Blidi, S., Bikaki, M., Grigorakis, S., Loupassaki, S., Makris, D.P. (2015). A comparative evaluation of bio-solvents for the efficient extraction of polyphenolic phytochemicals: apple waste peels as a case study. *Waste Biomass Valorization* 6, 1125–1133.

Bhooshan Pandey K., Rizvi S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:5, 270-278.

Bojczuk, M., Zyzelewicz, D & Hodurek, P. (2017). Centrifugal partition chromatography –A review of recent applications and some classic references. *Journal of Separation Sciences*, 40, 1597-1609.

Brand-Williams, M., Cuvelier and C. Berset. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Technol.*, 28.25-30.

Cabrera, R., Stumpo, R., López, P., Ferraro, G., Cascone, O., Fernández-Lahore, H.M. (2001). Separación de proteínas en mezclas biológicas complejas mediante procesos continuos de extracción líquido-líquido, *FABICIB*, 5, 107-118.

Cacho, C. (2009). Polímeros de impresión molecular para la determinación de insecticidas, memoria, Facultad de Ciencias Químicas: Universidad Complutense de Madrid. 18, 297.

Caiozzi G, Cabrera D, Mardóñez JM, Saldías F. Hierbas medicinales y graves efectos adversos: Angioedema de úvula causado por uso de *Ecballium elaterium*. *Rev Med Chile* 2002; 130 (12): 1407-10.

Cenci Di Bello, I., Dorling, P., Fellows, L., & Winchester, B. (1984). "Specific inhibition of human B-D-glucuronidase and a-L- iduronidase by a trihydroxy pipercolic acid of plant origin" en *FEBS Letters* N°176, Elsevier, Amsterdam, pp. 61 -64.

Céspedes, C.L., El-Hafidi, M., Pavon, N., Alarcón, J. (2008). Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry*. 107, 820–829.

Céspedes, C., Alarcón, J., Gavila, G and Nieto. A (2010). Antiinflammatory activity of *Aristotelia chilensis* Mol. (Stuntz) (Elaeocarpaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9, 127-135.

Chemat, F., Tomao, V., & Virost, M., 2008. In: Otlés, S. (Ed.), *Handbook of Food Analysis Instruments. Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis*. CRC Press, pp. 85–94.

Chen, C., Zhao, X., Yue, L., Li, Xu., Chen, T. (2013). Separation of Phenylpropanoid Glycosides from a Chinese Herb by HSCCC. *Journal of Chromatographic Science*. 52:395–399.

Chen, S. N., Lankin, D. C., Chadwick, L.R., Jaki, B.U., Pauli, G.F. (2009). Dynamic Residual Complexity of Natural Products by qHNMR: Solution Stability of Desmethylxanthohumol. *Planta Medica*, 75, 757-762.

Chen, S. N., Turner, A., Jaki, B.U., Nikolic, D., Van Breemen, R., Friesen, J., Pauli, G.F. (2008). An experimental implementation of chemical subtraction, 46, 692-698.

Cheng, S.S., Huang, C.G., Chen, Y.J., Yu, J.J., Chen, W. J., Chang, S.T. (2009). *Bioresour. Technol.* 100, 452 –456.

Choe, E., Min, D.B., 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 8, 345–358.

Choi, Y.H. Van Spronsen, J.; Dai, Y.; Verberne, M.; Hollmann, F.; Arends, I.W.C.E.; Witkamp, G.J.; Verpoorte, R. (2011), Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*. 156, 1701 - 1705.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4), 564–582.

Conway. W.D., 1990, *Countercurrent Chromatography, Apparatus Theory and Applications*, New York, VCH.

Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1250–1318.

Dai, Y.; Van Spronsen, J.; Witkamp, G.J.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. 2013. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68.

Dai, Y., Witkamp, G.J.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. 2013, Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L, *Analytical Chemistry*. 85, 6272-6278.

Dai, Y., Verpoorte, R., Choi, Y. 2015. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*), *Food Chemistry*. 159, 116-121.

Delporte, C. (2007). Determinación de las actividades antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes y antimicrobianas de las hojas de *Aristolelia chilensis* (maqui). Identificación de los compuestos activos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 5(6):136.

Escribano-Bailón. (2006). Anthocyanins in Berries of Maqui (*Aristolelia chilensis* Molina) Stuntz). *Phytochemical Analysts*, 17: 8- 14.

Fang, L., J. Zhou, Y. Lin, X. Wang, Q. Sun, J.-L. Li, L. Huang, Large-scale separation of alkaloids from *Gelsemium elegans* by pH-zone-refining counter-current chromatography with a new solvent system screening method, *J. Chromatogr. A* 1307 (2013) 80–85.

Fernández, J., Lagos, P., Rivera, P., Zamorano-Ponce, E. (2009). Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. *Phytotherapy Research* 23, 1024–1027.

Fuentes-Barros, G.; Castro-Saavedra, S.; Liberona, L.; Acevedo-Fuentes, W.; Tirapegui, C.; Mattar, C.; Cassels, B. (2018) Variation of the alkaloid content of *Peumus Boldus* (boldo). *Fitoterapia*.127, 179-185.

Fukuda, N.; Tanaka, H.; Shoyama, Y. (2000). Isolation of the pharmacologically active saponin ginsenoside Rb1 from ginseng by immunoaffinity column chromatography. *Journal Natural Products*, 63, 283-285.

Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 1844–1858.

Goñy, L. (2007). Estudio químico y farmacológico de un extracto activo de *Buddleja globosa* hope, *Buddlejaceae*, matico y diseño de la metodología analítica. Memoria de Químico Farmacéutico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 7-20p.

Gupta. M. (1996). 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. CYTED. Convenio Andrés Bello. Colombia.

Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 27, 1–93.

Halliwel, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 33–50.

Hamzaoui, M., Renault, J. H., Reynaud, R., Hubert, J. (2013). Centrifugal partition extraction in the pH-zone-refining displacement mode: An efficient strategy for the screening and isolation of biologically active phenolic compounds. *J. Chromatogr. B* 937, 7–12.

Harborne, J.R. (1993). Introduction to Ecological Biochemistry, forth ed. Academic Press, Elsevier, London, 1–32.

Herderich, M., Richling, E., Roscher, R., Schneider, C., Schwab, W., Humpf, H. U., and Schreier, P. 1997. Application of atmospheric pressure ionisation HPLC-MS-MS for the analysis of natural products. *Chromatographia*: 45, 127–132.

Herrera, M.C., Luque de Castro, M.D. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography* 1100 (1), 1–7.

Higdon, J.V., Frei, B., (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43, 89–143.

Hoffman, A; Farga, C; Lastra, J; Veghasi, E. (1992). Plantas medicinales de uso común en Chile. Fundación Claudio Gay. 273 p.

Hu, R., Daia, X., Lub, Y., Pana, Y. (2010). Preparative separation of isoquinoline alkaloids from *Stephania yunnanensis* by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*, 878. 1881–1884.

Inui. T., Wang.Y, Pro. S.M., Franzblau. S. G., Pauli. G.F. (2012). Unbiased evaluation of bioactive secondary metabolites in complex matrice, *Fitoterapia*, 83, 1218-1225.

Ito, Y., Bowman, R. L., Countercurrent chromatography: liquid liquid partition chromatography without solid support. *Science*.1970, 167, 281–283.

Ito, Y. Y, Ma. (1996). pH-zone-refining countercurrent chromatography, *J. Chromatogr. A* 753, 1–36.

Ito, Y. (2002). In *Countercurrent Chromatography: The Support-Free Liquid Stationary Phase*, A. Berthod (Ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 38, pp. xix–xx, Elsevier, Amsterdam

Ito, Y. (2005) Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1065, 145–168.

Karakashov, B, Grigorakis, S, Loupassaki, S, Makris, D. (2015). Optimisation of polyphenol extraction from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 2, 1–8.

Katsampa, P, Valsamedo, E, Grigorakis, S, Makris, D. (2015). A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box–Behnken experimental design and kinetics. *Industrial Crops and Products* 77, 535–543.

Kawasaki, M, Hayashi, T, Arisawa, M, Morita, N, Berganza, L. (1988) "8-Hydroxytricetin 7-Glucuronide, a B-Glucuronidase inhibitor from *Scoparia dulcis*" en *Phytochemistry* N°27, Ed. Pergamon Press, Oxford, 1988, pp. 3709-3711.

Kazimierz, S., Szmanska, R., Swiezewska, E., Skroupinska, T., Suwalsky, M. (2009). Tocochromanols, Plastoquinone and polyprenols in selected plant species from Chilean Patagonia. *Acta biologica Cracoviensia*, 51(1): 39-44.

Kinghorn, A. D., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Mehta, R. G., Moon R. C., Moriarty, R. M., & Pezzuto, J. M. (1998). Cancer chemopreventive agents discovered by activity-guided fractionation: A review. *Current Organic Chemistry*, 2, 597–612.

Kliebenstein D.; Osbourn A. (2012). Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:415–423.

Konrath, E. L., Santin K., Nassif M., Latini, A., Henriques A, Salbego C (2008). Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation in vitro. *Neurotoxicology* 29 (6), 1136-1140.

Letelier, M.E and Salas, E.A. (2014). Use of a standardised dry extract of leaves of *Buddleja globosa* hope, BG-126, for the treatment and prevention of gastrointestinal disorders caused by treatment with nitrofurantoin and other antimicrobials. United States patent US8852654 B2 (US 20140017344, WO2012100365A1).

Li L, Tsao R, Liu Z, Liu S, Yang R, Young JC, Zhu H, Deng Z, Xie M, Fu Z. (2005). Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium* L. by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*; 1063: 161–169.

Li, L. Liu, C. Chen, Z. Wang, J. Shi, D. LIU, Z. (2009). Isolation and Purification of Plantamajoside and Acteoside from Plant Extract of *Plantago asiatica* L. by High Performance Centrifugal Partition Chromatography. *Chemical Research in Chinese Universities* 25(6), 817-821.

Li, H.M., Kim, J.K., Jang, J. M., Cui, C.B., Lim, S. S. (2013). Analysis of the inhibitory activity of *Abeliophyllum distichum* leaf constituents against aldose reductase by using high-speed counter current chromatography. *Archives of Pharmacal Research*.

Liao, Y.H., Houghton, P.J., Hoult, J.R. (1999). Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *J. Nat. Prod.* 62 (9), 1241–1245.

Liang, C., Park, A., Guan, J. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*. 2(2). 329-333.

Lu. Tie., Yum-Di. Shi., Xue- Jun. Li. (2016). Oxidate stress and diabetic wound healing, *The Faseb Journal*, 30 (1).

Lu, P., Sun, H., Zhang, L., Hu, H., Zhang, L., Zhao, F., Ge, C., Yao, M., Wang, T., Li, J. (2012) Isocorydine targets the drug-resistant cellular side population through PDCD4-related apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Mol. Med.* 18, 1136–1146.

Luque de Castro, M.D., Garcia-Ayuso, L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 369 (1–2), 1–10.

Makris D.P. (2015). A Novel Kinetic Assay for the Examination of Solid-Liquid Extraction of Flavonoids from Plant Material. *Journal of Chemical Sciences.* 5(11), 18-23.

Martin, J.F., Demain, A.L. (1978). The filamentous fungi. In: Smith, J.E., Berry, D.R. (Eds.), *Developmental Mycology*, vol. 3. Edward Arnold, London.

Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3 (3), 253–260.

Maurya, A., Srivastava, S. K. (2009). Large-scale separation of clavine alkaloids from *Ipomoea muricata* by pH-zone-refining centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. B*, 877, 1732–1736.

Mensah, A; Houghton, P; Bloomfield, S; Vlietnck, A; Berghe, D. (2000). Know and novel terpenes from *Buddleja globosa* displaying selective antifungal activity against dermatophytes. *Journal of Natural Products*, 63(9): 1210-1213.

Mensah. A.Y., Houghton, P.J., Hughes, M., Cherry, G. (1998). In vitro investigation of the wound-healing properties of *Buddleja globosa*. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 83.

Mensah. A.Y, Sampson. J, Houghton. P.J., Oughton. P.J, Hylands. P.J, Westbrook. J, Dunn. M., 2001, Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *Journal Ethnopharmacol.* 77:219-226.

Miranda-Rottmann S, Aspillaga. A, Perez. D, Vasquez. L, Martinez. ALF, Leighton. F. (2002). Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50:7542–7547.

Misle. E., Garrido.E., Contardo. H., González. W. (2011). Maqui [*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz] the Amazing Chilean Tree: A Review. *Journal of Agricultural Science and Technology B* 1, 473-482.

Montenegro, G.; Gómez, M.; Díaz, J.; Pizarro, R. (2008). Application of the Chilean official standard to designate the botanical origins of honey for the characterization of the national apicultural production. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35: 145-154.

Montes, M. y Wilkomirsky, T. (1985). *Medicina tradicional chilena*. Concepción, Chile. Universidad de Concepción. 206 p.

Montes, M., Wilkomirsky, T. (1987). *Medicina Tradicional Chilena*. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Muñoz, O; Montes, M; Wilkomirsky, T. (2001). *Plantas medicinales de uso en Chile, químico y farmacéutico*. Editorial Universitaria.

Muñoz. O, *Química de la flora de Chile*. Santiago, Chile. (1992). 153-164p.

Muñoz, C. (1966) *Sinopsis de la flora de Chile*. Ediciones de la Universidad de Chile Navas, L.E. *Flora de la cuenca de Santiago de Chile*, Tomo III, Ediciones de la Universidad de Chile. Santiago, Chile, 1979.

O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., Speisky, H., 2006. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico Biological Interactions*. 159, 1–17.

Ou, B., Chang, T., Huang, D., Prior, R.L. (2013). Determination of Total Antioxidant Capacity by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using Fluorescein as the Fluorescence Probe: First Action 2012.23. *Journal of AOAC International*, 96(6), 1372-1376

Pardo F., Perich, F., Villarroel L., Torres, R. (1993). Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 39:221-222.

Pardo, F., Perich, F., Torres, R. (1997). Un nuevo glicosido de *Buddleja globosa* con actividad bactericida. *Bol. Soc. Quím.* 42, 101–104.

Pastene, E.; Troncoso, M.; Figueroa, G.; Alarcón, J.; Speisky, H. (2009). Association between polymerization degree of apple peel polyphenols and inhibition of *Helicobacter pylori* urease. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2), 416–424.

Pastene. E., Parada. V., Avello. M., Ruiz. A., García. A, (2014). Catechin-based Procyanidins from *Peumus boldus* Mol. Aqueous Extract Inhibit *Helicobacter Pylori* Urease and Adherence to Adenocarcinoma Gastric Cells, *Phytotherapy Research*, 28(11), 1637–1645.

Pauli, G. F., Chen, S. N., Friesen, J. B., McAlpine, J.B., Jaki. B.U. (2012), Analysis and Purification of Bioactive Natural Products: The AnaPurNa Study, *Journal of Natural Products*, 75, 1243 –1.255.

Quezada. M., Asencio. M. Valle, J.M., Aguilera, J.M., Gomez. B., (2004), Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves, *Journal of Food Science* 69, 371–376.

Qi P, Wang J, Jin J, Su F, Chen J, 2010, 2,4-Dimethylphenol imprinted polymers as a solid-phase extraction sorbent for class-selective extraction of phenolic compounds from environmental water, *Talanta*, 81, 1630–1635.

Qiu. F., Cai. G., Jaki. B.U., Lankin. D.C., Franzblau. S.G., Pauli. G.F. 2013. Quantitative Purity – Activity Relationships of Natural Products: The Case of

Anti-Tuberculosis Active Triterpenes from *Oplopanax horridus*, *Journal of Natural Products*, 76, 413-419.

Qiu. F, Friesen. B.J, McAlpine. J. B., Pauli. G. F. 2012. Design of countercurrent separation of *Ginkgo biloba* terpene lactones by nuclear magnetic resonance, *Journal of Chromatography A*, 1242, 26-34.

Radosevic. K, Curko. N, Gaurina. V, Cvjetko. M, Tomasevic. M, Kovacevic. K, Radojicic. I, 2016. Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity, *Journal Food Science and Technology*, 73, 45-51.

Ramos. R.F., Friesen, J. B., Nikolic, D., Simmler, C., Napolitano, J.G., Van Breemen, R. Lankin, D.C., McAlpine, J. B., Pauli, G.F., Chen, S.N. 2014. K-Targeted Metabolomic Analysis Extends Chemical Subtraction to DESIGNER Extracts: Selective Depletion of Extracts of Hops (*Humulus lupulus*), *Journal of Natural Products*, 77, 2595 –2604.

Renault J.-H., Nuzillard J.-M., Le Crouérou G., Thépenier P., Zéches-Hanrot M., Le Men-Olivier L. (1999). Isolation of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode. *J. Chromatogr. A* 849, 421-431.

Roach, F. 2001. Análisis prospectivo del mercado de hojas de boldo (*Peumus boldus* Mol.) y sus posibilidades de desarrollo. Memoria para optar al título de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 87 p.

Rocha, L., Soares, M., Correa, C. 'Análise da contaminação fungica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus Boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil'. *Revista brasileira de Ciências Farmacéuticas* 40 (4). Sao Paulo, 2004.

Rodríguez. G., Rodríguez. R., Barrales. H.L., 2004. Plantas ornamentales chilenas. Concepción, Chile. Ed. Aníbal Pinto S.A, 38p.

Rubilar M, Pinelo M, Ihl M, Scheuermann E, Sineiro J, Nuñez MJ. 2006. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. *J Agr Food Chem* 54(1):59–64.

Ruíz, M. 2011. Efecto de Extractos acuosos del follaje de ocho especies arbóreas nativas de Chile en la capacidad infestiva de *Meloidogyne hapla* Chitwood (1949). Tesis Licenciado en Agronomía. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. Escuela de Agronomía. 65 p.

Ruíz. M., Pastene. E., Vergara. C., Von Baer. D., Avello. M., Mardones. C., 2016. Hydroxycinnamic acid derivatives and flavonol profiles of maqui (*Aristotelia chilensis*) fruits. *Journal Chilean. Chemistry*, 61, 2792-2796.

Sánchez, G. 2010. Los mapuchismos en el Diccionario de la Real Academia Española (DRAE). *Boletín de Filología*, 45 (2), 149 – 256.

Sarker. S.D., Latif. Z., Gray. A.I, 2005, *Natural Products Isolation*, 2a ed. Estados Unidos. Humana Press. *Methods in Biotechnology*, Vol. 20, 529p

Schirckel. S, Bittner, M., 2010, *La salud en nuestras manos: Plantas medicinales en Chile, Riqueza Natural y Científica*, 2ª edición, Impreso en Concepción, 238pp.

Shoyama, Y.; Tanaka, H.; Fukuda, 1999, *Monoclonal antibodies against naturally occurring bioactive compounds*, *Cytotechnology*, 31, 9–27.

Schmeda-Hirschmann, G.; Astudillo, L.; Bastida, J.; Codina, C.; De Arias, A; Ferreira, M; Inchausti, A. and Yaluff, G. 2001. Cryptofolione derivatives from *Cryptocarya alba* fruits. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53: 563–567.

Schreckinger, M.E., Wang, J., Yousef, G., Lila, M.A., Gonzalez de Mejia, E., 2010. Antioxidant capacity and in vitro inhibition of adipogenesis and inflammation by phenolic extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8966–8976.

Silva, M., Bittner, M., 1992. Estudio químico de las especies de la familia Eleocarpaceae que crecen en Chile. In: O. Munoz (Ed.), *Química de la Flora de Chile*, Universidad de Chile, pp. 153–166.

Smith, R.M., 2003. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A* 1000 (1–2), 3–27.

Simirgiotis, M.J.; Silva, M.; Becerra, J.; Schmeda-Hirschmann, G. (2012). Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Food Chemistry*, 131, 318–327.

Simirgiotis, M. 2013. Antioxidant Capacity and HPLC-DAD-MS Profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) Fruits and Comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules*. 18, 2061-2080.

Simirgiotis, M.J., Schmeda-Hirschmann, G., 2010. Direct identification of phenolic constituents in boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 443–449.

Soto, C., Caballero, E., Pérez, E., Zúniga, M.E., 2013, Food and bioproducts processing 92, 328–333.

Speisky, H. 1991. Activity of boldine on rat ileum. *Planta Médica*, 57, 519-522.
Strzalka, K., Szymanska, R., Świeżewska, E., Skorupinska-Tudek, K. Suwalsky, M. 2009. Tocochromanols, plastoquinone and polyphenols in selected plant species from Chilean Patagonia. *Acta biológica cracoviensia. Series Botánica* 51(1): 39–44.

Sujata, B., Nagasampagi, B., & Meenakshi, S. (2009). *Natural Products* (pp. 1–8). Oxford.

Sun, Y. J., Pei, L.X., Wang, K.B., Sun, Y.S., Wang, J. M., Zhang, Y. L., Gao, M. L., Ji, B.Y., 2015. Preparative Isolation of Two Prenylated Biflavonoids from the Roots and Rhizomes of *Sinopodophyllum emodi* by Sephadex LH-20 Column and High-Speed Counter-Current Chromatography. *Molecules*, 21, 10-13.

Suwalsky, M., Vargas, P., Avello, M., Villena, F., Sotomayor, C.P, 2008, Human erythrocytes are affected in vitro by flavonoids of *Aristolotelia chilensis* (Maqui) leaves. *Int J Pharm* 363:85–90.

Tahara S. (2007). A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71:1387–1404.

Tanaka, H., Shoyama, Y. 1998, Development of ELISA-analysis methods for the quantification of bioactive natural products in plants, phytomedicines and in humans or similar. *Phytomedicine*. 5, 397-415.

Tanaka, H.; Fukuda, N.; Shoyama, Y. 1999, Formation of monoclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rb1 and its characterization, *Cytotechnology*, 29, 115 –120.

Tanaka, H.; Fukuda, N.; Shoyama, Y. 2007. Eastern Blotting and Immunoaffinity Concentration Using Monoclonal Antibody for Ginseng Saponins in the Field of Traditional Chinese Medicines, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3783-3789.

Toribio, A, Nuzillard, J.M, Renault, J.H. Strong ion-exchange centrifugal partition chromatography as an efficient method for the large-scale purification of glucosinolates. *Journal of Chromatography A* 1170 (2007) 44–5

Toribio, A., Delannay, E., Richard, B., Plé, K., Zèches-Hanrot, M., Nuzillard, J.M., Renault, J.H. (2007). Preparative isolation of huperzines A and B from *Huperzia serrata* by displacement centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1140.101–106.

Torres, V. 2007, Evaluación de las actividades analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas de las hojas de *Aristolelia chilensis* y de sus potenciales efectos tóxicos. Memoria de químico farmacéutico. Santiago Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 3-27p.

Van Ginkel, A. 1999. Monografía Boldo (*Peumus boldus* Mol.), *Fitomédica*, 21, 64-75.

Vidal, L., Avello, M., Loyola, C., Campos, J., Aqueveque, P., Dungan, S., Galotto, G., Guarda, A. 2013. Microencapsulation of maqui (*Aristolelia chilensis* [Molina] Stuntz) leaf extracts to preserve and control antioxidant properties. *Chilean Journal of Agricultural Reserch*. 73(1),17-23.

Vinatoru, M., Toma, M., Filip, P., Achim, T., Stan, N., Mason, T.J., Mocanu, P., Livezeanu, G., Lazurca, D., 1998. Ultrasonic Reactor Dedicated to the Extraction of Active Principles from Plants. Romanian Patent, Nr. 98-01014.

Vinatoru, M. 2001, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*. 8, 303-313.

Vogel, H.; Razmilic, I.; San Martín, J.; Doll, U. y González, B. 2008. *Plantas Medicinales Chilenas. Experiencia de Domesticación y Cultivo de Boldo, Matico, Bailahuén, Canelo, Peumo y Maqui*. Segunda Edición. Editorial de la Universidad de Talca. 194 p.

Weisz, A.; Scher, A.L.; Shinomiya, K.; Fales, H.M.; Ito, Y. (1994). A new preparative-scale purification technique; pH-zone-refining countercurrent chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 704–708.

Wilson, I. D. and Brinkman, U. A. Th. 2003. Hyphenation and hypernation: the practice and prospects of multiple hyphenation. *Journal Chromatography A*, 1000, 325–356.

Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64 (1), 3–19.

Wolfender, J. L., Abe, F., Nagao, T., Okabe, H., Yamauchi, T., and Hostettmann, K. 1995, Liquid chromatography combined with thermospray and continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometry of glycosides in crude plant extract. *J. Chromatogr. A* 712, 155–168.

Wolfender, J.L, Ndjoko, K, Hostettmann, K., 2001, The potential of LC-NMR in phytochemical analysis, *Phytochemistry Analysis*, 12(1), 2-22.

Xie, J.; Chen, L.; Li, C.; Xu, X. 2003. Selective extraction of functional components derived from herb in plasma by using a molecularly imprinted polymer based on 2,2-bis (hydroxymethyl) butanol trimethacrylate, *Journal of Chromatography B*, 788, 233 –242.

Xie C, Xu X, Liu Q, Xie Z, Yang M, Huang J, Yang D. Isolation and purification of echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa* (Schrenk) Wight by high-speed counter-current chromatography. *J Liq Chrom Rel Technol* 2012; 35: 2602–2609.

Yang, Y., Zhang, F., 2008. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry* 15 (4), 308–313.

Yuan, C. S.; Tanaka, H., 2011. Bioactivity of American ginseng by knockout extract preparation using monoclonal antibody, *Current Drug Discovery Technologies*, 8, 32 –41.

Zalata AA, Lammertijn N, Christophe A, Comhaire FH. The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *Int J Androl*. 1998, 21(5):289-294.

Zu, G., Zhang, R., Yang, L., Ma, C., Zu, Y., Wang, W., Zhao, C., 2012. Ultrasoundassisted extraction of carnosic acid and rosmarinic acid using ionic liquid solution from *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Molecular Science* 13 (9), 11027–11043.

Capítulo 2:

Title:

Green extraction and purification of phenolic compounds from *Buddleja globosa* (Matico) leaves using Natural Deep Eutectic Solvents and Centrifugal Partition Chromatography

Jeniffer Torres^a, Sergio Gómez-Alonso^c, José Pérez-Navarro^c, Julio Alarcón Enos^b, Edgar Pastene-Navarrete^{a, b}

^a Pharmacognosy Laboratory, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Concepción, Concepción, Chile.

^b Laboratorio de Síntesis y Biotransformación de Productos Naturales, Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile.

^c Regional Institute for Applied Scientific Research, Faculty of Chemical Sciences, University of Castilla-La Mancha, Castilla-La Mancha, Spain.

*Corresponding author: Edgar Pastene-Navarrete; email:

edgar.pastene@gmail.com

Formato manuscrito, enviado en enero a Journal of Applied Research on
Medicinal and Aromatic Plants

Abstract

Extraction of phenolic compounds with wound-healing properties from *Buddleja globosa* (Scrophulariaceae) was performed with Natural Deep Eutectic Solvents (NADES). The extraction yield of polyphenols was tested for eight NADESs and compared with methanol. Chemical profiling was done by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization (HPLC-DAD-ESI-IT/MS) and quadrupole time-of-flight high-resolution mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF/MS). For the first time, in this study we achieve the identification of 17 main phenolic compounds in *B. globosa* leaf extracts. Two compounds were tentatively identified as caffeoyl glucoside isomers. Also, caffeoylshikimic acid was identified. Several verbascoside derivatives were present in the extract such as β -hydroxyverbascoside and β -hydroxyisoverbascoside (compounds 5 and 6). Among flavonoids compounds, the presence of 6-hydroxyluteolin-7-O-glucoside, quercetin-3-O-glucoside, luteolin 7-O-glucoside, apigenin 7-O-glucoside was confirmed. Campneoside I, forsythoside B, lipedoside A and forsythoside A were identified along with verbascoside, isoverbascoside, eukovoside and martynoside. The contents of verbascoside and luteolin 7-O-glucoside after extraction with 80% methanol were 26.171 ± 0.554 mg/g and 3.209 ± 0.0905 mg/g respectively.

Verbascoside and forsythoside B were isolated in one-step from *B. globosa* extracts using optimized centrifugal partition chromatography (CPC)

methodology. On the other hand, among the NADESs tested in this study, proline- citric acid (1:1) and choline chloride-1,2- propanediol (1:2) were the most promising solvents. With these NADES, extraction yields for verbascoside and luteolin 7-O-glucoside were $51.045 \pm$ and 4,387 mg/g, respectively. Taken together, the results of this study confirm that NADESs have higher extraction efficiency of phenolic compounds presents in medicinal plants and could be used as ecofriendly alternative to classic organic solvents.

Keywords: Natural deep eutectic solvents; *Buddleja globosa*; phenylpropanoids; Centrifugal Partition Chromatography, verbascoside.



1. Introduction

Buddleja globosa Hope (Scrophulariaceae) is a native species cultivated in Chile, Peru and Argentina. In Chile *B. globosa* grows from Santiago to Patagonia [1]. It is known as 'matico', 'palguin' and 'pañil' and is widely used as a medicinal plant. Its large, perennial leaves contain phenylpropanoids, iridoids, terpenes and flavonoids [2, 3, 4]. Matico is a plant often used in Mapuche culture and is applied for the treatment of different wounds (internal and external), as well as intestinal and liver problems [5]. In the previous work of Backhouse et al, matico leaves were extracted with solvents of increasing polarity to obtain different fractions. These fractions were used in conjunction with a methanolic crude extract to evaluate the in vivo antinociceptive effect [6]. In addition, verbascoside, luteolin 7-O-glucoside and apigenin 7-O-glucoside were isolated and identified. Importantly, all extracts showed an analgesic concentration-dependent effect. Verbascoside was more active than ibuprofen in the writhing test after oral administration, while luteolin 7-O-glucoside was more active in the tail-flick test when was used topically [6]. On the other hand, the in vitro antioxidant effect of matico on DPPH assay and rat liver microsomes has been investigated, finding a direct relationship between antioxidant activity and the content of polyphenols determined by Folin Ciocalteu method [7]. Since oxidative stress is a hallmark of inflammatory processes, the anti-inflammatory activity displayed by matico extracts may be

explained, at least in part, in terms of their antioxidant activity. For instance, in other study of Backhouse and coworkers a *B. globosa* extract shown DPPH and superoxide anion radical scavenging properties along with analgesic and anti-inflammatory activities linked with inhibition of xanthine oxidase [8]. In the same work, authors isolate betasitosterol, stigmasterol, stigmastenol, stigmastanol, campesterol and beta-sitosterol-glycoside, compounds that shown anti-inflammatory properties in the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced ear edema assay. Also, have been reported that these extracts promote in vitro fibroblast proliferation, which together with the antioxidant activity may explain the wound healing properties claimed for this plant [9]. Verbascoside also known as acteoside has been pointed out as the compound responsible for most of its bioactive properties. Despite of these bioactivities are attributed to verbascoside, there are a paucity of chemical studies regarding the identification of other compounds present in this plant. Furthermore, in-depth phytochemical reports using highend technologies are scarce for this plant. Phenolic compounds identification in plant matrix can be a complex task because there is a wide variety of structures. Besides, many polyphenol standards are not commercially available. Until now, the isolation of bioactive compounds from *B. globosa* has been performed by conventional extraction techniques [6, 10, 11] using organics solvents such as alcohols, chloroform and ethyl acetate. However, some of these organic solvents are often toxic, flammable, explosive, and poorly biodegraded. In the last decade,

several eco-friendly alternatives to the use of organic solvents have appeared. Among them, new types of solvents known as Deep Eutectic Solvents (DES) have been developed. DES are a mixture between a halide salt or other hydrogen bond acceptor (HBA) and a hydrogen bond donor (HBD). Dai and coworkers reported the preparation of several DES of natural origin termed Deep Natural Eutectic Solvents (NADES) [12]. NADES solvents are obtained exclusively from natural components (e.g. sugars, organic acids, amino acids) which are commonly present in the cells of living organisms, unlike ordinary DES [12,13]. The components of NADES are characterized by the presence of several functional groups such as hydroxyls, carboxyl, or amino groups. Those groups can form intermolecular hydrogen bond, leading to highly structured viscous liquids, which accounts for their specific physical properties and different solubilizing behavior compared to conventional solvents. Those liquids can also form hydrogen bonds with solutes, thereby greatly increasing the solubility of compounds in NADES, e.g. phenolic compounds. They also show very good physicochemical properties: liquid state below 0°C, adjustable viscosity, a broad range of polarities, and ability to dissolve a wide range of compounds [14, 15, and 16]. This high solubilization strength have been reported for rutin, been in some cases as much as 12,000 times higher than water [13]. All these properties indicate their great potential as green extraction solvents for natural products [12]. In the present work, for the first time we explore eight NADES as extraction solvents to obtain bioactive

components of *B. globosa*. On the other hand, the separation techniques that have been used to determine phenolic compounds in this plant were gas chromatography (GC) and mainly high-performance liquid chromatography (HPLC), all coupled to different detection systems [8,17]. However, there is not studies considering liquid chromatography coupled to mass spectrometry. So, due to its inherent characteristics of accurate mass measurements and multiple stages analysis, the integrated strategy of liquid chromatography (LC) coupled with time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) and ion trap mass spectrometry (IT-MS) is well-suited to be performed as qualitative analysis tool in this field [18]. Solid support-based chromatography is the most used to purify phenolic compounds, however, irreversible adsorption and stationary phase limitations decreases the efficiency of the isolation process [19]. Centrifugal partition chromatography (CPC) is a support-free technology that has been successfully used to isolate phenylethanoid glycosides compounds [20]. Due to these advantages CPC could be used to isolate large number of bioactive compounds to perform pharmacological assays. Considering the above mentioned in the text, the aims of the present work were to carry out a qualitative and quantitative characterization of phenolic compounds contained in matico leaves using HPLC-DAD-IT/MS and HPLC-DAD-Q-TOF/MS, to develop a one-step separation of main *B. globosa* bioactive compounds verbascoside and forsythoside B using centrifugal CPC partition chromatography (CPC) and to evaluate the feasibility of eight different

NADESs for the extraction of bioactive compounds from *B. globosa* compared with metanol (MeOH).

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Leaves of *B. globosa* were collected in fall 2017 from Chiguayante, Biobio Region, Chile. Voucher specimens, CONC N° 187540 identified by Dr. Roberto Rodriguez, were deposited in the Herbarium of the Botany Department, University of Concepción, Chile. Firstly, leaves were air-dried at room temperature in the dark for 14 days, and then ground to a fine powder using a domestic blender (Bosch MMB 112R, Stuttgart, Germany). This material was used for all further procedures. For LC-MS analyses, extraction of phenolic compounds was carried out using a soxhlet system. In brief, 25 g of the pulverized material was weighed, and 100% methanol was used as solvent. The process was carried out until the exhaustion of the plant material was produced (16 h). Then, methanol was removed under vacuum (< 40 °C) to dryness. Extract was dispersed in 1 mL of 20% methanol and filtered (MFS-25, 0.22 µm TF, WHATMAN, U.S.A.), before being injected into the HPLC systems.

2.2. Chemicals and reagents

Choline chloride, L-(+)-lactic acid, glycerol, 1, 2-propanediol were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Citric acid and L-proline were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Verbascoside, luteolin 7-O-glucoside and apigenin 7-O-glucoside commercial standards of HPLC grade (> 99%) (Extrasynthese, Genay, France) were used as references for identification. Methanol, ethanol, ethyl acetate, n-butanol, methyl tert-butyl ether and acetonitrile were of HPLC quality. Formic acid was of analytical grade (> 99%).



2.3. Preparation of NADES

The synthesis of all NADES used in the present work was based on previous research [12, 21]. In brief, lactic acid, choline chloride and L-proline (hydrogen bond donor – HBD) were mixed with sodium acetate, ammonium acetate, glycerol, 1, 2-propanediol (hydrogen bond acceptors – HBA) at proper molar ratios and the mixtures were heated under stirring, until a homogeneous liquid was reached. NADES were kept in the dark inside capped flasks at ambient temperature. The codes of the NADES used in this study, along with details regarding their synthesis are shown in **Table 1**.

Table 1. Composition of the natural deep eutectic solvents (NADES) used in the present study

Code	NADES composition	Molar ratio	Conditions
NADES1	Lactic acid: choline chloride	3:1	15 min; 50°C; 700 rpm
NADES2	Lactic acid: sodium acetate	3:1	15 min; 50°C; 700 rpm
NADES3	Lactic acid: ammonium acetate	3:1	15 min; 50°C; 700 rpm
NADES4	Lactic acid: glycerol: water	3:1:3	40 min; 50°C; 900 rpm
NADES5	Choline chloride: 1,2-propanediol	1:3	20 min; 60°C; 1000 rpm
NADES6	Choline chloride: glycerol	1:2	60 min; 80°C; 1000 rpm
NADES7	Choline chloride: lactic acid	1:1	60 min; 60°C; 1000 rpm
NADES8	L-Proline: Citric acid	1:1	120 min; 80°C; 1000 rpm

2.4. Extraction of phenolic compounds of *B. globosa* leaves with different NADES

All NADES were used as 80% (v/v) aqueous solutions, incorporating water 20% to reduce the viscosity. Extractions were carried out according to a previously described methodology [21]. Plant material (0.1 g) was placed in a 50 mL conical tube and 10 mL of NADES was added. As control, we use methanol under the same extraction conditions used for the NADES. The

mixtures were shaken vigorously manually for a few seconds to form a slurry and then extracted through heating and stirring (Büchi Syncore Polyvap R24, Switzerland). Extraction conditions were: 340 rpm, 60°C for 50 min. Then, samples were centrifuged at 8000 rpm for 10 min (Eppendorf 5804 R, USA). The supernatants were diluted four times with mobile and filtered through a 0.22 µm cellulose acetate membrane filter prior to HPLC analysis.

2.5. Instruments and chromatographic conditions

2.5.1. Qualitative and Quantitative HPLC-DAD-IT-MS/MS analysis

The samples were analyzed by HPLC-DAD-ESI-MSn in an Agilent 1100 Series system (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a DAD (G1315B) and LC/MSD Trap VL (G2445C VL) ESI-MSn system, and it was coupled to an Agilent Chem Station (version B.01.03) data-processing station [22]. The mass spectral data were processed with the Agilent LC/MS Trap software 5.3 (version 3.3). A Zorbax Eclipse XDB-C18 Narrow-Bore column (2.1 mm x 150 mm; 3.5 µm) thermostated at 40 °C was employed and the chromatographic conditions were as follows: solvent A (water/formic acid/acetonitrile, 87:10:3, v/v/v), solvent B (acetonitrile/water/formic acid, 50:40:10, v/v/v), and solvent C (methanol/water/formic acid, 90:1.5:8.5, v/v/v). The flow rate was 0.190 mL/min. The linear solvent gradient was as follows: zero min, 96% A and 4% B; 8 min, 96% A and 4% B; 37 min, 70% A, 17% B, and 13% C; 51 min, 30%

A, 40% B, and 30% C; 56 min, 10% A, 50% B, and 40% C; 62 min, 30% B and 70% C; 68 min, 30% B and 70% C; 70 min, 100% C; 75 min 100% C and post time of 8 min 96% A and 4% de B and the injection volume was 20 μ L. The mass spectrometer was run in the negative ion mode with following parameters: the capillary voltage was set at 3500 V, drying gas flow N₂, 8 mL/min; drying temperature, 350°C; nebulizer, 40 psi; and scan range, 100–1000 m/z. A calibration curve with a range of 0.5 –250 mg/L was prepared by triplicate for verbascoside ($y=152.41x - 71.644$) and 0.3 – 22 mg/L for luteolin 7-O-glucoside ($y= 264.73x - 51.693$).



2.5.2. Q-ToF high-resolution mass spectrometry measurements

The analytical system used consisted of a 1260 Infinity high performance liquid chromatography system coupled to a diode array detector (DAD) and a 6545 quadrupole-time of flight (Q-TOF) mass spectrometer detector (Agilent, Waldbronn, Germany). The control software was Mass Hunter Workstation (version B.06.11). The Q-TOF used a Dual Jet Stream Electrospray Ionization (Dual AJSESI) source operated in the negative ionization mode and the following parameters were set: capillary voltage, 3500 V; fragmentor, 200; gas temperature, 350°C; drying gas, 8 L/min; nebulizer, 40 psig; sheath gas temperature, 400°C; sheath gas flow, 12 L/min; acquisition range, 100–1000 m/z; and CID, linear range of 30–45. Samples were analyzed after injection

(10 μ L) on a Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD column (2.1mm x 50 mm, 1.8 μ m) protected with a 5 mm guard column of the same material thermostated at 40°C. The solvent system was water with 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile-methanol (70:30, v/v) with 0.1% formic acid (solvent B). The elution gradient was (time, % of solvent A): 0 min, 95%; 1 min, 95%; 30 min, 65%; 35 min, 30%; 40 min, 20%; 45 min, 95%; and a post time of 8 min. Compounds were identified using the algorithm “Find by Formula” that evaluated the mass accuracy together with the isotopic relative abundance and isotopic separation.



2.6. Centrifugal Partition Chromatography (CPC):

2.6.1. General procedure

The centrifugal partition chromatography (CPC) device was a Spot-CPC-250-B Bio Extractor (SCPE) (Armen, France). Total cell volume was 250 mL. Descending and ascending modes were selected by a four-way switching valve. SCPE was connected to a SPOTPREP II system (Armen, France), equipped with an UV detector and fraction collector (32 mL per tube) and an injection valve with 10 mL sampling loop. In this work, separations were performed using a two-phase solvent system selected from the list presented in Table 2 [20, 23-27]. The CPC rotor was first filled with 1.5 column volumes using the lower phase at 30 mL/min and 500 rpm rotation. Afterwards, upper

phase was pumped into the system in ascending mode at a flow rates from 5-40 mL/min increasing the rotation speed up to 2000-2400 rpm. Crude *B. globosa* extract (300 mg) was dissolved in 10 mL of 1:1 mixture of upper and lower phase and loaded through 10 mL sample loop. Fractions (25 mL, 26 tubes) were collected, and monitored with a scan of 200-600 nm and wavelengths 280 and 320 nm. Extrusion was performed after 50 min run time with 100% stationary phase increasing the flow rate at 30 mL for 10 min. Pareto chart was used to evaluate the effect of rotation speed and flow rate upon stationary phase retention. The final operation conditions were chosen considering the retention of stationary phase, backpressure in the CPC column and time elapsed to obtain the target compounds.

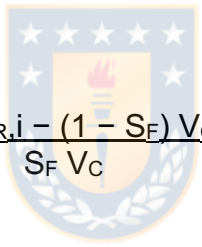
2.6.2. K_D calculations

The partition coefficient (K_D) was determined according to Ito et al., [19] with slight modifications. In brief, five mg of *B. globosa* extracts were weighed and dissolved in 3 mL of thoroughly preequilibrated upper organic and lower aqueous phases. Nine different solvent system were assayed (**Table 2**). The mixture was vigorously shaken in a 10 mL conical vials. Once settled, upper and lower phases were separated and taken to dryness. The residues were reconstituted in 1 mL of mobile phase and analyzed by HPLC following the method described above, injecting 5 μ L. Based on the ratio of HPLC peak

area of each phenolic in lower and upper phases the K_D values were calculated as follows [7]:

$$K_D = \frac{\text{HPLC peak area of phenolic in upper phase}}{\text{HPLC peak area of phenolic in lower phase}}$$

Also, the partition coefficients were calculated from the CPC chromatogram using pulse injection of *B. globosa* extract at optimal flow rate (F) according to the following Equation:


$$K_D = \frac{F t_{R,i} - (1 - S_F) V_C}{S_F V_C}$$

Where F is the optimized flow rate used in the present study, $t_{R,i}$ is the retention time of *B. globosa* target compound, S_F is the stationary phase retention and V_C is the column volume [28].

Table 2. Partition coefficients (K_D) of compounds 12 and 13 in two-phase solvent systems

#	Solvent system	Ratio v/v	K_D^a		Ref
			12	13	
1	Ethyl acetate-n-butanol-ethanol-water	0.25: 0.75: 0.1: 1	0.51	3.02	[23]
2	Ethyl acetate-n-butanol-ethanol-water	0.5: 0.5: 0.1: 1	0.19	4.96	[24]
3	Ethyl acetate-n-butanol-ethanol-water	4: 0.6: 0.6: 5	0.08	1.93	[24]
4	Ethyl acetate- n-butanol-water	10: 6: 15	1.33	0.33	[20]
5	Ethyl acetate- n-butanol-water	2:1:3	1.94	0.24	[25]
6	Ethyl acetate- n-butanol-water	13: 3: 9	0.01	0.35	[26]
7	Ethyl acetate-water	1: 1	0.00	0.02	[26]
8	Chloroform- n-butanol-methanol-water	3: 2: 4: 5	37.42	3.51	[27]
9	Chloroform- n-butanol-methanol-water	4: 3: 4: 5	41.86	3.50	[27]

^a K_D obtained from HPLC analysis described in section 2.5.1.

2.7. Statistical analysis

Statistical comparison was performed using GraphPad Prism 5. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) Data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) and the difference ($p < 0.05$) is considered significant.

3. Results and discussion

3.1 Qualitative analysis in *Buddleja globosa* methanol extract

Figure 1A and **B** illustrate the HPLC-DAD-MS chromatograms of methanol extract (soxhlet procedure) of *B. globosa* phenolic compounds. Peaks are identified with numbers (1-25) according to the elution order. As summarized in **Tables 3** and **4**, chromatographic analysis enables the identification of 17 compounds, while 8 are unknown. Assignments were based on UV-visible bands and MS data, including experimental and calculated m/z for provided assumed formulas, errors and the main fragments obtained by MS-MS and identified compounds for each peak. All the compounds were identified by the QTOF-MS and the MS-MS spectra acquired with the IT-MS and their absorption spectra in UV-visible region, as well as considering the data provided by the literature. **Figure 2** shows the chemical structures of the identified compounds. Overall, caffeoyl derivatives, phenylpropanoid glycosides and flavonoids were the most dominant compounds present in *B. globosa*.

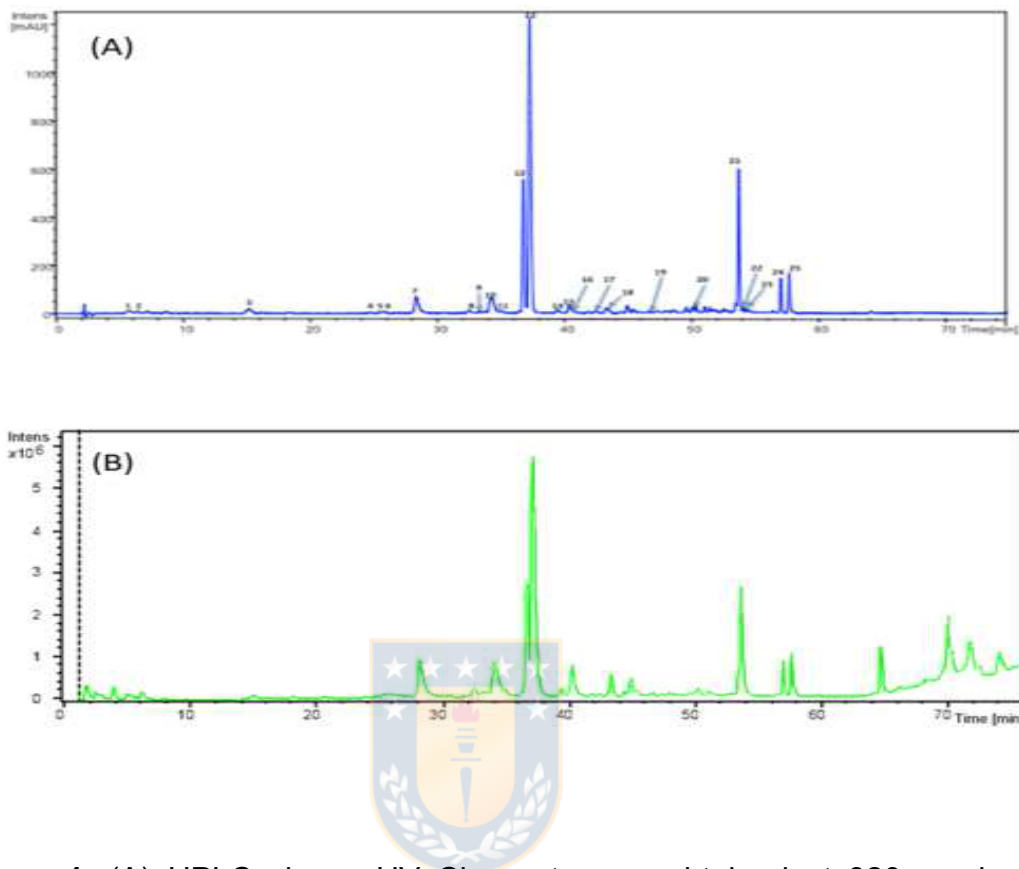


Figure 1. (A) HPLC shows UV Chromatogram obtained at 320 nm in the extract *Buddleja globosa*. (B) Total ion chromatogram (TIC) 100-1000 m/z of the methanolic extract of *Buddleja globosa*.

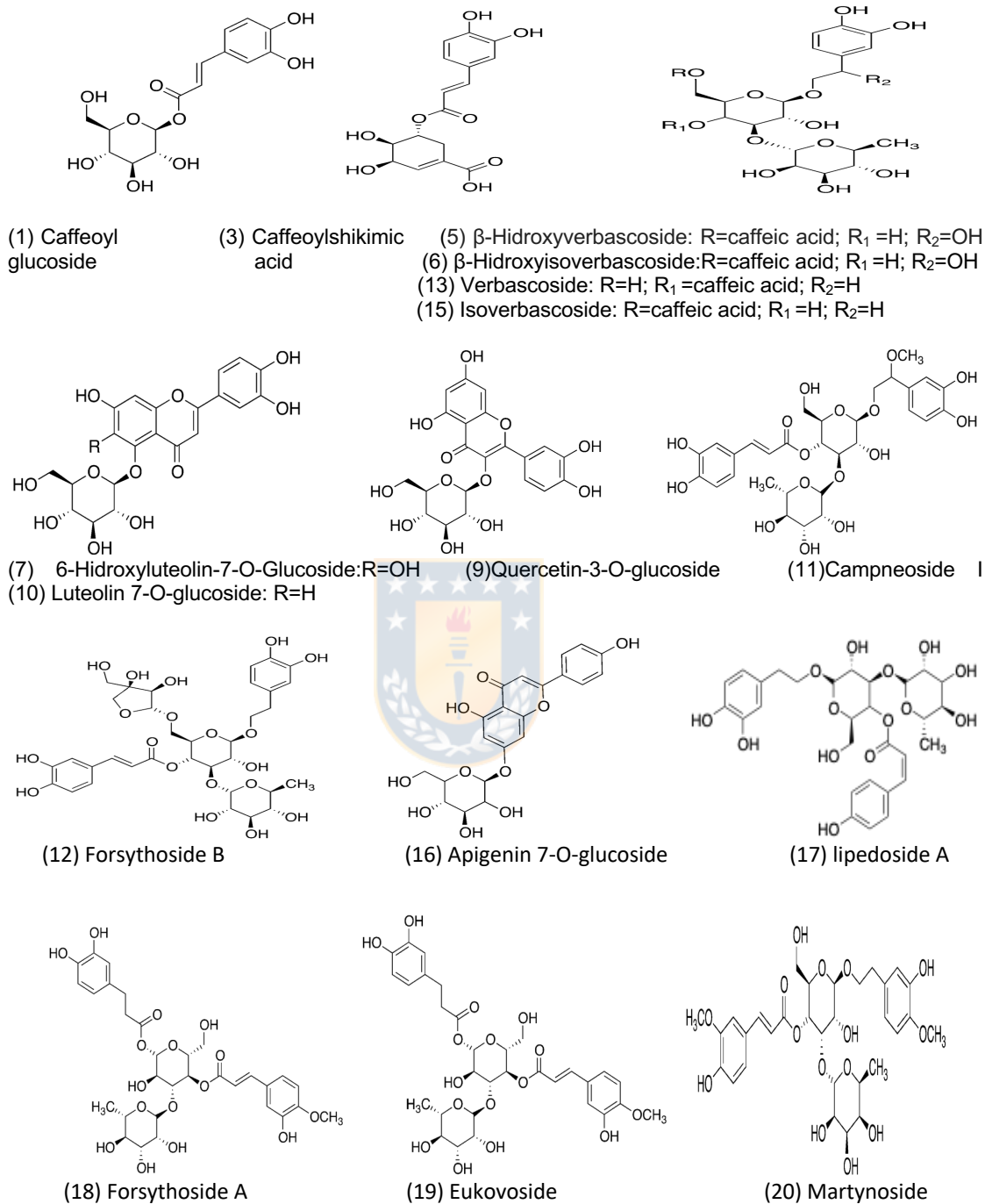


Figure 2. Chemical structures of the identified compounds in the methanol extract of leaves *Buddleja globosa*.

Table 3. Identification of targeted phenolic compounds by LC-IT-MS-MS for phenolic compounds from *B. globosa*.

Peak	t _R (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS-MS fragments	λ Max (nm)	Proposed compound
1	5.61	341.3	280.7, 250.7, 220.7, 178.7, 134.7	228, 294 sh, 327	Caffeoyl glucoside (isomer 1)
2	7.19	341.0	280.7, 250.7, 220.6, 178.6, 134.6	296 sh, 326	Caffeoyl glucoside (isomer 2)
3	15.14	335.6	178.6, 134.8	296 sh, 326	Caffeoylshikimic acid
4	24.72	537.3	518.9, 342.2, 294.7, 234.7, 178.7	294 sh, 321	Unknown 1
5	25.49	639.2	621.0, 529.0, 459.0	296 sh, 327	β -hydroxy-verbascoside
6	25.89	639.3	621.0, 528.9, 459.1	296 sh, 329	β -hydroxy- isoverbascoside
7	28.32	463.2	300.6	258 sh, 281, 344	6-Hydroxyluteolin 7-O-glucoside
8	32.49	463.4	285.3	261 sh, 281 sh, 347	Unknown 2
9	33.30	463.5	300.6	256, 260 sh, 283 sh, 351	Quercetin-3-O-glucoside
10	34.26	447.2	284.6	255 sh, 265, 282 sh, 346	Luteolin 7-O-glucosido
11	35.02	653.2	620.9, 459.0	296 sh, 332	Campneoside I

12	36.76	755.2	593.1	232, 294 sh, 331	Forsythoside B
13	37.23	623.3	460.9	296 sh, 330	Verbascoside
14	39.47	653.3	623.8, 490.8, 376.8, 308.7, 252.7	296 sh, 329	Unknown 3
15	40.37	623.2	460.8	290 sh, 327	Isoverbascoside
16	40.61	431.2	268.7	266, 333	Apigenin-7-O-glucoside
17	41.85	607.5	460.9	296 sh, 326	Lipidoside A
18	43.45	623.4	460.9	290 sh, 326	Forsythoside A
19	46.70	637.3	490.8, 460.8, 314.8	290 sh, 327	Eukovoside
20	51.04	651.3	504.9, 474.9, 456.8, 372.8, 329.0, 250.6,	286 sh, 329	Martynoside
21	53.73	763.4	667.8, 548.6, 488.9, 301.7	312	Unknown 4
22	54.08	785.2	738.9, 678.9, 576.8, 546.9, 462.7	296 sh, 322	Unknown 5
23	54.38	785.4	738.9, 678.9, 576.9, 547.0, 505.0, 462.9,	296 sh, 324	Unknown 6
24	57.03	755.5	709.0, 649.0, 546.9, 517.0, 433.0	298, 312	Unknown 7
25	57.67	755.4	709.0, 649.0, 546.9, 517.0, 432.9	298 sh, 314	Unknown 8

Table 4. Identification of targeted phenolic compounds by LC-ESI-QTOF/MS-MS for phenolic compounds from *B. globosa*.

Peak	Formula	Experimental (observed) mass	Mass (monoisotopic mass) calculated	Error ppm	[M-H] ⁻ m/z	MS-MS fragments	Proposed compound
1	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342.09569	342.09508	1.78	341.08548	281.06520, 221.04528, 179.03544, 135.04563	Caffeoyl glucoside (isomer 1)
2	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342.09544	342.09508	1.06	341.08499	281.06582, 179.03449, 135.04463	Caffeoyl glucoside (isomer 2)
3	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	336.2129	336.2087	1.2	335.17819	179.03503, 135.04486	Caffeoyl shikimic acid
4	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₃	538.1693	538.16864	1.22	537.1617	537.16155, 459.14979, 399.12976, 309.06201	Unknown 1
5	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	640.20136	640.20034	1.6	639.19359	621.18255, 529.15682, 459.15179, 251.05644,	β -hydroxy-verbascoside
6	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	640.20113	640.20034	1.25	639.19374	621.18123, 529.15366, 459.15003, 325.09311, 251.05530	β -hydroxy-isoverbascoside
7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09707	464.09548	3.43	463.08839	301.03568	6-Hydroxyluteolin 7-O-glucoside
8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09547	464.09548	0.02	463.07781	282.06828	Unknown 2
9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09569	464.09548	0.21	463.0885	300.02774	Quercetin-3-O-glucoside
10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.10213	448.10056	3.5	447.0949	285.04091	Luteolin 7-O-glucoside
11	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₆	654.21747	654.21599	2.26	653.20999	621.07113, 459.12421	Campneoside I

12	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	756.2506	756.24768	3.86	755.24353	593.21042	Forsythoside B
13	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.20799	624.20542	4.12	623.20069	461.16809, 315.10869, 161.02544	Verbascoside
14	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₆	654.21716	654.21599	1.79	653.20931	377.12629, 249.07689, 163.04006	Unknown 3
15	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.20749	624.20542	3.31	623.20047	461.16773, 315.10891, 161.02550	Isoverbascoside
16	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.10609	432.10565	1.03	431.09884	268.03810	Apigenin-7-O-glucoside
17	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	608.17317	608.17412	1.57	607.16510	461.07231	Lipidoside A
18	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.20729	624.20542	2.2	623.19644	461.16656	Forsythoside A
19	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	638.22184	638.22107	1.21	637.21464	461.16669, 315.10963, 175.04031	Eukovoside
20	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	652.23711	652.23672	0.59	651.23043	505.08127, 475.06172, 456.15642	Martynoside
21	C ₃₅ H ₄₀ O ₁₉	764.25426	764.25314	1.36	763.18271	668.02938, 549.15312, 489.07663, 301.81022	Unknown 4
22	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	786.25933	786.25824	1.38	785.25227	623.18693, 547.17931, 463.16063, 378.91956, 291.08289, 207.06629,	Unknown 5
23	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	786.25931	786.25824	1.35	785.25239	547.18298, 463.16087, 341.09857, 207.06621, 163.03947	Unknown 6
24	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	756.25029	756.24768	3.46	755.2433	709.23749, 465.02019, 405.01723, 341.00981, 285.04084	Unknown 7
25	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	756.25026	756.24768	3.42	755.24323	709.23553, 593.13026, 541.03515, 497.02419,	Unknown 8

Compound 1 ($t_R = 5.61$ min) and compound 2 ($t_R = 7.19$ min) showed similar molecular ions $[M-H]^-$ at m/z 341.3 and 341.0, respectively. The MS-MS spectrum of both compounds yielded fragment ions at m/z 281, 251, 221, 179 and 135 (**Figure 3a**). The fragment ion at m/z 179 $[M-H-162]^-$ correspond to caffeic acid which suffer a neutral loss of glucose moiety (162 Da). For **compounds 1 and 2** in negative ionization mode, the molecular formulas of ions at m/z 342.09569 and 342.09544 were predicted as $C_{15}H_{18}O_9$. These data are consistent with the identity assignment previously reported [29], where these compounds were tentatively identified as isomers of caffeoyl glucoside. To the best of our knowledge this is the first report of these compounds in *B. globosa*. **Compound 3** ($t_R = 15.14$ min) was tentatively identified as caffeoylshikimic acid ($C_{16}H_{16}O_8$, m/z 336.2129). This compound has characteristic UV max at 296 and 326 nm and give rise to a molecular ion $[M-H]^-$ at m/z 335.6 with ion fragments MS-MS at m/z 178.6 and 134.8 (**Figure 3b**). Fragment ion at m/z 178.6 $[M-H -C_7H_{10}O_5 + 18]$ suggest the loss of dehydrated shikimic acid, while fragment ion at m/z 134.8 indicate an additional loss of $-CO_2$ (44 Da). However, esterification site (5-, 4- or 3- derivatives) in this compound could not be determined in the present study [30]. This compound is reported in *B. globosa* leaves for the first time herein.

Compounds 5 ($t_R = 25.49$ min) and 6 ($t_R = 25.89$ min) produced molecular ions $[M-H]^-$ at m/z 639. 2 and ion fragments at m/z 621, 529 and 459. Fragment at m/z 621 $[M-H_2O]^-$ in MS-MS experiment belong to the loss of

water (H₂O), fragment ion at *m/z* 529 correspond to the loss of catechol unit and fragment ion at *m/z* 459 corresponded to the loss of the caffeic acid moiety (**Figure 3c**). For compounds 5 and 6 in negative ionization mode, the molecular formulas of ions at *m/z* 640.20136 and 640.20113 were predicted as C₂₉H₃₆O₁₆. These compounds were tentatively identified by comparison of its MS-MS fragmentation pattern to literature data [31], being coherent with β-hydroxyverbascoside diastereoisomers. It is important to mention that both compounds have not been reported in previous studies regarding *B. globosa*.

Compounds 7 (*t_R* =28.32 min) and **9** (*t_R* =33.30 min), showed identical molecular ions at *m/z* 463. MS-MS from precursor ion *m/z* 463 yield an abundant ion fragment at *m/z* 301 in MS-MS [M-H-162], suggesting the loss of a hexose unit. For compound 7 in negative ionization mode, the molecular formula of ions at *m/z* 464.09707 was predicted as C₂₁H₂₀O₁₂. Retention time and UV spectra indicates that compound 7 is 6-hydroxyluteolin-7-O-glucoside, a compound reported previously by Houghthon & Menash [32]. For **compound 9** in negative ionization mode, the molecular formula of ions at *m/z* 464.09569 was predicted as C₂₁H₂₀O₁₂. The UV spectrum, retention time and literature data [33] obtained for compound 9, tentatively suggest that this flavonoid could be quercetin-3-O-glucoside (isoquercitrin).

Compound 10 (*t_R* =34.26 min) produce a molecular ion [M-H]⁻ at *m/z* 447.2 yielding in MS-MS experiment an ion fragment [M-H-162] at *m/z* 284.6 suggesting a neutral loss of glucose. This compound was identified as luteolin

7-O-glucoside by comparison of their retention time, UV and MSn spectra with those of reference standard. For compound 10 in negative ionization mode, the molecular formula of ions at m/z 448.10213 was predicted as $C_{21}H_{20}O_{11}$. This flavonoid was also been reported in *B. globosa* leaves [8, 11, 34].

Compound 11 ($t_R = 35.02$ min), produce a molecular ion $[M-H]^-$ at m/z 653 yielding in MS-MS experiment an ion fragment at m/z 621 $[M-H\text{-methoxy}]^-$ and other at m/z 459 $[M-H\text{-methoxycaffeoyl}]^-$ corresponding to the loss of the caffeoyl moiety from the main ion fragment at m/z 621 [31]. In negative ionization mode the molecular formula of ions at m/z 654.21747 was predicted as $C_{30}H_{38}O_{16}$. This compound was tentatively identified as Campneoside I, which is reported for the first time in *B. globosa*.

Compound 12 ($t_R=36.76$ min) exhibited a pseudo-molecular ion $[M-H]^-$ at m/z 755, showed an intense signal from ion fragment at m/z 593 due to a loss of a caffeoyl moiety (**Figure 3f**). In negative ionization mode the molecular formula of ions at m/z 756.2506 was predicted as $C_{34}H_{44}O_{19}$. This compound was identified as forsythoside B according with literature data [35, 36].

Compound 13 ($t_R = 37.23$ min) and **Compound 15** ($t_R = 40.37$ min) exhibited a pseudo-molecular ions $[M-H]^-$ at m/z 623. The ion fragments at m/z 461 $[M-H\text{-caffeoyl}]^-$ corresponded to the loss of the caffeoyl moiety. In negative ionization mode the molecular formulas of ions at m/z 624.20799 and 624.20749 were predicted as $C_{29}H_{36}O_{15}$. Based on comparison of their

retention times, UV spectra and MS-MS fragmentation pattern compounds 13 and 15 were identified as verbascoside and its structural isomer, isoverbascoside. Verbascoside represent the dominant peak present in the extract of *B. globosa* already reported [8, 10, and 37].

Compound 16 ($t_R = 40.61$ min) exhibited a pseudo-molecular ions $[M-H]^-$ at m/z 431.2. The ion fragments at m/z 268.7 $[M-H-162]^-$ corresponded to the neutral loss of glucose. Based on its MS-MS fragmentation pattern, compound 16 was identified as apigenin 7-O-glucoside. In negative ionization mode the molecular formula of ions at m/z 432.10609 was predicted as $C_{21}H_{20}O_{10}$. This assignation was confirmed by comparison of its retention time, UV and MSn spectra with those of reference standard. Goity and coworkers previously reported this compound [11].

Compound 17 ($t_R = 41.85$ min) shown a pseudomolecular ion at m/z 607.5 $[M-H]^-$ and ion fragment in MS-MS experiment at m/z 460.9 $[M-H-coumaroyl]^-$ corresponding to a loss of a coumaroyl (-146 Da) moiety. In negative ionization mode the molecular formula of ions at m/z 608.17317 was predicted as $C_{28}H_{32}O_{15}$. This compound was tentatively identified as lipedoside A [34]. To the best of our knowledge this is the first report of this compound in *B. globosa*.

Compound 18 ($t_R = 43.45$ min) exhibited a pseudo-molecular ions $[M-H]^-$ at m/z 623.4. The ion fragments at m/z 460.9 $[M-H-caffeoyl]^-$ corresponded to the loss of the caffeoyl moiety. According to this MS-MS profile, compounds

18 is other verbascoside isomer (Table 3 and 4). In negative ionization mode the molecular formula of ions at m/z 624.20729 was predicted as $C_{29}H_{36}O_{15}$. This compound was identified tentatively as forsythoside A since showed UV bands and MSⁿ profile in line with data provided in literature [23, 30, 31].

Compound 19 (t_R =46.70 min) exhibit a pseudo-molecular ions $[M-H]^-$ at m/z 637.3. This molecular ion shows a deprotonated molecular ion 14 Da higher than verbascoside, corresponding to the presence of a methyl group in the molecule. In MS-MS experiment, an ion fragment due to loss of rhamnose moiety $[M-H-rhamnose]^-$ is observed at m/z 491. Another ion fragment at m/z 461 is due to loss of feruloyl group $[M-H-ferulic\ acid]^-$. In negative ionization mode the molecular formula of ions at m/z 638.22184 was predicted as $C_{30}H_{38}O_{15}$. Therefore, compound 19 was tentatively identified as the verbascoside derivative eukovoside [18, 31].

Compound 20 (t_R =51.04 min) exhibit a pseudo-molecular ion at m/z 651. The ion fragments at m/z 505 $[M-H-rhamnosyl]^-$ represent the neutral loss of rhamnose, while ion fragments at m/z 475 and 457 represented the neutral loss of feruloyl unit and water, respectively. In negative ionization mode the molecular formula of ions at m/z 652.23711 was predicted as $C_{31}H_{40}O_{15}$. These data suggest that compound 20 is martynoside [31]. This is the first report for this compound in *B. globosa*.

Compound 21 (t_R =53.73 min) exhibit a pseudo-molecular ion at m/z 763 and MS-MS fragments at m/z 667.8 and 548.6 corresponding to simultaneous loss

of 96 and 120 Da due to partial cross-ring cleavage observed in C-glycosides. Additionally, the ion fragment at m/z 488.9 is originated by the loss of 60 Da is observed in the cross-ring cleavage of C-pentosides [38, 39]. The loss of 187 Da that generate an ion fragment at m/z 301.7 could not be rationalized.



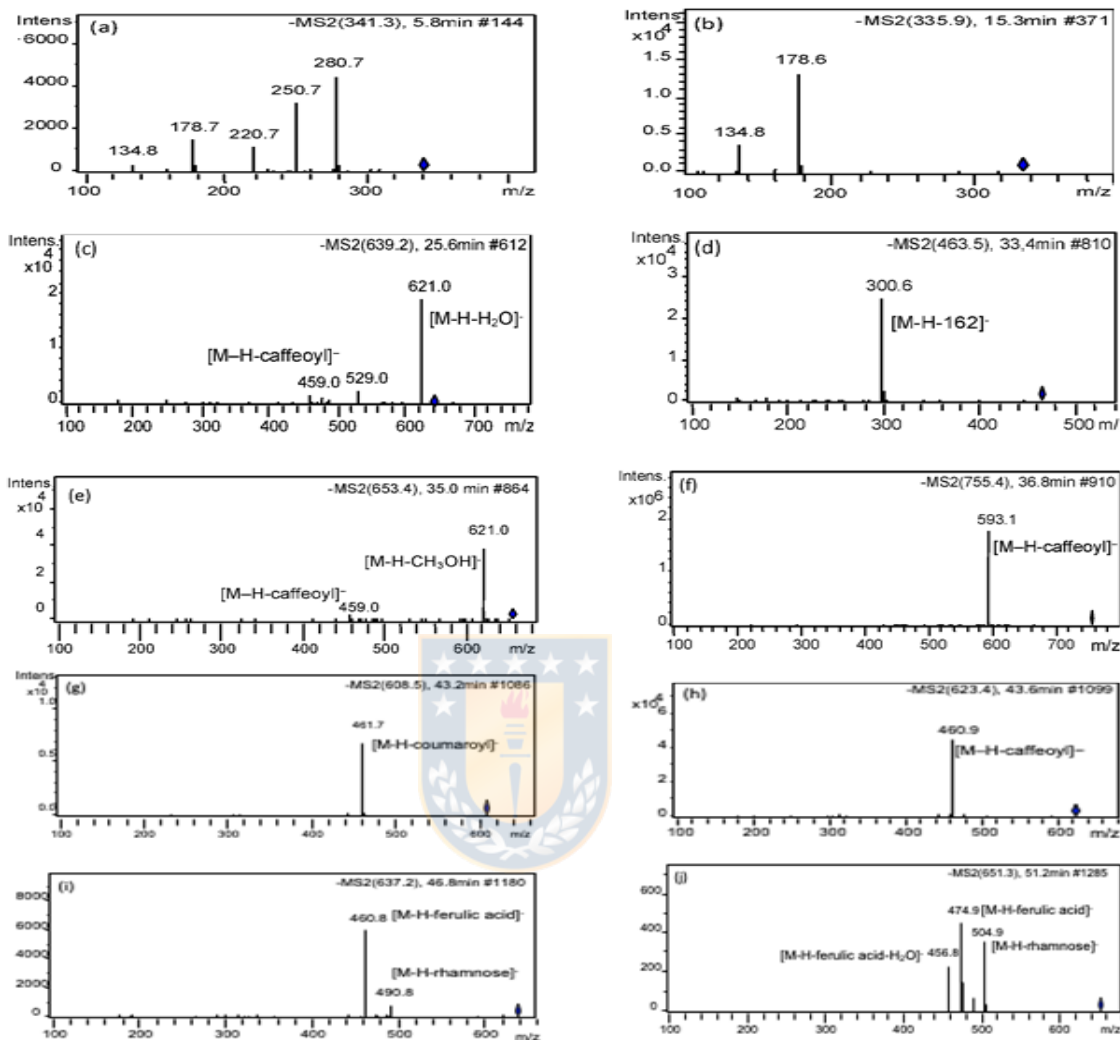


Figure 3. Most representative MS-MS spectra of *B. globosa* compounds not reported previously. The spectra correspond to: (a) caffeoylglucoside, (b) caffeoylshikimic acid, (c) B⁻-hydroxy-verbascoside or B⁻-hydroxy-isoverbascoside, (d) quercetin-3-O-glucoside, (e) campneoside I, (f) forsythoside B, (g) lipedoside A, (h) forsythoside A, (i) eukovoside and (j) martynoside.

3.2. Comparison of the extractability of phenolic compounds with NADES.

Comparing with traditional organic solvents, the main drawback of NADES is their high viscosity, which causes slow mass transfer and results in a decrease in their extraction ability. In order to solve this problem, it was necessary adding water (20%) to improve polyphenol diffusion [40]. Also, a previous study showed that increasing NADESs temperature leads to a decrease in their viscosity [12]. For such reason, in the present work a temperature of 60°C was selected. Another way to increase mass transfer and to speed up the diffusion rate of compounds in NADES is to apply external forces such as stirring. Stirring is the simplest way to speed up the diffusion rate of the compounds in the liquid. To compare the extraction efficiencies of the NADESs with those obtained from traditional organic solvents, extractions with a mixture of MeOH: water (80:20, v/v) were performed in parallel under the same operational extraction conditions. After extraction, analysis of the phenolic profile was performed via HPLC-DAD-ESI-IT-MS

(**Figure 4**). However, quantitative analysis of verbascoside and luteolin 7-O-glucoside only was possible for NADESs 4, 5, 6, 7 and 8 as observed in Figure 5, whereas in NADES 1, 2 and 3 this analysis was not possible due to the poor separation of forsythoside B and verbascoside. The result obtained for luteolin 7-O-glucoside (**Figure 5A**) using NADESs 4, 5, 6, 7 and 8 shown

that a significantly highest amount of such compound can be extracted in comparison with 80% MeOH. With this latter solvent, 3.206 mg/g of luteolin 7-O-glucoside was determined, whereas choline chloride-1,2 propanediol NADES5 increase the extraction yield up to 36.8% (4,387 mg/g of luteolin 7-O-glucoside). This result agreed with those reported by García et al., who found that 1,2-propanediol-based NADESs are excellent extraction solvents for flavonoids [42]. Meng et al. reported that using choline chloride and 1,2-propanediol at 1:4 molar ratio allows improved extraction of quercetin, naringenin, kaempferol and isorhamnetin from Pollen Typhae [43]. On the other hand, the results obtained for verbascoside (**Figure 5B**) in NADESs 4, 6, 7 and 8 shown that a significantly highest amount of such polyphenol was extracted in comparison with 80% MeOH (26.165 mg/g) used as conventional solvent. Importantly, NADES based on proline and citric acid (NADES8) enable a twofold increase of extracted compounds (51.045 mg/g), while no significant differences ($p < 0.05$) were found regarding to lactic acid/glycerol/water (NADES4) and choline chloride/glycerol (NADES6) obtaining 47.771 and 48.474 mg/g, respectively. Ivanović et al. report a concentration of 14.23 mg/g of verbascoside in *Lippia citriodora* using choline/lactic acid NADES [41]. These results agree with those published in previous studies of organic acid based NADESs, which confirm that these types of solvents can effectively facilitate the extraction of phenolic bioactive compounds [21].

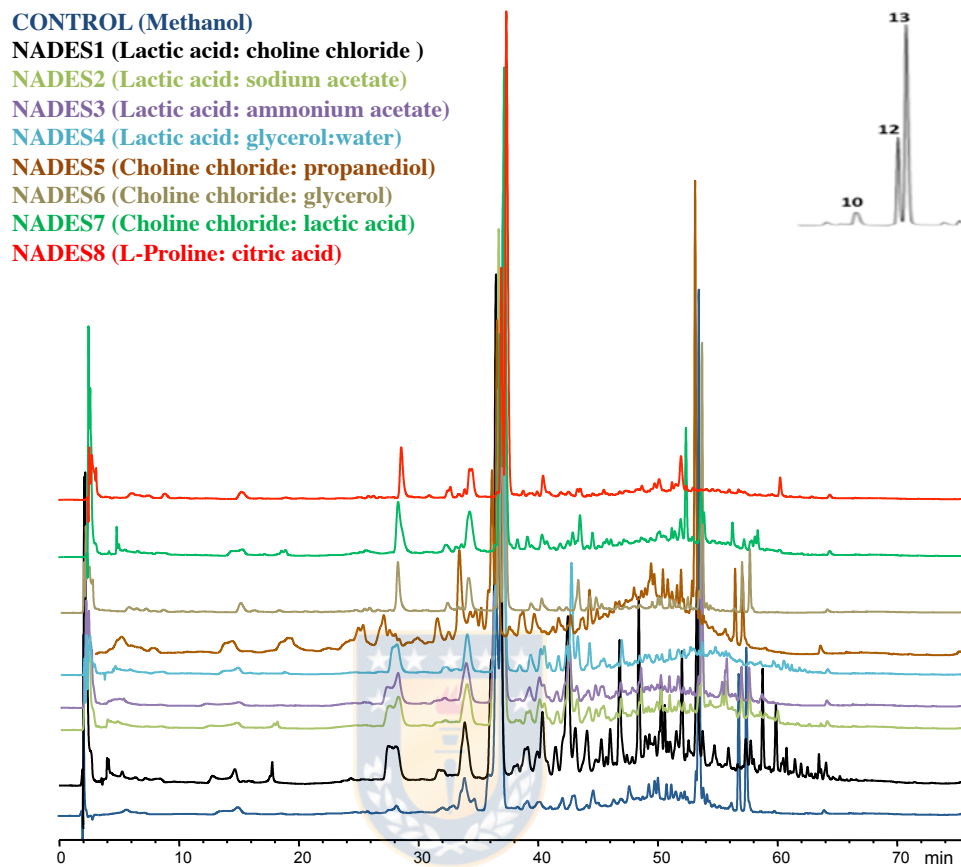


Figure 4. HPLC-DAD chromatogram (320 nm) of phenolic compounds from *Buddleja globosa* leaves extracted with different solvents. Peaks 10, 12 and 13 correspond to luteolin 7-O-glucoside, forsythoside B and verbascoside, respectively.

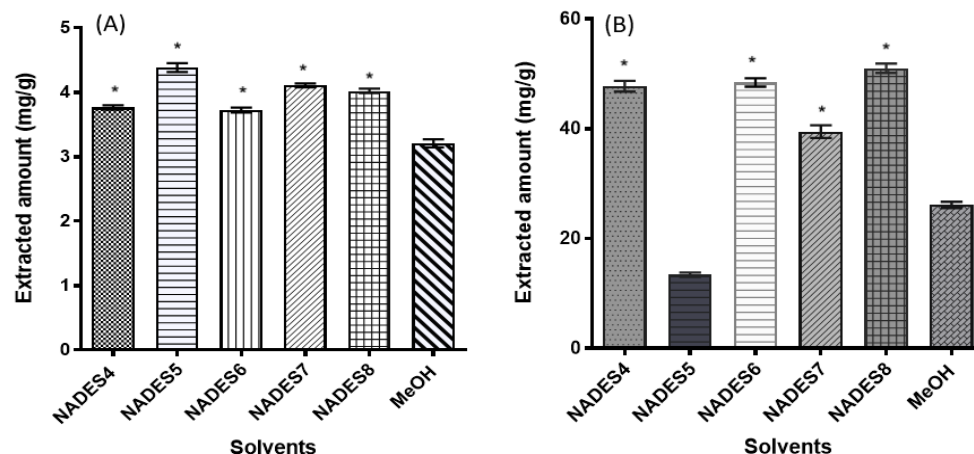


Figure 5. Extraction yields of NADESs in comparison with the control (methanol) for luteolin 7-O-glucoside (A) and verbascoside (B). Data correspond to the means \pm SD (n= 3). There is a significant difference when comparing with methanol, $p < 0.05$.

3.3. Isolation of polyphenols from *B. globosa* by Centrifugal Partition Chromatography

The nine solvent systems listed in **Table 2** were selected from literature and tested with the aim to separate target compounds from *B. globosa*. The most suitable K_D values to perform the CPC isolation process were obtained with the solvent systems based on ethyl acetate: n-butanol: ethanol: water.

Calculated K_{DS} values for compounds 12 (forsythoside B) and 13 (verbascoside) with the solvent system 1 were 0.51 and 3.02, respectively.

According with these results, in ascending mode compound 13 will elute first, whereas compound 12 should elute at higher retention time. In order to optimize the CPC separation process, we investigate the effect of rotation speed and flow rate main upon the retention of stationary phase inside CPC rotor. So, the Pareto diagram (**Figure 6A**) shows the influence of each of the variables studied (flow rate and rotation speed) on the percentage of stationary phase retention (response). Pareto ranking analysis showed that the most significant variables that negatively influence the stationary phase retention response were the flow rate and the quadratic factor of rotation speed. Therefore, from this diagram it can conclude that the most important variable that significantly affects ($p < 0.05$) stationary phase retention is the flow rate. This parameter affects negatively, since greater flow rate values results in poor stationary phase retention. **Figure 6B** illustrate the variation in the stationary phase retention and backpressure responses as function of flow rate and rotation speed. In this graph the term flow rate is linear, therefore the optimum conditions for this variable is located in some point between the range 5-10 mL/min and 2000 - 2400 rpm for the rotation speed. Hence, we select 7.5 mL/min and 2200 rpm as work conditions since the retention was 82%. Under these conditions, pressure remained in 320-360 psi and the time elapsed to obtain the target compounds did not exceed 60 min. As is shown in

Figure 7A, two well-defined peaks are observed at 12 and 32 minutes, respectively. The HPLC analysis of the core cuts from the center of the peaks allow to confirm the presence of verbascoside and forsythoside B in high purity (**Figure 7B**).

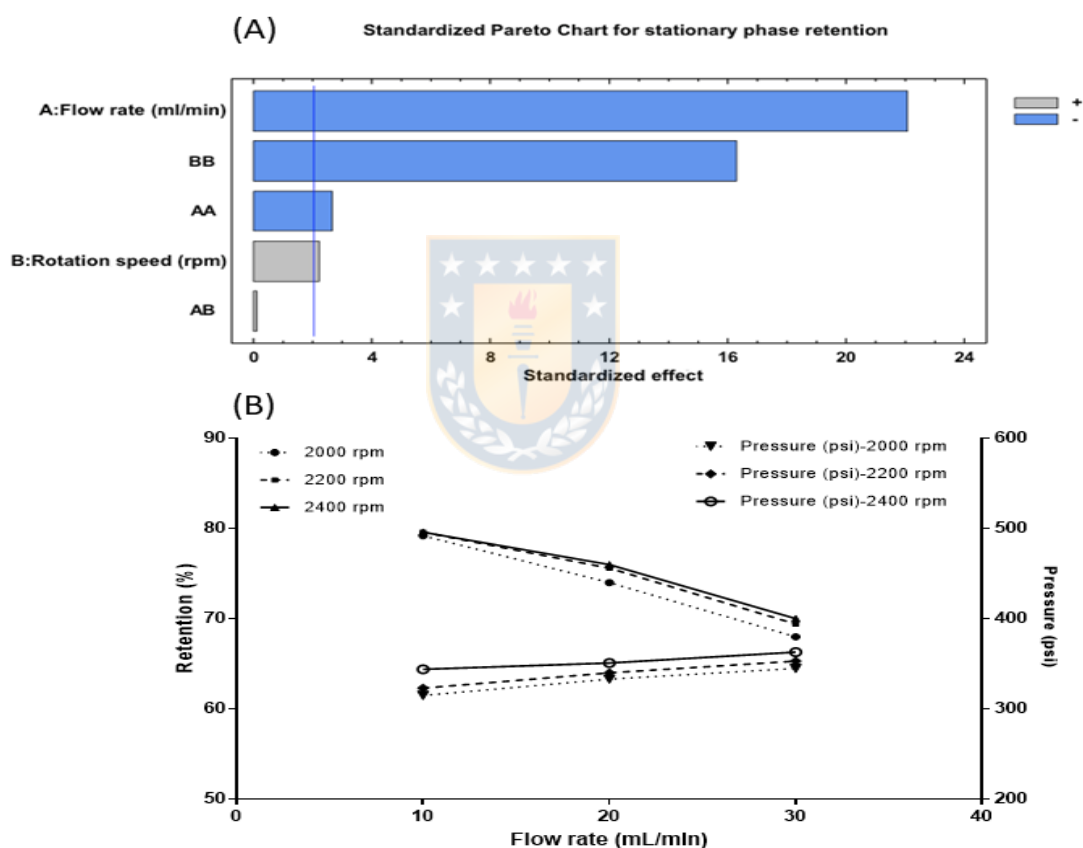


Figure 6. (A) Pareto chart showing the standardized effect of independent variables on the stationary phase retention response. (B) Effect of flow rate and rotation speed on stationary phase retention and backpressure.

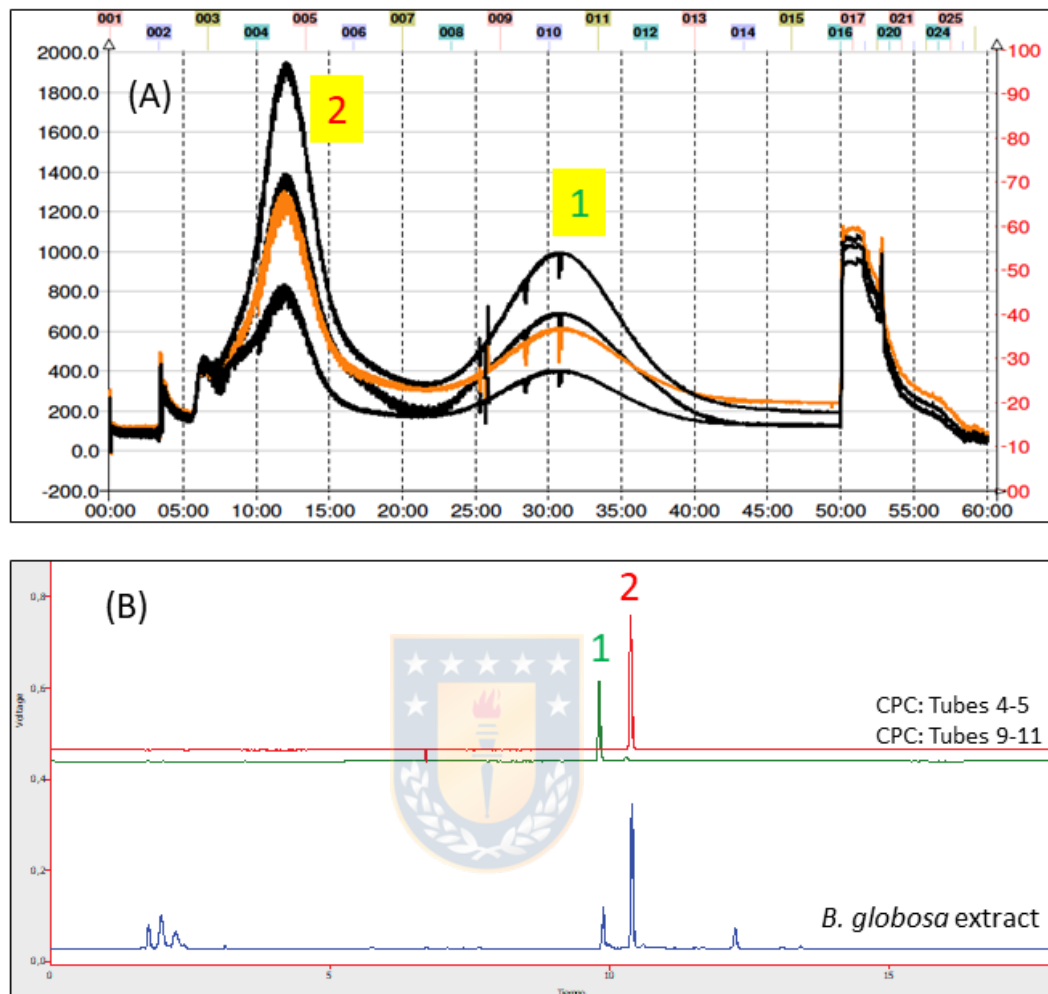


Figure 7. (A) CPC trace of *B. globosa* extract (B) HPLC of forsythoside B (1) and verbascoside (2) isolated from *B. globosa* by CPC in ascending mode.

Conclusions.

In this work, advanced analytical methods have been used to carry out a thorough characterization of a *B. globosa* extracts. The HPLC system consisted in a column filled with a small particle size coupled to UV-vis and mass spectrometric detectors with different mass analyzers. Ion trap (IT) allow selective ion isolation and accumulation, while time-of flight (TOF) provide accurate mass measurements and high-resolution mass analysis. Altogether, these features indicate that the strategy of coupling LC with IT-MS and TOF-MS is a powerful tool for the qualitative analysis of complex samples. In this report, a total of 17 compounds were identified. These compounds included 13 phenylpropanoids and 4 flavonoid glycosides. It is also important to highlight that, to the best of our knowledge, caffeoylglucoside isomers, caffeoylshikimic acid, β -hydroxyverbascoside, β -hydroxy-isoverbascoside, quercetin-3-O-glucoside, campneoside I, forsythoside B, lipedoside A, forsythoside A, eukovoside and martynoside were identified for the first time in *B. globosa* using liquid chromatography coupled with IT and TOF. Additionally, we achieve the fast one-step purification of the main bioactive compounds from *B. globosa* using CPC. Finally, from our results it can be concluded that NADESs are a potential green alternative to conventionally used organic solvents as extraction media for phenolic compounds. Among the NADESs tested in our study, proline- citric acid (1:1) was the most promising solvent, attaining higher

extraction yields of verbascoside from *B. globosa* leaves. However, other NADESs prepared with choline chloride-glycerol-water (3:1:3) and choline chloride- glycerol (1:2) give good results and could be used as alternative. In the case of luteolin 7-O-glucoside, NADESs prepared with choline chloride-propanediol (1:2) enable greater extraction yield than samples extracted with 80% methanol. Therefore, due to its superior extraction efficiency for phenolic compounds and reduced environmental and lower economic impacts, NADESs have a great potential as green alternatives to organic solvents for the extraction of plant bioactive metabolites with medical applications.



Acknowledgments

This study was financed by of Beca Conicyt Doctorado Nacional N° 21150990 (J. Torres). E. Pastene., give special thanks to financial support from grants FONDECYT 1150948, FONDEQUIP EQM 150025, and CCTE project AFB170007 from Programa de Investigación Asociativa (PIA), CONICYT. J. Torres also thanks to the collaboration of the University Castilla-La-Mancha, Ciudad Real, Spain for this help in the instrumentation and structural elucidation of the compounds. These funders played no roles in the study design, data collection and analysis, and decision to publish.

References

[1] L.E. Navas, Flora de la cuenca de Santiago de Chile, Tomo III, Ediciones de la Universidad de Chile. Santiago, Chile, (1979).

[2] P.J. Houghton, Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. *J Ethnopharmacol*, 11 (3) (1984) 293-308.

[3] M. Montes, T. Wilkomirsky, Medicina Tradicional Chilena. Universidad de Concepción, Concepción, Chile (1987).

[4] A. Mensah, P. Houghton, S. Bloomfield, A. Vlietnck, D. Berghe, New and novel terpenes from *Buddleja globosa* displaying selective antifungal activity against dermatophytes, *J. Nat. Prod.* 63(9) (2000) 1210-1213.

[5] D. Estomba, A. Ladio, M. Lozada, Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from North-western Patagonia, *J Ethnopharmacol.* 103 (2006) 109-119.

[6] N. Backhouse, C. Delporte, C. Apablaza, M. Farías, L. Goity, S. Arraua, R. Negrete, C. Castro, H. Miranda, Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. *J Ethnopharmacol.* 119 (2008b) 160-165.

[7] M. Letelier, A. Molina, J. Cortes, J. Jara, M. Holst, K. Palma, DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules. *Toxicol In Vitro.* 22 (2008) 279-286.

[8] N. Backhouse, L. Rosales, C. Apablaza, L. Goity, S. Erazo, R. Negrete, Analgesic, antiinflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, *Buddlejaceae*, *J. Ethnopharmacol.* 116 (2008a) 263-269.

[9] P. Houghton, P. Hylands, A. Mensah, A. Hensel, A. Deters, In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example, *J Ethnopharmacol.* 100 (2005) 100-107.

[10] F. Pardo, F. Perich, L. Villarroel, R. Torres, Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves, *J Ethnopharmacol.* 39 (1993) 221-222.

[11] L. Goñty, Estudio químico y farmacológico de un extracto activo de *Buddleja globosa* Hope, *Buddlejaceae*, matico y diseño de la metodología analítica. Memoria de Químico Farmacéutico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. (2007) 7-20.

[12] J. Dai, V. Spronsen, G. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Anal. Chim. Acta.* 766 (2013) 61-68.

[13] Y.H. Choi, J. Van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I. Arends, G.J. Witkamp, R. Verpoorte. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*, 156 (2011) 1701 - 1705.

[14] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R.L. Reis, A. Duarte, Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century, *Sustain. Chem. Eng.* 2 (2014) 1063–1071.

[15] M. Faggian, S. Sut, B. Perissutti, V. Baldan, I. Grabnar, S. Dall'Acqua, Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as a Tool for Bioavailability Improvement: Pharmacokinetics of Rutin Dissolved in Proline/Glycine after Oral Administration in Rats: Possible Application in Nutraceuticals, *Molecules.* 21 (2016) 1-11.

[16] Y. Dai, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications, *Food Chem.* 187 (2015) 14–19.

[17] B. Gastaldi, Y. Assef, C. Van Baren, P. Lira, D. Retta, A. Bandoni, S. González, Actividad antioxidante en infusiones, tinturas y aceites esenciales de especies nativas de la Patagonia Argentina, *Rev cubana Plant Med.* 21 (1) (2016) 51-62.

[18] X.F. Chen, H.T. Wu, G.G. Tan, Liquid chromatography coupled with time-of-flight and ion trap mass spectrometry for qualitative analysis of herbal medicines, *J Pharm Anal.* 1 (4) (2011) 235-245.

[19] Y. Ito, Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr A.* 1065 (2) (2005) 145-168.

[20] S.V. Luca, A. Miron, S. Ignatova, K. Skalicka-Woźniak, An overview of the two-phase solvent systems used in the countercurrent separation of phenylethanoid glycosides and iridoids and their biological relevance. *Phytochem Rev.* 18(2) (2019) 377-403.

[20] S.V. Luca, A. Miron, S. Ignatova, K. Skalicka-Woźniak, An overview of the two-phase solvent systems used in the countercurrent separation of phenylethanoid glycosides and iridoids and their biological relevance. *Phytochem Rev.* 18(2) (2019) 377-403.

[21] S. Bajkacz, J. Adamek, Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products, *Talanta* 168 (2017) 329–335.

[22] G. Favre, G. González-Nevesa, D. Piccardo, S. Gómez-Alonso, J. Pérez-Navarro, I. Hermosín-Gutiérrez, New acylated flavonols identified in *Vitis vinifera* grapes and wines, *Food Research International*, 112 (2018) 98–107.

[23] L. Li, R. Tsao, Z. Liu, S. Liu, R. Yang, J. C. Young, H. Zhu, Z. Deng, M. Xie, Z. Fu. Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium* L. by high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr A*, 1063 (1–2) (2005) 161-16

[24] L. Li, C. Liu, Z. Chen, J. Wang, D. Shi, Z. Liu, Isolation and Purification of Plantamajoside and Acteoside from Plant Extract of *Plantago asiatica* L. by High Performance Centrifugal Partition Chromatography. *Chemical Research in Chinese Universities* 25(6) (2009) 817— 821.

[25] Y. Lan, X. Chi, G. Zhou, X. Zhao, Antioxidants from *Pedicularis longiflora* var. *tubiformis* (Klotzsch) P. C. Tsoong. *Records of Natural Products* 12(4) (2018) 332-339.

[26] F. He, L. Chen, Q. Liu, X. Wang, J. Li, J. Yu, Preparative Separation of Phenylethanoid and Secoiridoid Glycosides from *Ligustri Lucidi Fructus* by High-Speed Counter-Current Chromatography Coupled with Ultrahigh Pressure Extraction. *Molecules* 23(12) (2018) 3353.

[27] Ch. Chen, X-H, Zhao, H-L. Yue, Y-L. Li, T. Chen, Separation of Phenylpropanoid Glycosides from a Chinese Herb by HSCCC, *Journal of Chromatographic Science*, 52(5) (2014) 395–399.

[28] S. Roehrer, M. Minceva. Evaluation of Inter-Apparatus Separation Method Transferability in Countercurrent Chromatography and Centrifugal Partition Chromatography. *Separations* (2019) 6, 36.

[29] M. Friščić, F. Bucarb, K.H. Pilepića, LC-PDA-ESI-MSⁿ analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp, *J Mass Spectrom.* 51 (2016) 1211–1236.

[30] N. Brahmi-Chendouh, S. Piccolella, G. Crescente, G. Pacifico, L. Boulekbache, H.S. Hamri, S. Akkal, K. Madani, S. Pacifico, A nutraceutical extract from *Inula viscosa* leaves: UHPLC-HRMS/MS based polyphenol profile, and antioxidant and cytotoxic activities, *J Food Drug Anal.* 27(3) (2019) 692-702.

[31] R. Quirantes-Piné, L. Funes, V. Micol, A. Segura-Carretero, A.J. Fernández-Gutiérrez, Highperformance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem

mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract, *J Chromatogr A*. 1216 (28) (2009) 5391-5397.

[32] P.J. Houghton, A.Y. Mensah, Biologically active compounds from *Buddleja* species; In Romeo JT, ed, Human health protection, nutrition, and plant defense: Recent Advances in Phytochemistry: Phytochemicals. New York: Kluwer Academic/Plenum 33 (1999) 343-368.

[33] E. Pastene, H. Speisky, M. Troncoso, J. Alarcón, G. Figueroa, In Vitro Inhibitory Effect of Apple Peel Extract on the Growth of *Helicobacter pylori* and Respiratory Burst Induced on Human Neutrophils, *J. Agric. Food Chem* 57 (2009) 7743-7749.

[34] H. Guo, A.H. Liu, M. Ye, M. Yang, D.A. Guo, Characterization of phenolic compounds in the fruits of *Forsythia suspensa* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 715–729.

[35] M.B. Ado, F. Abas, S.W. Leong, K. Shaari, I.S Ismail, H.M. Ghazali, N.H. Lajis, Chemical constituents and biological activities of *Callicarpa maingayi* leaves, *S. Afr. J. Bot.* 104 (2016) 98–104.

[36] Y. Shi, C. Wu, Y. Chen, W. Liu, F. Feng, N. Xie, Comparative analysis of three *Callicarpa* herbs using high performance liquid chromatography with diode array detector and electrospray ionization-trap mass spectrometry method, *J Pharm Biomed Anal.* 75 (2013) 239–247.

[37] G. Valenzuela. Diseño de una metodología analítica en HPLC para estandarizar un extracto de *Buddleja globosa* hope, *Buddlejaceae* y evaluación de la cesión del extracto desde un gel dermatológico, Memoria de Químico Farmacéutico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. (2009) 15-64.

[38] I. Mitresky, J. Petreska, M. Stefova, G. Stefkov, S. Kulevanova, Polyphenols in Representative *Teucrium* Species in the Flora of R. Macedonia: LC/DAD/ESI-MSn Profile and Content. *Nat Prod Commun.* 9 (2) (2014) 175-180.

[39] E. J. Llorent-Martínez, V. Spínola, S. Gouveia, P. C. Castilho. HPLC-ESI-MSn characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. *Ind. Crops Prod.* 69 (2015) 80-90.

[40] B. Karakashov, S. Grigorakis, S. Loupassaki, D. Makris, Optimisation of polyphenol extraction from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology. *J Appl Res Med Aromat Plants* 2 (2015) 1–8.

[41] M. Ivanović, M.E. Alañón, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, Enhanced and green extraction of bioactive compounds from *Lippia citriodora* by tailor-made natural deep eutectic solvents. *Food Res. Int.* 111 (2018) 67-76.

[42] A. García, E. Rodríguez-Juan, G. Rodríguez-Gutiérrez, J. Ríos, J. Fernández-Bolaños, Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chem.* 197 (2016), 554–561.

[43] Z. Meng, J. Zhao, H. Duan, H. Guan, L. Zhao. Green and efficient extraction of four bioactive flavonoids from *Pollen Typhae* by ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction. *J. Pharm Biomed Anal.* 161 (2018) 246–253.

Capítulo 2: Sección 2

Titulo:

Evaluación de la actividad biológica de los extractos *knock-out* diseñados mediante la sustracción química de sus compuestos bioactivos a partir de las hojas *Buddleja globosa* (matico)

Resumen:

La sustracción es una estrategia que permite sustraer un compuesto o un grupo de compuestos con la finalidad de evaluar y confirmar la actividad biológica de las plantas. *Buddleja globosa* Hope, más conocida como “matico”, se conoce por sus propiedades cicatrizantes, antimicrobianas y antioxidantes. Utilizando la técnica cromatografía de partición centrifuga (CPC) se pudo aislar (sustraer) 3 fracciones denominadas: *knock-out 1* (extracto que contiene el verbascósido), *knock-out 2* (extracto que contiene el forsitosido B como compuesto mayoritario) y *knock-down* (extracto reducido en fenilpropanoides). Estos extractos y el extracto total de matico se evaluaron en cuanto a su efecto sobre el proceso de migración, citotoxicidad y capacidad antioxidante. Interesantemente, los ensayos celulares (proliferación y cierre de herida) no permitieron evidenciar efectos claros para ninguno de los extractos. En cuanto a la capacidad antioxidante como se esperaba el

extracto knock-down tuvo una baja capacidad antioxidante. Los resultados sugieren que no sólo el verbascósido contribuye en esta actividad, sino que también el compuesto forsitosido B (*knock-out 2*).

1. Materiales y métodos:

1.1. Solventes y reactivos.

Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-carboxílico (Trolox), y el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), sal de fluoresceína sódica, metanol fueron proporcionados por Sigma (St. Louis, MO, USA.). Suero fetal bovino (FBS, Corning) sulforodamina B, ácido tricloroacético, líneas celulares de queratinocitos (HaCaT) donadas por el Dr. Patricio Oyarzún de la Universidad San Sebastián de Concepción, Chile, y fibroblastos (HDF) (Cell Applications, Inc.).

1.2. Material vegetal y extracción.

La metodología está descrita en el capítulo 2 en el numeral 2.1 de la sección 1.

1.3. Aislamiento de los compuestos bioactivos, mediante CPC.

La metodología esta descrita en el capitulo 2 en el numeral 2.6 de la sección 1.

1.4. Identificación de los extractos diseñados por HPLC-DAD-IT y HPLC-QTOF

La metodología para la identificación de los compuestos en las fracciones obtenidas del CPC está descrita en el capitulo 2 en el numeral 2.5 de la sección 1.



1.5. Preparación de los extractos diseño para evaluar su actividad biológica.

Se preparó una solución de los 4 extractos de diseño liofilizados total, *knock-out 1* (fracción de verbascósido), *knock-out 2* (fracción de forsythoside B) y *knock-down* (fracción reducida). Para ello se tomaron 10 mg de cada extracto y se solubilizaron en DMSO al 1% preparado con agua ultrapura para obtener una concentración de 1mg/mL de extracto total, *knock out 1* (fracción verbascósido) y *knock-out 2* (fracción forsitosido B), y de 0,2 mg/mL de knock-down (fracción reducida), dada su menor solubilidad en DMSO 1%. Los extractos fueron agitados a 200 rpm por 15 min y sonicados por 15 min. Posteriormente, las soluciones de extractos fueron filtradas en condiciones de

esterilidad con filtro de 0,2 μm para los ensayos celulares y de capacidad antioxidante. Las soluciones fueron almacenadas a -20°C por un tiempo máximo de una semana para su uso.

1.6 Cultivo de las líneas celulares HaCaT y HDF.

Las células HaCaT y HDF fueron cultivadas en placas de 100 mm con medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), una mezcla de antibióticos estreptomina 10 mg y penicilina 10000 unidades (Biological Industries) y Anfotericina B (Corning). El cultivo se mantuvo a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron tripsinizadas con tripsina-EDTA 1X y fueron contadas con el método de azul de tripán para evaluar viabilidad celular.

1.6.1 Curva de densidad celular.

Las células fueron sembradas con medio DMEM suplementado en poblaciones de 1000, 2500, 5.000, 10.000, 20.000, 40.000, 60.000, 80.000 y 100.000 células en placas de 96 pocillos para determinar la curva de densidad celular. Como blanco se utilizó medio de cultivo celular DMEM suplementado. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO_2 por 24 horas y posteriormente fueron cuantificadas con el método de sulforodamina B.

1.6.2. Curva de citotoxicidad celular con DMSO y extractos de diseño

Las células HaCaT y HDF fueron sembradas en placas de 96 pocillos en concentración de 20.000 células por pocillo con medio DMEM suplementado. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente el medio de cultivo fue removido, las células fueron lavadas con PBS 10 mM y el medio reemplazado con distintas concentraciones de DMSO para determinar las concentraciones que no son tóxicas para la célula para la preparación de los extractos. A partir de un stock de DMSO filtrado con filtro de 0,2 µm se prepararon diluciones seriadas de 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,625, 0,031 y 0,016 % v/v de DMSO en agua ultrapura. Las células fueron incubadas con las distintas concentraciones de DMSO por 24 horas a 37 °C y 5% CO₂. Finalmente, se determinó la viabilidad celular mediante la técnica de sulforodamina B (Vichai y Kirtikara 2006). Se procedió de igual manera para el ensayo de citotoxicidad con los extractos de diseño. En este caso el medio fue reemplazado con distintas concentraciones de los extractos. Se prepararon diferentes concentraciones de los extractos de diseño en medio DMEM suplementado, para el extracto total, *knock-out 1*, *knock-out 2*, para ello se llevaron a cabo diluciones seriadas para obtener concentraciones de 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 y 0,8 µg/mL. Para el extracto knock-down se prepararon diluciones seriadas para obtener concentraciones de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,80; 0,40;

0,20; 0,10 $\mu\text{g/mL}$. Las células fueron incubadas con las distintas concentraciones de los extractos de diseño por 24 horas a 37 °C y 5% de CO_2 . Finalmente, se determinó la viabilidad celular mediante la técnica de sulforodamina B.

1.6.3. Cuantificación celular con ensayo de Sulforodamina B.

Esta técnica permite medir la viabilidad celular, la cual consiste en la habilidad de unir componentes proteicos de las células que han sido fijadas a la placa de cultivo con ácido tricloroacético (TCA). Se llevó a cabo el protocolo desarrollado por Vichai y Kirtikara 2006. En general, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos bajo las distintas condiciones descritas fueron fijadas con 100 μL de ácido tricloroacético al 10% p/v, el medio de cultivo fue removido y se adicionó sobre las células ácido tricloroacético. La placa con las células fue incubada durante 1 hora a 4°C. Luego de la incubación, la placa fue lavada cuatro veces con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 100 μL de solución de sulforodamina B al 0,057% p/v preparada en ácido acético al 1% v/v, y se dejó incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, la placa fue lavada cuatro veces con ácido acético al 1% v/v y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 200 μL de Tris base 10mM pH 10,5 y se dejó la placa en agitación durante 5 minutos, luego la

absorbancia fue cuantificada en el lector de microplaca Synergy 2 (BioTek Instruments) a una longitud de onda de 510 nm.

1.7. Ensayo de la herida en células HaCaT y HDF.

El ensayo de la herida *in vitro* se desarrolló tomando en cuenta los protocolos descritos en (Liang et al., 2007; de Moura Sperotto et al., 2018; y Yue et al., 2010). Se adaptó el ensayo para una placa de 96 pocillos. Para ello las heridas se realizaron con el 8-channel mechanical cell wounder. Se sembraron 20.000 células por pocillo y se dejaron en incubación con medio de cultivo DMEM suplementado por 48 horas a 37 °C y 5% CO₂ para alcanzar confluencia. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido y las células lavadas con PBS 10 mM. Se crearon líneas de herida rayando el centro de cada pocillo con las células cultivadas con un “8-channel mechanical cell wounder” y puntas de micropipeta de 20 µL. Este dispositivo permite obtener rayados de 600 µm aproximadamente. Sobre los pocillos en los que se practico la herida se agrego suero en un 0.5 % y luego se adicionaron los extractos de diseño en concentraciones de 100 µg/mL de extracto total, *knock-out* 1, *knock-out* 2 y de 6,25 µg/mL de *knock-out* (concentraciones determinadas a partir de la curva de citotoxicidad). Además, se consideró como control positivo las células con medio de cultivo DMEM suplementado al 10% con FBS y como control negativo DMEM suplementado al 5% con FBS. Este ensayo se desarrolló con medio de cultivo DMEM disminuido en FBS

(0,5% de FBS). Se registraron imágenes inmediatamente de cada condición (0 horas) y después de 6, 12, 18 y 24 horas. Estas fueron tomadas usando el microscopio invertido MOTIC AE31 con un objetivo 4X y con cámara JENOPTIK, Optical System GmbH. Las áreas de la herida fueron medidas usando el software ImageJ®. Finalmente, las áreas de la herida fueron graficadas versus el tiempo.

1.8. Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH y ORAC

Se realizaron dos ensayos diferentes de capacidad antioxidante (DPPH y ORAC-FL) para los extractos diseñados. Los ensayos se realizaron en un lector de microplacas de 96 pocillos (lector multimodo Synergy / HTX, BioTeK, Winooski, Vermont, EE. UU.). El ensayo DPPH se realizó según la metodología planteada por Brand *et al.* 1994 con algunas modificaciones. Para realizar el ensayo se disolvieron 3,0 mg de DPPH en 100 mL de metanol con ayuda del ultrasonido y se midió la absorbancia agregando metanol hasta obtener un valor de absorbancia $0,800 \pm 0,030$ a $\lambda=517$ nm. Una vez preparado el radical, se procedió a agregar en cada pocillo 60 μ L de muestra y 120 μ L de DPPH; se incubó por 30 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia, el proceso se realizó por triplicado. La muestra se preparó en metanol en un rango de concentraciones de 20 -1000 μ g/mL para determinar el rango óptimo de linealidad y posterior a esto realizar el ensayo en un rango

de concentraciones más pequeño y específico para cada muestra, además se utilizó ácido ascórbico como antioxidantes de referencia y Trolox para la curva de calibración en un rango de concentraciones de 10 - 60 μM . Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol trolox/ g extracto seco}$, además se determinó el IC_{50} . Para el ensayo ORAC-FL se realizaron de acuerdo con (Ou *et al.*, 2013) En cada pocillo se añadieron 150 μL de fluoresceína 0,11 μM a cada pocillo de una placa de 96 pocillos negro. Luego se adicionó 25 μL buffer fosfato (blanco), trolox (curva estándar entre 6.25 - 50 μM) o muestra (serie de dilución de 20-100) a cada pocillo. Se dejó incubar en el lector de microplaca por 30 minutos a 37°C. Luego se agregó rápidamente 25 μL de AAPH a cada pocillo, para comenzar la lectura cinética inmediatamente entre 0 y 120 minutos, midiendo cada 1 minuto, con una longitud de onda de excitación y de emisión de 485 y 530 nm respectivamente a 37 °C. La recta de calibrado se obtuvo hallando la ecuación de una regresión lineal del área bajo la curva (AUC) de disminución de fluorescencia de fluoresceína. Una vez obtenida la recta de calibrado, los valores de ORAC para las muestras, se obtuvieron calculando los equivalentes de trolox a partir del AUC de las muestras, extrapolando en la ecuación de la recta de calibrado y representándolos frente a la concentración de extracto.

1.9. Análisis estadístico

Los datos se encuentran expresados como la media \pm desviación estándar y analizados en el software GraphPad Prism 6 ®. Se realizó una prueba Bonferroni de múltiples rangos para evaluar las diferencias entre grupos, donde $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

2. Resultados y discusión

2.1. Extracción del material vegetal.

La extracción del material vegetal se llevó a cabo utilizando un sistema Soxhlet. En resumen, se pesaron 21.0010 g del material pulverizado y se usó metanol puro como solvente. El proceso se llevó a cabo hasta que se produjo el agotamiento del material vegetal (16 h). Luego, el metanol se eliminó a presión reducida ($>40^{\circ}\text{C}$) hasta sequedad, luego se liofilizó y se obtuvo 9.4134 g que es equivalente a un rendimiento del 25.16%.

2.2. Aislamiento de los compuestos bio-activos mediante CPC

Con el sistema de disolvente utilizado compuesto de acetato de etilo: n-butanol: etanol: agua (0.25:0.75:0.1:1) añadiéndole 1 ml de TFA para preparar un total de 2 L. Se logró sustraer 2 fracciones (ver figura 1) de un extracto total de matico (figura 2). La primera fracción corresponde a los tubos 3 al 6,

en donde el compuesto mayoritario fue el verbascósido (figura 2a y tabla 2S) este extracto diseñado se denomina *knock-out 1* y la segunda fracción corresponde a los tubos 8 al 12 se denominó *knock-out 2* cuyo compuesto mayoritario fue identificado como forsitosido B (figura 2b), finalmente se obtuvo el extracto diseñado denominado *knock-down* que corresponde a la fracción reducida (figura 2c). Del extracto diseñado *knock-out 1* se obtuvieron 80 mg, del extracto *knock-out 2* se obtuvieron 16.1 mg y del extracto *knock-down* 182.3, de un total inyectado de 278.4 mg del extracto seco de matico. Esto en porcentaje equivale a un 28.74 %, 5.78 % y %65.48. En la tabla 1S, 2S, 3S se pueden ver los compuestos identificados mediante HPLC-QTOF para los diferentes extractos diseñados.

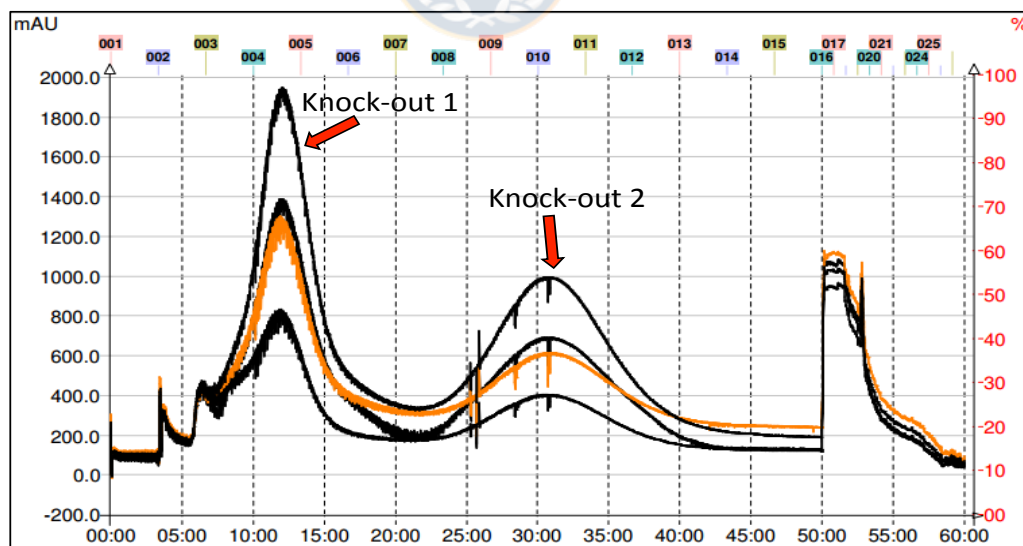


Figura 1. Cromatograma UV obtenido de la cromatografía de partición centrifuga, del extracto total (soxhlet) de *Buddleja globosa*.

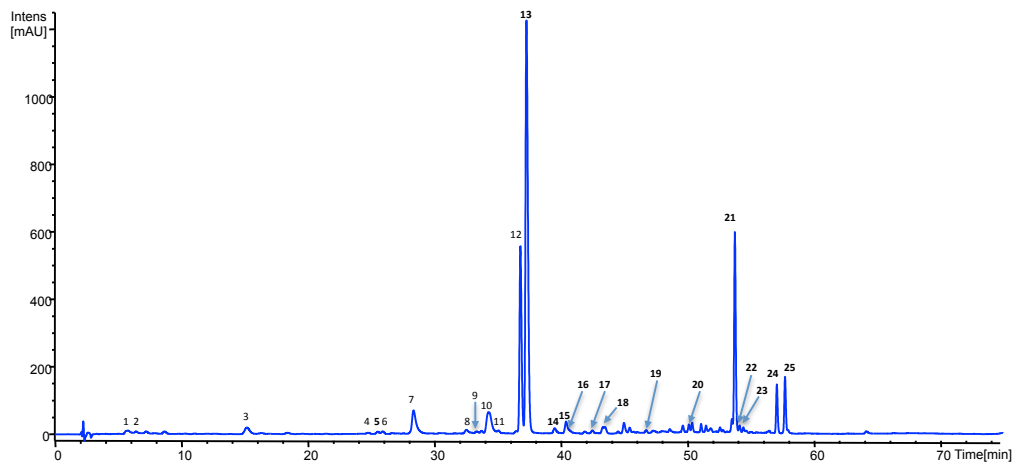


Figura 2. Cromatograma HPLC-DAD (320 nm) de los polifenoles de las hojas de *Buddleja globosa* correspondiente al extracto total (soxhlet)

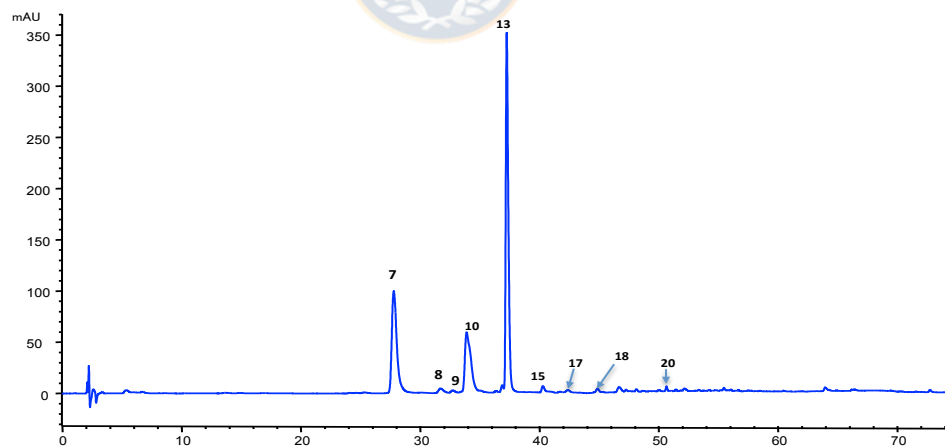


Figura 2a. Cromatograma HPLC-DAD (320 nm) de los polifenoles de las hojas de *Buddleja globosa* correspondiente al extracto *knock-out* 1, cuyo compuesto mayoritario es el verbascósido.

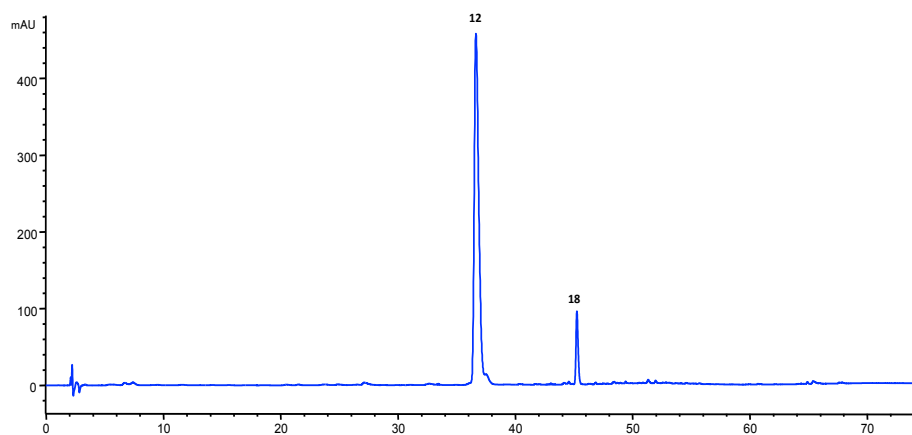


Figura 2b. Cromatograma HPLC-DAD (320 nm) de los polifenoles de las hojas de *Buddleja globosa* correspondiente al extracto *knock-out* 1, cuyo compuesto mayoritario es el Forsitosido B.

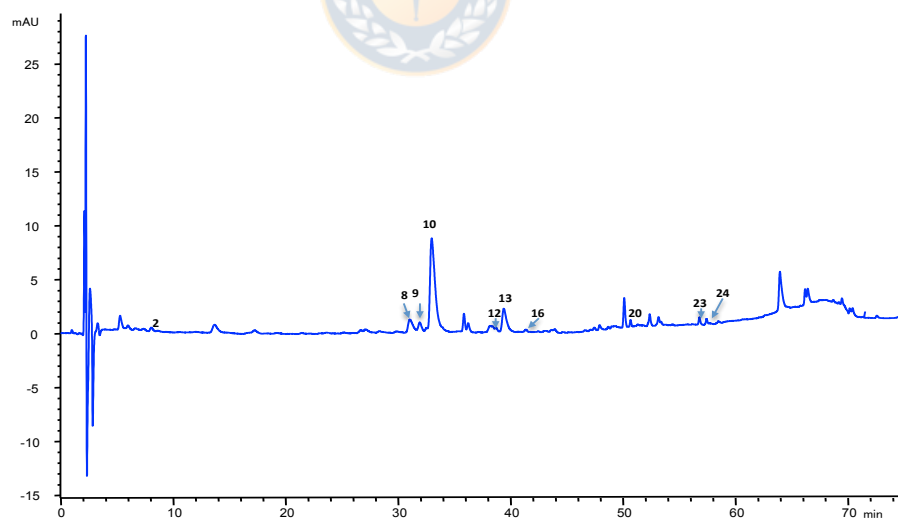
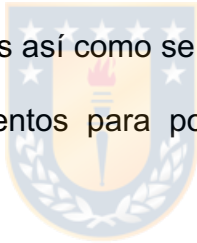


Figura 2c. Cromatograma HPLC-DAD (320 nm) correspondiente a las fracciones agrupadas por CPC (extracto *knock-down*) y que esta reducido en los fenilpropanoides forsitósido B y verbascósido.

2.3 Ensayos biológicos

2.3.1. Curva de densidad celular de células HaCaT y HDF

Se construyó una curva de densidad celular tanto para las células HaCaT y HDF. Al cultivar células HaCaT en concentraciones crecientes con el fin de determinar el perfil de densidad celular durante 24 horas (Figura 3-A), se encontró una relación lineal hasta las 40.000 (Figura 3-B) con una pendiente de $5,31 \times 10^{-5} \pm 5,022 \times 10^{-7}$. El límite de detección para este análisis fue de 7578 número de células, así el rango lineal de esta curva fue de 7578 a 40.000 número de células. Es así como se decidió trabajar con 20.000 células para los próximos experimentos para poder evaluar tanto la citotoxicidad como la proliferación celular.



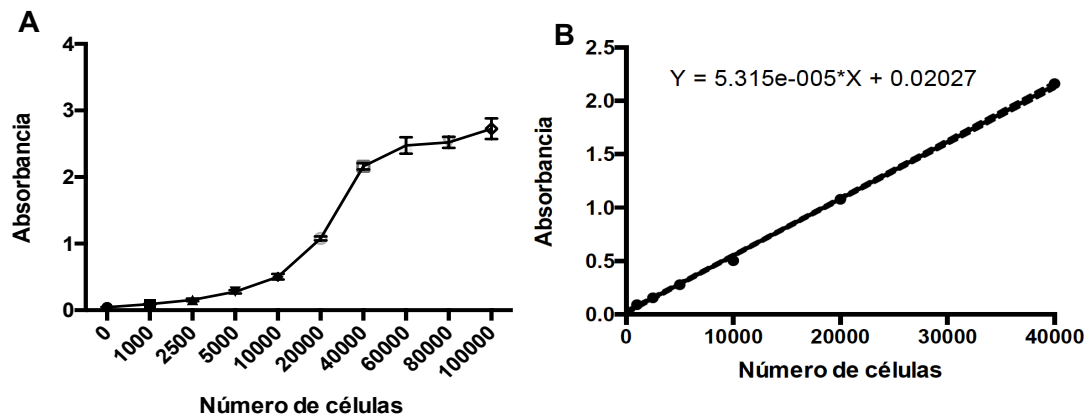


Figura 3. Curva de densidad celular de células HaCaT. Las células HaCaT fueron sembradas durante 24 horas en cantidades crecientes, para determinar la curva de densidad celular. Cada punto corresponde a cada valor de unidades de absorbancia arbitraria (u.a.) a 510 nm. A) Curva de densidad celular. B) Grafica de relación lineal entre número de células y unidades de absorbancia. Experimento realizado por cuadruplicado.

Al cultivar células HDF en concentraciones crecientes con el fin de determinar el perfil de densidad celular durante 24 horas (Figura 4-A), se encontró una relación lineal hasta las 60.000 (Figura 4-B) con una pendiente de $2,438 \times 10^{-5} \pm 2,588 \times 10^{-7}$. El límite de detección para este análisis fue de 16505 número de células, así el rango lineal de esta curva fue de 16505 a 40.000 número de células. Al igual que para las células HaCaT se decidió trabajar con 20.000 células dado que el rango lineal es más acotado para las HDF y se puede estudiar la proliferación de estas células para evaluar uno de los mecanismos

de cierre de la herida, además se relaciona con el número de células que se ha publicado para ensayos de proliferación en placas de 96 con estímulo de *Piper aduncum* otro género de la planta de matico que crece en el Amazonas (Paco et al.,2016).

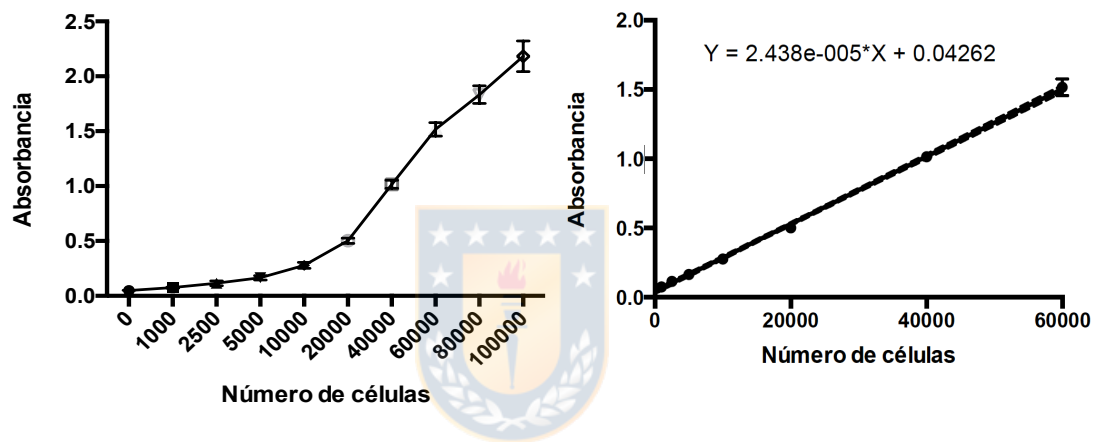


Figura 4. Curva de densidad celular de células HDF. Las células HDF fueron sembradas durante 24 horas en cantidades crecientes, para determinar la curva de densidad celular. Cada punto corresponde a cada valor de unidades de absorbancia arbitraria (u.a.) a 510 nm. A) Curva de densidad celular. B) Grafica de relación lineal entre número de células y unidades de absorbancia. Cada punto representa la media de las réplicas. Experimento realizado por cuadruplicado.

2.3.2. Curva de citotoxicidad celular con DMSO

Se construyó una curva de citotoxicidad celular con DMSO para las células HaCaT y HDF. Al cultivar células ambas células en concentraciones crecientes de DMSO se determinó que hasta una concentración de 1% v/v éste no produce citotoxicidad tanto para las células HaCaT (Figura 5-A) y HDF (Figura 5-B). Sobre el 1% la citotoxicidad sobre ambas líneas celulares es significativamente estadística. Con este ensayo, se puede indicar que para las células HaCaT y HDF es posible trabajar con concentraciones 1% de DMSO e inferiores, donde para el 1% el porcentaje de viabilidad celular es de $94 \pm 2,16$ en células HaCaT y $95 \pm 2,83$ en células HDF. Es por esto que se decidió finalmente trabajar con una concentración de 1% de DMSO, adicionado a todos los controles de medio de cultivo DMEM del resto de los ensayos el mismo porcentaje de DMSO.

Cabe destacar que usualmente el porcentaje utilizado de DMSO para ensayos de citotoxicidad de otros compuestos es de 0.1 a 0.5% (Bonnekoh et al 1991; Moharamzadeh et al., 2007). Sin embargo, los autores no indican el fundamento de la elección de estos valores de porcentaje.

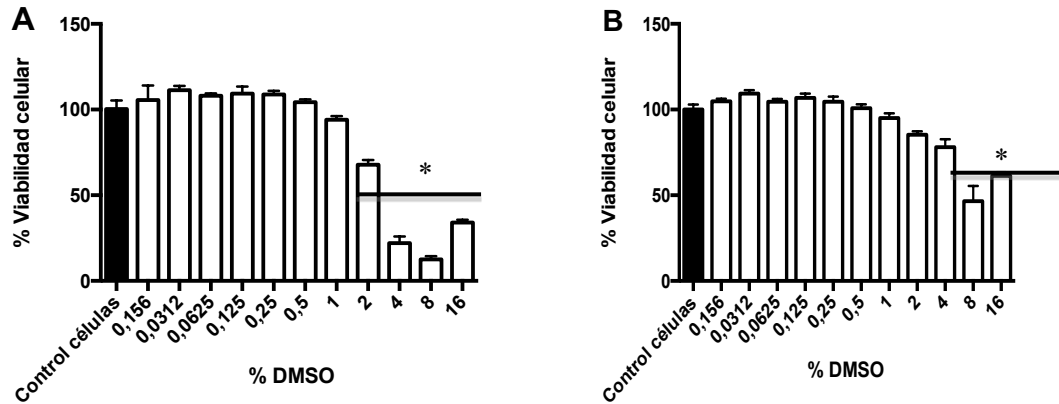


Figura 5. Curva de citotoxicidad de células HaCaT y HDF con concentraciones crecientes de DMSO de 0,156 a 16 % v/v. A: células HaCaT; B: células HDF. Para ambas líneas celulares se observa una citotoxicidad estadísticamente significativa sobre 1% v/v de DMSO sobre el porcentaje de viabilidad celular. Experimento realizado por cuadruplicado, (* $p < 0.05$).

2.3.3. Curva de citotoxicidad celular con extractos de diseño

Se construyó una curva de citotoxicidad celular de extractos de diseño de matico para las células HaCaT y HDF preparados en medio de cultivo con DMSO al 1%. Las células fueron cultivadas en concentraciones crecientes de cada extracto. Para la línea celular HaCaT (Figura 6) el extracto total y la fracción *knock-out* 1 no presentan un efecto citotóxico hasta una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. Por otro lado, la fracción *knock-out* 2 hasta una concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$ y la fracción *knock-down* presentan un efecto

citotóxico a una concentración mayor o igual a 800 $\mu\text{g/mL}$. Para la línea celular HDF (Figura 7) el extracto total no presenta un efecto citotóxico hasta una concentración inferior a 800 $\mu\text{g/mL}$, la fracción *knock-out* 1 y la fracción *knock-out* 2 hasta una concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$, el y la fracción *knock-down* no presentó citotoxicidad a ninguna de las concentraciones de extracto ensayadas. Sobre los valores de concentración indicados para el extracto total y la fracción *knock-out* 1 existe un efecto citotóxico significativamente estadístico.

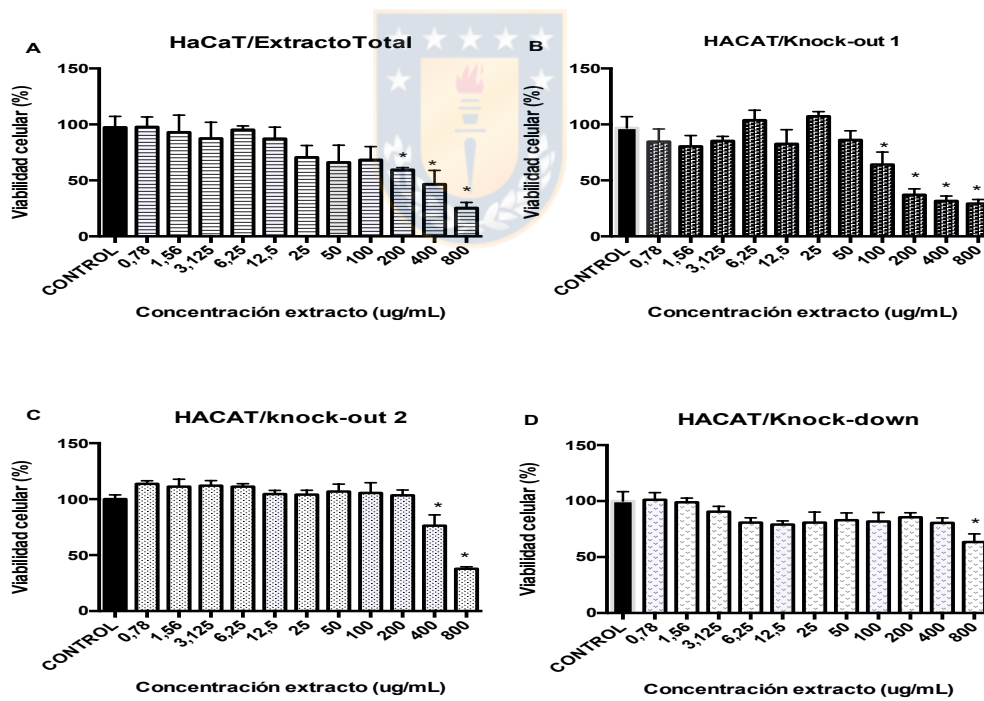


Figura 6. Curva de citotoxicidad sobre células HaCaT para extractos de diseño de matico. A: Extracto total, B: *knock-out* 1. C: *knock-out* 2, D: *knock-down*. Experimento realizado por cuadruplicado. (* $p < 0.05$)

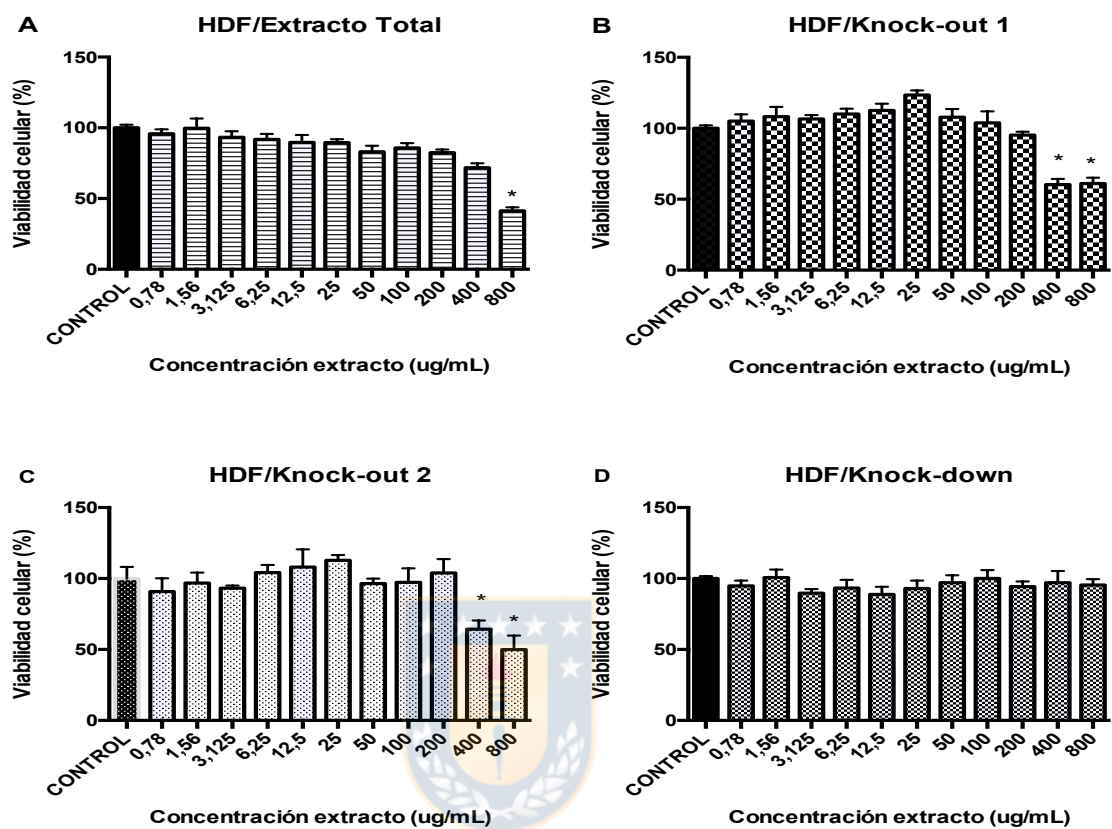


Figura 7. Curva de citotoxicidad sobre células HDF para extractos de diseño de matico. A: Extracto total, B: *knock-out 1*. C: *knock-out 2*, D: *Knock-down*. Experimento realizado por cuadruplicado. (* $p < 0.05$)

A partir de estos resultados se decidió usar una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ del extracto total, *knock-out 1*, *knock-out 2* y *knock-down* para los ensayos posteriores (ensayo de la herida) ya que corresponden a concentraciones no tóxicas para las células.

2.3.4. Ensayo de la herida en células HaCaT y HDF

El ensayo de herida se llevó a cabo con las concentraciones de extractos de diseño escogidas previamente. Además, se consideró como control positivo FBS al 10% y como control negativo FBS al 5%. Para la línea celular HaCaT no se observó un cierre de herida estadísticamente significativo ($p > 0.05$) para ninguno de los extractos en ninguno de los tiempos considerados para el ensayo (Figura 8). Sólo se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) a las 6 horas entre el control positivo que se destaca en color rojo y el control negativo destacado en azul, donde el control positivo cerró la herida $6.0 \pm 3,6$ %. Para la línea celular HDF no se observó un cierre de herida estadísticamente significativo ($p > 0.05$) para ninguno de los extractos en ninguno de los tiempos considerados para el ensayo (Figura 9). Tampoco se observó un cierre de la herida para los controles.

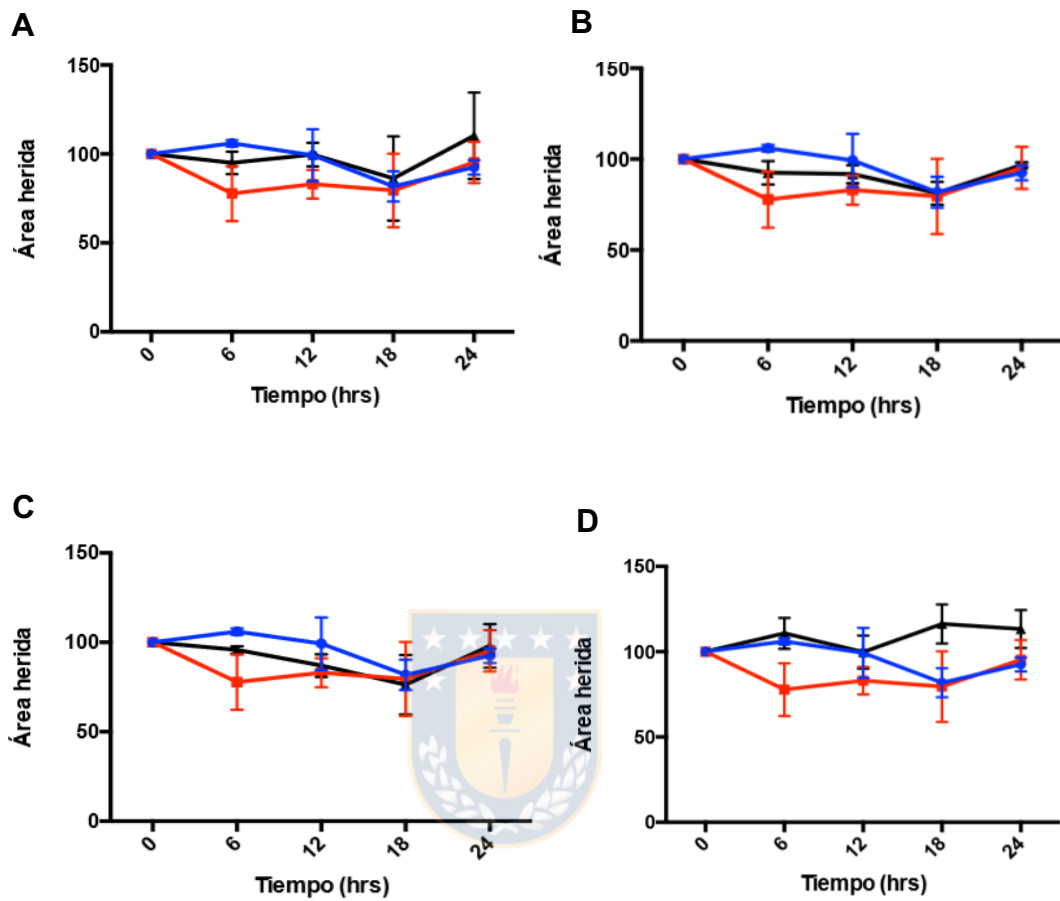


Figura 8. Ensayo de la herida para la línea celular HaCaT: A) Extracto total, B) Extracto *knock-out* 1 C) Extracto *knock-out* 2, D) Extracto *knock-down*. Se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control positivo (rojo) y negativo (azul) a las 6 horas, donde el control positivo tuvo un efecto de cierre de herida de un $6 \pm 3,6$ % del área.

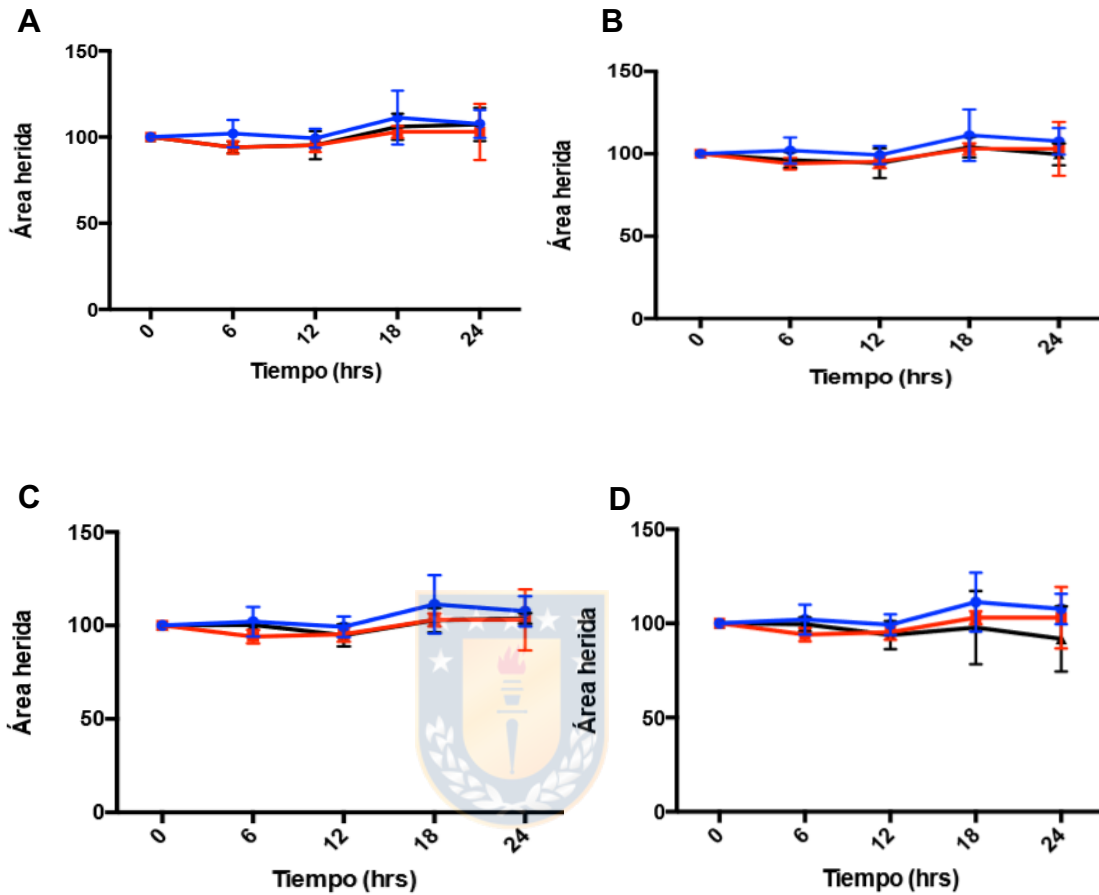


Figura 9. Ensayo de la herida para la línea celular HDF: A) Extracto total, B) Extracto *knock-out* 1, C) Extracto *knock-out* 2, D) Extracto *knock-down*. El control positivo corresponde a la línea de color rojo y el negativo a la línea de color azul. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para ningún extracto respecto de los controles y respecto del tiempo analizado.

Estos resultados no se relacionan con la literatura (de Moura Sperotto et al., 2018), donde se ha visto cierre de la herida al realizar este ensayo con células HaCaT y con concentraciones distintas de verbascósido, incluso menores que la utilizada en este ensayo. Sin embargo, estos ensayos han sido realizados en placas de 6, con otro sistema y densidad celular, por lo cual, no es comparable. Además, esta técnica fue recién montada en el laboratorio y debe ser optimizada. Cabe destacar que este ensayo fue realizado en una sola placa, por lo cual, para cada tiempo de lectura el tiempo de exposición de esta placa fue de aproximadamente 50 min a temperatura ambiente y en condiciones de humedad ambientales, lo que pudo haber afectado las condiciones de cultivo descritas para estas células. Por otro lado, las células fueron cultivadas con los extractos en condiciones de FBS de 0.5 %, menor al utilizado para el control positivo, lo cual es recomendable considerando que el porcentaje de FBS debe ser muy bajo, pero suficiente para prevenir la apoptosis o bien el desprendimiento de las células (Liang et al., 2007). Sin embargo, dado que el control positivo tampoco arrojó los resultados esperados, éste fundamento explica solo parcialmente los resultados. Se sabe que el uso de fibronectina o poli-lisina en las placas también influye en los resultados del ensayo ya que durante la herida parte de este recubrimiento es removido y altera los resultados. Incluso es recomendable hacer dos heridas en paralelo en el mismo pocillo para mejorar la estadística ya que es difícil controlar y mantener homogéneas la fuerza

aplicada sobre la placa. También se recomienda el de uso de controles como mitomicina C (inhibe la migración celular) e incluso paraformaldehído para ayudar a la adhesión (Grimming et al., 2019; Martinotti, 2019; Varankar and Bapat; 2018).

Por último, es recomendable que las áreas de las heridas sean similares con el fin de minimizar la variación causada por la diferencia entre ellas (Liang et al 2007) y que ésta solo dependa de los extractos, sin embargo, el ancho de herida es muy difícil de optimizar y una potencial solución sería aumentar el número de replicas técnicas y biológicas en futuros ensayos.



2.4 Capacidad antioxidante de los extractos diseñados

En la tabla 1 se observan los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante obtenida mediante DPPH. Podemos ver que ambas fracciones sustraídas tienen una alta capacidad antioxidante, siendo mayor el extracto *knock-out* 1 que corresponde a la fracción en donde se identificó el verbascósido como el compuesto mayoritario, obteniendo 1787.74 μmol trolox/g extracto, con un IC_{50} de 37.01 $\mu\text{g/mL}$, pero también el extracto *knock-out* 2 en donde el compuesto forsitósido es el mayoritario, también presenta una alto poder antioxidante con un IC_{50} de 54.45 $\mu\text{g/mL}$ y 1516.79 μmol trolox/g extracto. Finalmente el extracto *knock-down* (reducido) tiene menor

poder antioxidante, debido a que se han sustraído los compuestos mayoritarios, quedando solo una muy baja concentración de estos. Estos resultados coinciden con lo obtenido mediante el ensayo ORAC, en donde la fracción knock-down tiene muy baja capacidad antioxidante y las 2 fracciones sustraídas presentan alto poder antioxidante, como se puede ver en la figura 10. Esto nos lleva a concluir que los fenilpropanoides son los que más aportan a la capacidad antioxidante.

Tabla 1: DPPH para las fracciones sustraídas por CPC para el extracto de matico: extracto total, fracción *knock-out* 1, fracción *knock-out* 2 y fracción *knock-down*. (n=3)



Extractos diseñados	DPPH IC₅₀ (µg/ml)	DPPH µmol trolox/ g extracto
Extracto total	65.88	1085.15
<i>Knock-out</i> 1	37.01	1787.74
<i>Knock-out</i> 2	54.45	1516.79
<i>Knock-down</i>	150.21	432.27

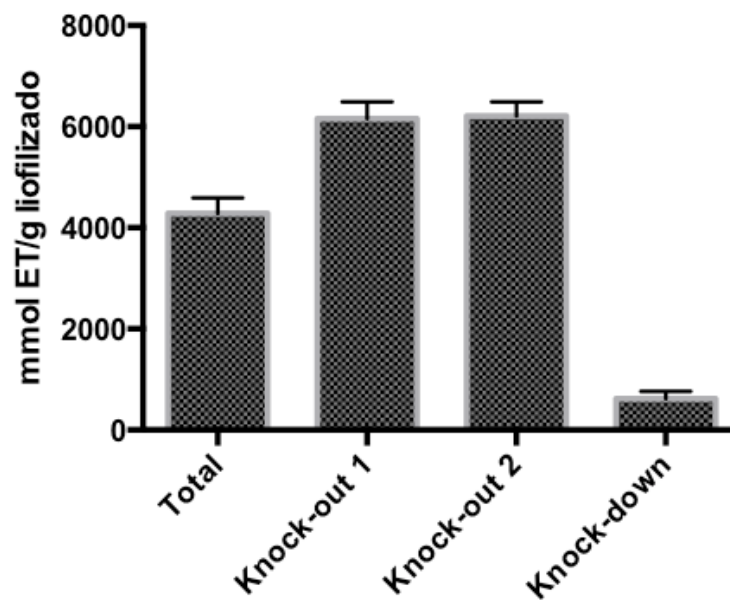


Figura 10. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), la gráfica presenta el promedio \pm desviación estándar (SD) de tres replicas, para las fracciones sustraidas por CPC para el extracto de matico: extracto total, fracción *knock-out* 1, fracción *knock-out* 2 y fracción *knock-down*.

3. Conclusiones

Las hojas de matico, contienen un gran número de compuestos fenilpropanoides, lo que en conjunto con los flavonoides podría explicar los efectos farmacológicos de la planta. Una forma de confirmar dichas propiedades es a través de la sustracción química. Para ello se usó la cromatografía de partición centrífuga (CPC), que es una técnica preparativa que permitió sustraer dos fracciones, que corresponden a los extractos *knock-out* 1 en donde el compuesto mayoritario es el verbascósido y el extracto *knock-out* 2 corresponde a la fracción cuyo compuesto mayoritario es el Forsitosido B, y la fracción que quedó desprovista se denominó *knock-down*. Dichos extractos fueron probados para evaluar las propiedades de cicatrización y el poder antioxidante. Los resultados obtenidos no permitieron evaluar las propiedades cicatrizantes del extracto de matico tras sustraer los compuestos mayoritarios. Lo anterior se podría explicar por el hecho que en ensayo de la herida no se logró ajustar adecuadamente al tiempo de exposición de los extractos. Otro factor que también pudo haber afectado es que el método utilizado requiere mayor optimización en cuanto al número de replicas, puesto que la información que entrega este ensayo depende de la edad y capacidad de adhesión celular intrínseca, además de factores de crecimiento presentes en el medio.

Referencias

Backhouse. N, L. Rosales a, C. Apablaza a, L. Goíty, S. Erazo a, R. Negrete a, C. Theodoluz b, J. Rodríguez b, C. Delporte, Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, *Buddlejaceae*, *Journal of Ethnopharmacology* 116 (2008) 263–269

Bonnekoh, B.; Wevers, A.; Geisel, J.; Rasokat, H.; Mahrle, G. Antiproliferative Potential of Zidovudine in Human Keratinocyte Cultures. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1991, 25 (3), 483–490.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28.25-30.

De Moura Sperotto, N. D.; Steffens, L.; Veríssimo, R. M.; Henn, J. G.; Péres, V. F.; Vianna, P.; Chies, J. A. B.; Roehe, A.; Saffi, J.; Moura, D. J. Wound Healing and Anti-Inflammatory Activities Induced by a *Plantago Australis* Hydroethanolic Extract Standardized in Verbascoside. *J. Ethnopharmacol.* 2018, 225 (July), 178–188.

Liang, C. C.; Park, A. Y.; Guan, J. L. In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro. *Nat. Protoc.* 2007, 2 (2), 329–333.

Martinotti S., Ranzato E. (2019) Scratch Wound Healing Assay. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press

Moharamzadeh, K.; Van Noort, R.; Brook, I. M.; Scutt, A. M. Cytotoxicity of Resin Monomers on Human Gingival Fibroblasts and HaCaT Keratinocytes. *Dent. Mater.* 2007, 23 (1), 40–44.

Ou, B., Chang, T., Huang, D., Prior, R.L. (2013). Determination of Total Antioxidant Capacity by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using

Fluorescein as the Fluorescence Probe: First Action 2012.23. *Journal of AOAC International*, 96(6), 1372-1376.

Paco, K.; Ponce-Soto, L. A.; Lopez-Illasaca, M.; Aguilar, J. L. Determinación Del Efecto Cicatrizante de Piper Aduncum (Matico) En Fibroblastos Humanos. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2016**, 33 (3), 438.

Ramírez Hernández, G. A. Fisiología de La Cicatrización Cutánea. *EMC - Dermatología* 2010, 2 (2), 69–78.

Roman Grimmig, Patrick Babczyk, Philipp Gillemot, Klaus-Peter Schmitz, Margit Schulze and Edda Tobiasch. Development and Evaluation of a Prototype Scratch Apparatus for Wound Assays Adjustable to Different Forces and Substrates. *Appl. Sci.* 2019, 9, 4414.

Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening. *Nat. Protoc.* 2006, 1 (3), 1112–1116.

Varankar Sagar S., Bapat Sharmila A. Migratory Metrics of Wound Healing: A Quantification Approach for in vitro Scratch Assays. *Frontiers in Oncology* 2018(8): 633.

Yue, P. Y. K.; Leung, E. P. Y.; Mak, N. K.; Wong, R. N. S. A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. *J. Biomol. Screen.* **2010**, 15 (4), 427–433.

Material suplementario

Tabla 1S: HPLC-DAD-QToF de la fracción *knock-out* 1 obtenida de la separación por CPC.

Peak	Formula	Experimental (observed) mass	Mass (monoisotopic mass) calculated	Error ppm	[M-H] ⁻ m/z	MS-MS fragments	Proposed compound
7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09712	464.09548	3.41	463.08841	301.03570	6-Hydroxyluteolin 7-O-glucoside
8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09547	464.09548	0.02	463.07781	282.06828	Unknown 2
9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09569	464.09548	0.21	463.08851	300.02774	Quercetin-3-O-glucoside
10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.1018	448.10056	3.5	447.09382	285.04171	Luteolin 7-O-glucoside
13	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.20782	624.20542	3.76	623.20061	461.16809, 315.10869, 161.02544	Verbascoside
15	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.20728	624.20542	3.20	623.20031	461.16773, 315.10891, 161.02550	Isoverbascoside
17	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	608.17308	608.17412	1.51	607.16502	461.07224	Lipidoside A
18	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.20712	624.20542	2.13	623.19635	461.16648	Forsythoside A
20	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	652.23701	652.23672	0.55	651.23041	505.08127, 475.06172, 456.15642	Martynoside

Tabla 2S: HPLC-DAD-QToF de la fracción *knock-out* 2 obtenida de la separación por CPC.

Peak	Formula	Experimental (observed) mass	Mass (monoisotopic mass) calculated	Error ppm	[M-H] ⁻ m/z	MS-MS fragments	Proposed compound
12	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	756.2499	756.24768	3.75	755.24347	593.21037	Forsythoside B
18	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.20729	624.20542	2.2	623.19644	461.16656	Forsythoside A

Tabla 3S: HPLC-DAD-QToF de la fracción *knock-down* obtenida de la separación por CPC.

Peak	Formula	Experimental (observed) mass	Mass (monoisotopic mass) calculated	Error ppm	[M-H] ⁻ m/z	MS-MS fragments	Proposed compound
8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09547	464.09548	0.02	463.07781	282.06828	Unknown 2
9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09569	464.09548	0.21	463.08851	300.02774	Quercetin-3-O-glucoside
10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.1018	448.10056	3.5	447.09382	285.04171	Luteolin 7-O-glucoside
12	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	756.2506	756.24768	3.86	755.24353	593.21042	Forsythoside B

13	$C_{29}H_{36}O_{15}$	624.20782	624.20542	3.76	623.20061	461.16809, 315.10869, 161.02544	Verbascoside
16	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432.10609	432.10565	1.03	431.09884	268.03810	Apigenin-7-O- glucoside
18	$C_{29}H_{36}O_{15}$	624.20712	624.20542	2.13	623.19635	461.16648	Forsythoside A
20	$C_{31}H_{40}O_{15}$	652.23701	652.23672	0.55	651.23041	505.08127, 475.06172, 456.15642	Martynoside
23	$C_{35}H_{46}O_{20}$	786.25931	786.25824	1.35	785.25239	547.18298, 463.16087, 341.09857, 207.06621, 163.03947	Unknown 6
24	$C_{34}H_{44}O_{19}$	756.25029	756.24768	3.46	755.2433	709.23749, 465.02019, 405.01723, 341.00981, 285.04084	Unknown 7

Verbascoside y forsythoside B sólo están en trazas en esta fracción.

Capítulo 3: sección 1

Title: Green Extraction of Alkaloids and Polyphenols from *Peumus boldus* Leaves with Natural Deep Eutectic Solvents and Profiling by HPLC-PDA-IT-MS/MS and HPLC-QTOF-MS/MS

**Jeniffer Torres-Vega¹, Sergio Gómez-Alonso², José Pérez-Navarro²
Edgar Pastene-Navarrete^{1,3,*}**

¹ Pharmacognosy laboratory, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT), University of Concepción, Concepción, Chile; jeniffertorres@udec.cl (J.T.).

² Regional Institute for Applied Scientific Research, Faculty of Chemical Sciences, University of Castilla-La Mancha, Castilla-La Mancha, Spain; Sergio.Gomez@uclm.es (S.G-A.); Jose.PNavarro@uclm.es (J.P-N.)

³ Laboratorio de Síntesis y Biotransformación de Productos Naturales, Dpto. Ciencias Básicas, Universidad del Bio-Bio, Chillan, Chile; edgar.pastene@gmail.com (E.P-N.)

* Correspondence: edgar.pastene@gmail.com; Tel.: +56-422463156

Recibido: 8 Enero 2020; Aceptado: 8 Febrero 2020

Abstract:

Peumus boldus Mol., is a Chilean medicinal tree used for gastrointestinal and liver diseases. Such medicinal properties are associated with the presence of bioactive flavonoids and aporphine alkaloids. In this study, a new green and efficient extraction method used seven natural deep eutectic solvents (NADES) as extraction media. The extraction efficiency of these NADES was assessed, determining the contents of boldine and total phenolic compounds (TPC). Chemical profiling of *P. boldus* was done by high-performance liquid chromatography coupled to photo diode array detector and electrospray ion-trap mass spectrometry (HPLC-PDA-ESI-IT/MS) and electrospray ionization quadrupole time-of-flight high-resolution mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). Among the NADES tested, NADES4 (choline chloride-lactic acid) and NADES6 (proline-oxalic acid) enable better extraction of boldine with 0.427 ± 0.018 and 2.362 ± 0.055 mg of boldine g^{-1} of plant, respectively. Extraction of boldine with NADES4 and NADES6 was more efficient than extractions performed with methanol and water. On the other hand, the highest TPC were obtained using NADES6, 179.442 ± 3.79 mg of gallic acid equivalents (GAE g^{-1}). Moreover, TPC in extracts obtained with methanol does not show significant differences with NADES6. The HPLC-PAD-MS/MS analysis enable the tentative identification of 9 alkaloids and 22 phenolic compounds. The results of this study demonstrate that NADES are a

promising green extraction media to extract *P. boldus* bioactive compounds and could be a valuable alternative to classic organic solvents.

Keywords: *Peumus boldus*; boldine; mass spectrometry; natural deep eutectic solvents

1. Introduction

Peumus boldus Mol., (Monimiaceae) is a Chilean medicinal tree used for gastrointestinal and liver diseases [1,2]. In Chile, this tree also is called Boldo, Peta, Voldu or Boldu and botanically was described for the first time by Molina in 1782. The phytochemical profiling of Boldo usually is based on its aporphine alkaloids and phenolic compounds, whose concentration varies depending on the analyzed part of the tree [3–6]. For example, the concentration of boldine is higher in the bark than in the leaves. Moreover, certain classes of alkaloids are concentrated in other parts such as wood, fruits or roots and it is not possible to detect them in the leaves [7]. So, the analysis of botanical parts of Boldo tree allowed the identification of alkaloids such as boldine, isoboldine, coclaurine, *N*-methylcoclaurine, (–)-pronuciferine, (+)-reticuline, laurotetanin, *N*-methyl-laurotetanin, sinoacutin, isocorydine, isocorydine *N*-oxide, nor-isocorydine and laurilitin (norboldine) (Figure 1). However, pharmacopoeias (European and British) and EMA reports have established a minimum limit of 1.0 per cent of total alkaloids in Boldo leaves expressed as boldine (dry weight

basis) [8,9]. Among flavonoids, rhamnetin 3-O-arabinoside 3'-O-rhamnopyranoside (peumoside), isorhamnetin 3-O-glucoside 7-O-rhamnoside (boldoside), kaempferol-3-glucoside-7-rhamnoside, isorhamnetin di-glucosyl-di-rhamnoside and other quercetin and kaempferol glycosides have been reported [6,10]. Due to its higher concentration and better extraction yields in herbal infusions, some authors thought that flavonoids are responsible for the antioxidant and chemopreventive effects of Boldo [6,10,11]. Moreover, Boldo leaves also have higher amounts of gallic acid, tannins and catechin-derived procyanidins rather than boldine and other alkaloids. However, so far, no pre-clinical or clinical evidences have been generated to confirm such statement. The mild choleric activity of isolated boldine (50 mg kg⁻¹day⁻¹ dose) has been ascribed to osmotic effect and an up-regulation of Bsep transport mediated by farnesoid X receptor activation [12]. Also, a recent work suggests that boldine (50 mg kg⁻¹day⁻¹, oral gavage) have renoprotective activity in hypertensive 2K1C rats reducing plasmatic levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and lowering the increase in angiotensine converting enzyme type I (ACE-1). This effect leads to a decreasing of several downstream mediators such as transforming growth factor beta (TGF-β) [13]. By another hand, it has been reported that boldine has in vitro antioxidant and trypanocidal activities [6,14–16]. Another study show that the most abundant alkaloid found in Boldo leaves was isocorydine, which currently is under evaluation for its anticancer properties [17]. An in vitro study conducted by our

group found that catechin-based proanthocyanidins (dose of 15.9 μg gallic acid equivalents mL^{-1}) are potent inhibitors against *Helicobacter pylori* urease and bacterial adherence (dose of 2.0 mg gallic acid equivalents mL^{-1}) to human gastric adenocarcinoma cells (AGS), whereas boldine and ascaridol were inactive [18]. In the last five years, new solvents have been introduced as an alternative to conventional organic solvents. Among them, Deep Eutectic Solvents (DES) are generally less toxic and include not only synthetic compounds but also several organic compounds of natural origin such as choline chloride or malic acid [19–22]. These components could be simple sugars (sucrose, glucose, fructose), organic acids (malic, citric, lactic acid), amino acids (proline, glycine) or quaternary ammonium compounds (choline or betaine), which normally are concentrated inside or around vesicles in vegetal cells [23]. So, it is believed that DES formed inside the plant cell play a central role in improving the solubility of water insoluble molecules such as lignin, terpenes and a wide type of aglycons. Indeed, when some of these metabolites were combined in certain proportions, viscous liquids are generated, which are called Natural Deep Eutectic Solvents (NADES). In general, the components of NADES are characterized by the presence of various functional groups such as hydroxyl, carboxyl or amino groups [23,24]. NADES are typically formed between a hydrogen bond donor compound (HBD) and a hydrogen bond acceptor compound (HBA). These groups can form an intermolecular hydrogen bond, leading to highly structured viscous

liquids, which explains their specific physical properties and their different solubilizing behavior compared to conventional solvents such as water and alcohols. Therefore, these liquids can form hydrogen bonds with phenolic compounds increasing significantly their solubility in the NADES network structure. They have been shown many advantages over the conventional solvents currently used for extraction. For instance, they have vapor pressure near zero, adjustable viscosity and high solubilization ability, which in some cases can exceed 12.000 times that of water [23,24]. From the environmental and economic point of view, they also present major advantages with respect to their biodegradability, sustainability, low cost and simple preparation. All these properties suggest their great potential as extraction media for natural products and their possible applications for foods, pharmaceuticals and cosmetics [25]. The use of NADES in the extraction of alkaloids is still very limited and there are only a few reports of its use published in the last two years. One of the most recent works deals with the extraction of alkaloids derived from morphinane, protoberberine, bisbenzylisoquinoline, indole and quinolizidine alkaloids using 75 different DES [26]. Authors found that DES based on Choline-lactic acid were superior for the extraction of alkaloids derived from morphinane, protoberberine, indole, and quinolizidine alkaloids. It is worth noting that one of the parameters that most influenced the extraction with DES was the water content used, which was optimized at close to 46%. In another recent work, different NADES were used for the extraction of

alkaloids from Amarillydaceae [27]. These authors reported that NADES with the best efficiency to extract lycorine, crinine and crinamine were those derived from Choline Chloride: fructose and H₂O (35%). The optimization of such solvent showed that the best conditions were a temperature of 45 °C, extraction time of 51 min and a water content of 21%. Moreover, the same group evaluated the cytotoxicity of extracts made with NADES and surfactants for the same alkaloids, finding that the solvent can significantly influence the biological activity of the extract [28]. Considering the above-mentioned variables, in this work we assess for the first time the extraction of the alkaloids and polyphenols from Boldo leaves using different NADES. These new green solvents not only improve the extraction of bioactive compounds but also allow to obtain extracts with different phytochemical profiles. Additionally, in the present work, we evaluated the presence of the main alkaloids and phenolic compounds present in *P. boldus* leaves extracts by using HPLC-DAD-IT-MS/MS and HPLC-QTOF-MS/MS.

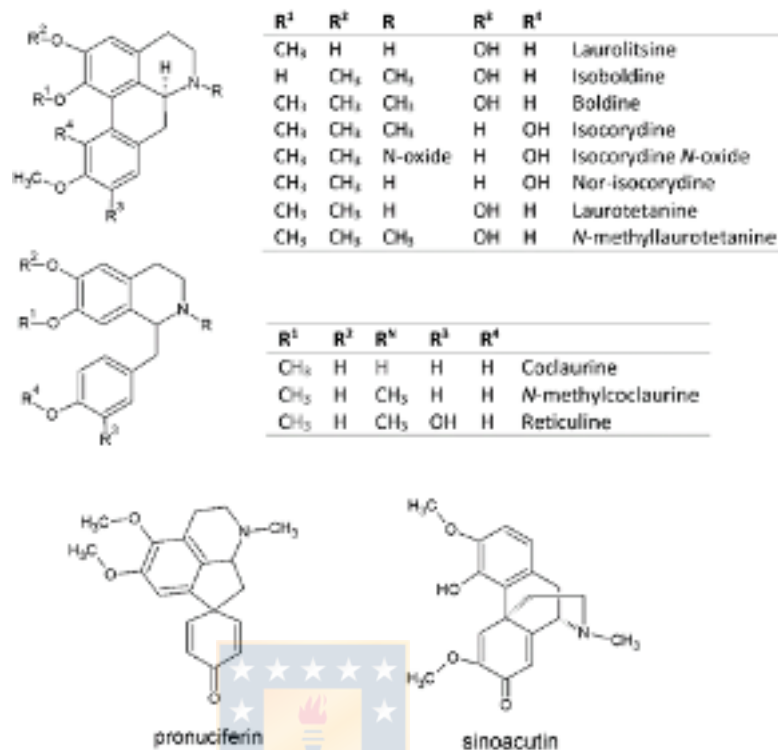


Figure 1. Structure of main alkaloids identified from *Peumus boldus* leaves.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

Choline chloride (>98.0%), L-(+)-Lactic acid (>98.0%), glycerol (>99.5%), 1,2-propanediol (>99%) and 2,9-Dihydroxy-1,10-dimethoxyaporphine (boldine) analytical standard (purity \geq 98 %) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Citric acid (>98%), levulinic acid (>98%), L-Proline (>99%), oxalic acid (>99%), sodium carbonate (>99.9%), gallic acid (>98.0%), and Folin–Ciocalteu's phenol reagent for analysis-grade were obtained from

Merck (Darmstadt, Germany). HPLC-grade acetonitrile, methanol, formic acid, ammonium formate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). (Sigma Aldrich, Saint Louis) was used as reference for identification. Ultrapure water was produced by a Milli-Q apparatus (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Preparation of NADES

The preparation of all NADES tested was based on previously reported procedures [26-28, 37, 38]. Briefly, choline chloride and L-proline (hydrogen bond donor – HBD) was mixed with lactic acid, 1,2-propanediol, glycerol, levulinic acid, citric acid or oxalic acid (hydrogen bond acceptors – HBA) at predetermined molar ratios. Mixtures were mildly heated under stirring, until a perfectly transparent liquid was formed. NADES were kept in sealed glass vials in the dark, at ambient temperature. The list of the NADES used in this study, along with details regarding their preparation and references are presented in Table 3.

2.3. Plant material and extraction

The plant material (leaves of *Peumus boldus*) was collected at the University of Concepción in June 2017 and authenticated in the Herbarium of the Department of Botany at the University of Concepción, Chile. The Voucher

specimen was kept under code CONC N° 187541. After collection, the plant samples were air dried for 14 days at room temperature in the dark, and then ground to a fine powder using a Waring blender (USA). This material was used for all further procedures. All NADES were used as 80% (v/v) aqueous solutions in order to reduce viscosity. Extractions were carried out according to a previously described methodology [39, 40]. In brief, plant material (0.1 g) was placed in a 50 mL conical centrifuge tubes and 10 mL of NADES solvent was added. With the aim to compare the extraction yield of alkaloids from *P. boldus*, methanol and water were used as control solvents under the same conditions set up for all NADES. The suspension was vortexed vigorously for 30 s until a homogeneous thick mixture was obtained. Then, homogeneous samples were extracted through Heating and stirring extraction in a Syncore Polyvap R24 (Büchi, Flawil, Switzerland), under the following conditions: 60 °C for 50 min at 340 rpm. In addition, Ultrasound-assisted extraction (UAE) was performed using an Ultrasonic homogenizer bar JY92-IIDN (XinZhi Institute, NingBo, China) at room temperature for 20 min with a sonication power of 140 W and frequency of 37 kHz. After extraction, samples were clarified by centrifugation (Eppendorf 5804 R, Long Island, New York, NY, USA) at 8000 rpm for 10 min. The supernatants were filtered through a Millipore 0.45 µm cellulose acetate membrane filter and two-fold diluted with mobile phase prior to HPLC analysis. The extraction procedure describes above was performed

in triplicates. For total polyphenol content determination, samples were 10-fold diluted with distilled water.

2.4. Analysis of Extracts

2.4.1. Total Polyphenol Content

The extracts were re-dissolved in water, and total phenolic content (TPC) was determined by using the Folin–Ciocalteu method with slight modifications [59]. In brief, 20 μL of properly diluted samples were mixed with 780 μL of distilled water and 50 μL of Folin-Ciocalteu reagent in 1.5 mL conical tubes. After 1 min, 150 μL of 7.5% sodium carbonate solution were added and mixed. Samples were leave in the dark at room temperature for 1 h. Aliquots of 200 μL were charged in 96 well microplates and the absorbance were measured at λ 750 nm using an EPOC microplate reader (Biotek). The analysis were performed in triplicate and normalized against negative controls (distilled water or diluted NADES) according to the Table 1. TPC was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of extract (mg g^{-1} GAE of extract) based on a standard curve of gallic acid (50–400 mg L^{-1} ; $y = 0.013x + 0.0073$; $R^2 = 0.9991$).

2.4.2. Qualitative and Quantitative HPLC-PDA-IT-MS/MS analysis

The samples of *P. boldus* were analyzed by HPLC-PDA-IT-MS/MS in an Agilent 1100 Series system (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with an automatic degasser, a quaternary pump, an auto-sampler and a photodiode array detector (G1315B) and LC/MSD Trap VL (G2445C VL) ESI-MSⁿ system, and it was coupled to an Agilent Chem Station (version B.01.03) data-processing station. The stationary phase employed was a Zorbax Eclipse XDB-C18 Narrow-Bore (150 mm x 2.1 mm; 3.5 µm particle size) column, while the mobile phase consisted of solvent A (water/formic acid/acetonitrile, 87:10:3, v/v/v) and solvent B (acetonitrile/water/formic acid, 50:40:10, v/v/v). The elution profile was (time, % of solvent B): 0 min, 3%; 10 min, 15%; 35 min, 40% B; 39- 41 min, 100% B, and 47 min, 3% B [60]. The flow rate was 0.190 mL min⁻¹ and the column temperature was set at 40 °C while the injection volume was 20 µL. The mass spectrometer was run in the positive ion mode with the following parameters: the capillary voltage was set at 3500 V, drying gas flow N₂, 8 mL min⁻¹; drying temperature, 325 °C; nebulizer, 50 psi; and scan range, 100–1200 *m/z*. The collision energy (CE) increased linearly in the range of 30–45 eV depending on the *m/z* range (100–1200). The range of detection wavelength were 200–600 nm. However, for alkaloids detection and boldine quantification, 304 nm was selected. *Boldo* extracts (10 mg) were dissolved in methanol (1 mL), diluted with mobile phase and filtered with a

0.45 μm syringe filter of polytetrafluoroethylene (13 mm) (Millex). The results were expressed as milligrams per gram of extract (mg g^{-1} extract). The linearity of the method was assessed from the correlation coefficients (R^2) of three set of calibration curves obtained for seven levels of boldine concentrations ranging from 0.0469 mg L^{-1} to 15.00 mg L^{-1} ($y = 352.33x - 75.904$; $R^2 = 0.9971$). Each point was injected three times. Limit of detection (LOD) and Limit of quantification (LOQ) were estimated at signal to noise (S/N) ratios of 3:1 and 10:1, respectively [61]. With this procedure, LOD and LOQ values were 0.003 mg L^{-1} and $\text{LOQ} = 0.023 \text{ mg L}^{-1}$, respectively.



2.4.3. Q-ToF high-resolution mass spectrometry measurements

The analytical system used consisted of a 1260 Infinity high performance liquid chromatography system coupled to a diode array detector (DAD) and a 6545 quadrupole-time of flight (Q-TOF) mass spectrometer detector (Agilent, Waldbronn, Germany). The control software was Mass Hunter Workstation version B.06.11 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The Q-TOF used a Dual Jet Stream Electrospray Ionization (Dual AJS-ESI) source operated in the positive ionization mode and the following parameters were set: capillary voltage, 3500 V; fragmentor, 200; gas temperature, 350 $^{\circ}\text{C}$; drying gas, 8 L min^{-1} ; nebulizer, 40 psig; sheath gas temperature, 400 $^{\circ}\text{C}$; sheath gas flow, 10 L min^{-1} ; acquisition range, 100–1000 m/z ; and CID, with a linear range of 30–45.

Samples were analyzed after injection (10 μ L) on a Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD column (2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μ m) protected with a 5 mm guard column of the same material thermostated at 40 $^{\circ}$ C and his flow rate was 0.3 mL min⁻¹. The solvent system was 1mM of ammonium formate + 0.1% formic acid in water (solvent A) and 1 mM of ammonium formate + 0.1% formic acid in methanol (solvent B). The elution gradient was (time, % of solvent B): 0 min, 7%; 10 min, 20%; 40 min, 75%; 46.5 min, 95%; 56 min, 7%; and a post time of 8 min. Compounds were identified using the algorithm “Find by Formula” that evaluated the mass accuracy together with the isotopic relative abundance and isotopic separation. All the compounds were identified by the QTOF-MS and the MS/MS spectra acquired with the IT-MS and their absorption spectra in UV-visible region, as well as considering the data provided by literature [6,7,29–36].

2.5. Statistical Analysis

Statistical comparison was performed using GraphPad Prism 5. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Variables were expressed as mean and standard deviation (SD). The comparisons between the means in each assay were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) at a 95% confidence level. Tukey’s multiple comparison post-hoc test was applied to determine the differences amongst extraction yields. Data points plotted in

Figures 5 and 6 represent the means of at least three independent experiments, each conducted in triplicate.

3. Results and Discussion

3.1. Phytochemical profiling of *Peumus boldus* methanol extract

Figure 1 shows the structure of the two main types of alkaloids present in *P. boldus*. In Figure 2 an illustrative chromatogram is shown for the methanol extract (control solvent) of *P. boldus* registered at 304 nm. Peaks were numbered according to its elution order from 1 to 31. As summarized in Tables 1 and 2 as well as Figures S1–S4, identification was based on UV spectra obtained by HPLC-PDA, comparison of the retention times with available standards, accurate masses (HPLC-QTOF-MS/MS) and MS/MS spectra (HPLC-IT-MS/MS). Therefore, these chromatographic analyses allow the identification of nine alkaloids. Among these compounds, six were identified as aporphines: laurilitsine, isoboldine, boldine, isocorydine, laurotetanine and N-methylaurotetanine; and three were identified as benzyloquinoline derivatives: coclaurine, N-methylcoclaurine and reticuline. Additionally, 22 phenolic compounds were identified by HPLC-IT-MS/MS in Boldo leaf extracts (Table S1). Most of them had been previously reported by Simirgiotis and coworkers [6], who identified 52 phenolic compounds in male and female Boldo trees. As expected, since this author used aqueous extraction, a greater

presence of proanthocyanidins oligomers (19 trimers + tetramers) is plausible. Also, a greater number of tri and tetra-glycosides of quercetin, isorhamnetin and kaempferol was observed.

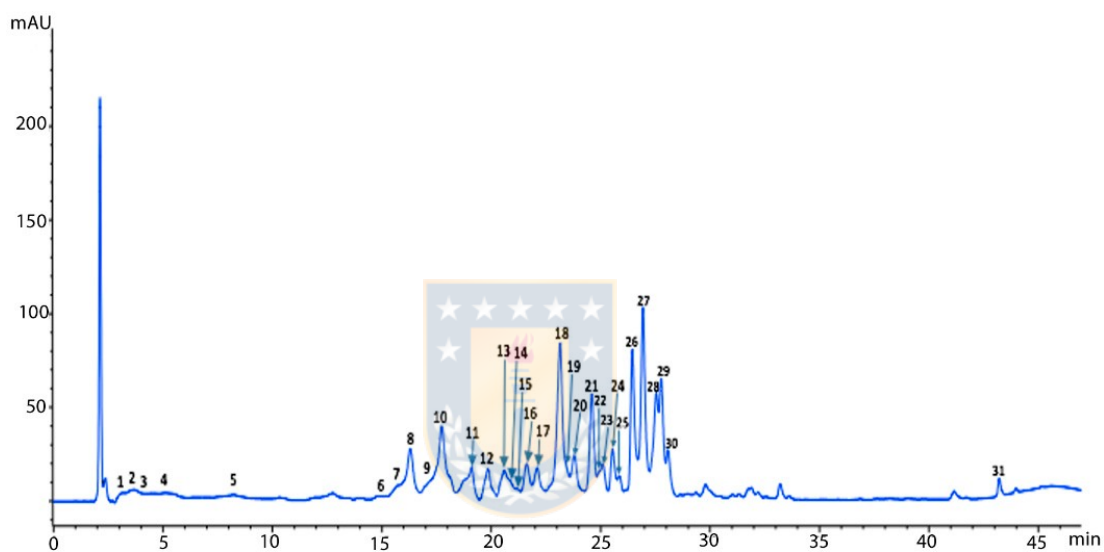


Figure 2. Representative HPLC-PDA trace of *Peumus boldus* leaf extract obtained with methanol. The trace corresponds to the signals recorded at 304 nm. Numbers refers to the compounds listed in Tables 1 and 2. HPLC separation was performed in reverse phase under gradient.

Table 1. Alkaloids identified from *P. boldus* with the high-performance liquid chromatography coupled with Ion Trap mass spectrometry (HPLC-IT-MS/MS) method in positive ionization mode.

Peak *	t _R (min)	λ Max (nm)	Identified compound	[M+H] ⁺ m/z	MS/MS Fragments	Ref.
6	15.2	281, 302	coclaurine	286.1	269.0 , 237.0, 209.0, 175.0	[29, 30]
7	15.8	283, 303	<i>N</i> -methylcoclaurine	300.1	269.1 , 237.1, 209.0, 175.0	[29, 31]
8	16.3	282, 302	lauroilsine	314.0	265.0 , 297.1	[32]
9	17.3	281, 302	isoboldine	328.1	297.1, 265.0 , 237.1, 165.0	[31, 33]
10	17.8	280, 303	boldine	328.1	297.1, 265.0 , 237.0, 205.0	[29, 34]
15	21.0	265, 282	reticuline	330.0	192.1 , 175.1, 137.0	[31, 36]
21	24.6	266, 303	isocorydine	342.1	296.1, 279.1 , 264. 0, 248.1,	[37]
27	26.8	283, 302,	laurotetanine	328.1	311.1, 279.1 , 248.1, 219.1, 191.1	[29, 32]
28	27.5	282, 303	<i>N</i> - methyllaurotetanine	342.2	311.1, 296.1, 280.1 , 265.1, 253.1, 237.1	[29, 32]

* Peak numbers are the same as the ones depicted in Figure 2. Bold values represent the base peak of the mass spectra.

Table 2. Alkaloids identified from *P. boldus* with the high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight high-resolution mass spectrometry (HPLC-QTOF-MS/MS) method in positive ionization mode.

Peak*	t _R (min)	Identified compound	Formula	Mass Experimental	Mass Calculated	Error ppm	[M+H] ⁺ m/z	MS-MS fragments
6	25.64	Coclaurine	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285.13653	285.13649	0.14	286.14390	269.11697 , 237.09093, 209.09577, 175.07523
7	26.12	N-methylcoclaurine	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299.15228	299.15214	0.47	300.15937	269.11659 , 237.09041, 209.09544, 175.07485
8	26.51	Lauroilsine	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313.13133	313.13141	0.26	314.13859	297.11174 , 265.08608, 209.09629, 165.06924
9	27.50	Isoboldine	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.14718	327.14706	0.38	328.15444	297.11182, 265.08594 , 237.09035, 165.06932
10	27.55	Boldine	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.14716	327.14706	0.31	328.15445	297.11248, 265.08617 , 237.09124, 205.06469
15	27.41	Reticuline	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	329.16323	329.16271	1.6	330.17059	192.10222 , 175.07548, 137.05999
21	30.02	Isocorydine	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	341.16282	341.16271	0.32	342.17014	296.10428, 279.10209 , 264.07821, 248.08325
27	30.08	Laurotetanine	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.14735	327.14706	0.9	328.13587	311.12739, 279.10199 , 248.08321, 191.08531
28	32.55	N-Methyl-laurotetanine	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	341.16313	341.16271	1.23	342.17048	311.12849, 296.10546, 280.11149 , 265.08649

* Peak numbers are the same as the ones depicted in Figure 2. Bold values represent the base peak of the mass spectra.

3.1.1. Identification of *P. boldus* phenolic compounds

In our study, compounds corresponding to the chromatographic peaks 1, 2 and 5 show molecular ions $[M + H]^+$ at m/z 579 and the characteristic MS/MS ion fragment at 291, suggesting that these compounds are procyanidin dimers of catechin or epicatechin (compounds corresponding to the chromatographic peaks 3 and 4, m/z 290.4 and 291.1). In a previous work, after phloroglucinolysis, we demonstrate that the structure of such compounds corresponds to catechin-derived procyanidins [18]. Compounds corresponding to the chromatographic peaks 11, 16, 17, 18, 23, 25, 26 were identified as luteolin derivatives. Compound corresponding to chromatographic peak 11 was identified as luteolin-pentosyl-glucosyl-rhamnose with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 727.2. MS/MS data confirm a loss of 132 amu (dehydrated pentose) and a subsequent loss of 162 amu (hexose) and 146 amu (rhamnose). Peak 16 was identified as luteolin 3-O-rutinoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 595.1. MS/MS data confirm a loss of 162 amu (hexose) and 146 amu (rhamnose). Peak 17 was identified as luteolin dipentosyl rhamnoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 697.2. MS/MS data confirm a sequential loss of two 132 amu (dehydrated pentose) and 146 amu (rhamnose). Compound corresponding to peak 18 was identified as luteolin 7-O-rutinoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 595.1. MS/MS data confirmed a loss of 162 amu (hexose) and 146 amu (rhamnose). Peak 23 was identified as luteolin with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 286.2. Peak 25 was identified as luteolin

glycoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 595.1. However, MS/MS data do not allow to confirm its identity. Compound 26 was identified as luteolin dirhamnoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 579.1. MS/MS data confirmed a sequential loss of two 146 amu (rhamnose). Compound corresponding to peak 12 was identified as hesperidin-7-O-rhamnoglucoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 611.1. MS/MS data confirm a loss of 162 amu (hexose) and a subsequent loss of 146 amu (rhamnose). Peak 14 is a quercetin derivative with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z at 581.1. MS/MS data of this compound suggested a loss of 132 amu corresponding to dehydrated pentose and a subsequent loss of 146 amu (deoxyhexose), giving the diagnostic fragment of quercetin at m/z 303 in positive mode. This compound was reported previously as quercetin pentosyl-rhamnose [6]. Peaks 13, 19, 24 and 29 were tentatively identified as myricetin derivatives. Peak 13 was identified as myricetin-rhamnosyl-glucosyl-pentoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 757.2. MS/MS data confirm the sequential loss of 132 amu (dehydrated pentose), 162 amu (hexose) and 146 amu (rhamnose). Peak 19 was identified as myricetin-rhamnosyl-hexose with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 625.2. MS/MS data confirm the sequential loss of 162 amu (hexose), and 146 amu (rhamnose). Peak 20 was identified as myricetin pentosyl-hexosyl-rhamnoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 727.1. MS/MS data confirm the sequential loss of 132 amu (dehydrated pentose), and 162 amu (hexose) and

146 amu (rhamnose). Compound corresponding to peak 24 was identified as myricetin-rhamnosyl-pentoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 595.2. MS/MS data confirm the sequential loss of 132 amu (dehydrated pentose), and 146 amu (rhamnose). Peak 29 was identified as myricetin-dirhamnoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 609.1. The MS/MS data confirm the sequential loss of two 146 amu (rhamnose). Peak 14 was identified as quercetin pentosyl-rhamnoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 581.1. MS/MS data confirm the sequential loss of 132 amu (dehydrated pentose), and 146 amu (rhamnose). Peak 22 was identified as isorhamnetin rhamnosyl-glucosyl-rhamnoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 771.2. MS/MS data confirm the sequential loss of 146 amu (rhamnose), 162 amu (hexose) and 146 amu (rhamnose). Peaks 30 and 31 are kaempferol glycosides. Peak 30 was identified as kaempferol-3-O-glucosyl-rhamnosyl-rhamnose with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 741.2. MS/MS data confirm the sequential loss of 132 amu (dehydrated pentose) and two 146 amu (rhamnose). Peak 31 was identified as kaempferol-3-O-coumaroyl-rhamnoside with molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 595.1. MS/MS data confirm the loss of 308 amu (coumaroyl glucoside moiety).

3.1.2. Identification of *P. boldus* Alkaloids.

As is shown in Tables 1 and 2, for compounds corresponding to the peaks 6 and 7 in positive ionization mode, the molecular formulas of ions at m/z 285.13653 and 299.15228 were predicted as $C_{17}H_{19}NO_3$ and $C_{18}H_{21}NO_3$. In HPLC-PDA-IT-MS/MS analysis, peaks 6 and 7 shown precursor ions at m/z 286.1 $[M + H]^+$ and m/z 300.1 $[M + H]^+$ yielded the MS/MS fragments ions at m/z 269, which correspond to the loss of NH_3 and CH_3NH_2 , respectively. These data agrees with the fragmentation patterns of coclaurine and *N*-methylcoclaurine [29–31]. In addition to this fragmentation pattern, these compounds suffer neutral loss of CH_3OH , which explain the fragment ion at m/z 237. Subsequently this last fragment gave the ion at m/z 209 corresponding to $-CO$ loss. Fragment ion at m/z 175 could be explained by the cleavage of the double bond present in the mother fragment ion at m/z 269. Finally, β -cleavage of the fragment ion at m/z 269 explain the origin of the ion fragment at m/z 137 (see scheme in Figure S4). On the other hand, for compound corresponding to peak 8 in positive ionization mode, the molecular formula of ion at m/z 313.13653 was predicted as $C_{18}H_{19}NO_4$. In HPLC-PDA-IT-MS/MS analysis, peak 8 show a precursor ion at m/z 314 $[M + H]^+$ and in MS/MS gave a fragment ion at m/z 297 corresponding to the loss of 17 Da $[MH + NH_3]^+$ and a main fragment ion at m/z 265 generated by the

sequential loss of two methyl radicals. Subsequently this last fragment gave the ion at m/z 237 corresponding to $-CO$ loss. These data suggest that peak 8 is laurilitine [32]. For compounds corresponding to peaks 9 and 10 in positive ionization mode, the molecular formulas of ions at m/z 327.14718 and 327.14716 were predicted as $C_{19}H_{21}NO_4$ and $C_{19}H_{21}NO_4$. In HPLC-PDA-IT-MS/MS analysis both compounds share the same molecular ion at m/z 328.1 $[M + H]^+$ and in MS/MS gave the same fragments ions at m/z 297 $[MH + H-31]^+$ corresponding to the loss of 31 Da from CH_3NH_2 and also a main fragment ion at m/z 265 $[M + H-31-32]^+$ and m/z 237 $[M + H-31-32-28]^+$, generated by the sequential loss of two methyl radicals and 28 Da from $-CO$ loss, respectively. These data and the comparison of elution order for standards in C-18 columns suggest that the identity of peaks 9 and 10 could unambiguously be assigned to isoboldine and boldine [29,31,33,34]. For compound corresponding to peak 15 in positive ionization mode, the molecular formula of ion at m/z 329.16323 was predicted as $C_{19}H_{23}NO_4$. In HPLC-PDA-IT-MS/MS analysis, peak 15 showed a molecular ion at m/z 330 $[M + H]^+$ and in MS/MS a prominent product ion at m/z 192 $[M + H-138]^+$, which is consistent with the loss of C ring with methoxyl and hydroxyl groups previous to a putative loss of 31 Da from CH_3NH_2 (very low abundance of fragment at m/z 299). In addition, fragment ion at m/z 192 is a diagnostic ion used to confirm the presence of a methoxyl and hydroxyl groups at the A ring

in benzyloisoquinoline alkaloids [31,35,36]. According with MS data, peak 15 is reticuline. For compound corresponding to peak 21 in positive ionization mode, the molecular formula of ion at m/z 341.16282 was predicted as $C_{20}H_{23}NO_4$. In HPLC-PDA-IT-MS/MS analysis, peak 21 showed a molecular ion at m/z 342.1 $[M + H]^+$, ions at m/z 311 and 296 in MS/MS product and a prominent fragment ion at m/z 279 caused by the sequential loss of CH_3NH_2 and a methoxyl radical. Fragments ions at m/z 264 and m/z 248.1 correspond to the consecutive loss of two methyl groups. According to these data, the identity of peak 21 is assigned to isocorydine [36]. For the compound corresponding to peak 27 in positive ionization mode, the molecular formula of ion at m/z 327.14735 was predicted as $C_{19}H_{21}NO_4$. In HPLC-PDA-IT-MS/MS analysis, peak 27 yielded a molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 328 and MS/MS ion at m/z 311 corresponding to the loss of 17 Da $[MH + NH_3]^+$. The ion fragment at m/z 279 is generated by a sequential loss of two methyl radicals, whereas the fragment ion at m/z 248 could be generated by the loss of a methoxyl group. These data and the elution time suggest that this peak is laurotetanine. Similarly, for peak 28 in positive ionization mode, the molecular formula of ion at m/z 341.16313 was predicted as $C_{20}H_{23}NO_4$. In HPLC-PDA-IT-MS/MS analysis, peak 28 shown a molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 342. In MS/MS, this compound afforded the product ion at m/z 311 $[MH+H-31]^+$ corresponding to the loss of 31 Da from CH_3NH_2 . The observed fragments ions at m/z 296, 280

and 265 are coherent with the consecutive loss of three methyl groups. These data and the elution time suggest that this peak is *N*-methyl-laurotetanine (rogersine) [29,32]. Proposed fragmentation of aporphine alkaloids of *P. boldus* can be observed in the scheme presented in Figure S5.

3.2. Extractability of boldine from *Peumus boldus* leaves with diverse NADES

Once identified the characteristic alkaloids in *Boldo* leaves, their extraction with seven selected NADES was evaluated (**Table 3**). [25–28,37–43]. The efficiency of these NADES was compared with methanol and water. If the literature related to *Boldo* extraction is carefully reviewed, it can be seen that both methanol and ethanol are conventionally used solvents and therefore we selected methanol as the control solvent (Table 4). For example, Rogalisnki and coworkers [44], evaluated the performance of boldine extraction using hot pressurized water and supercritical CO₂ compared with methanol extraction. Also in the work of Fuentes-Barros [7], the extraction of *P. boldus* alkaloids for HPLC analysis was performed with methanol. As in shown in Figure 3b, in the chromatogram obtained with NADES6, boldine appeared at around $t_R = 18$ min. For the quantitative analysis of boldine in the different NADES extracts, we used a UV signal (304 nm) from HPLC-DAD-IT/MS (Figure 3a, b)

Table 3. Composition of the Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) used in the present study.

Code	Component 1 (HBD)	Component 2 (HDA)	Molar Ratio	Water (%)	Ref.
NADES1	Choline chloride	1,2-propanediol	1:3	20%	[25, 37-43]
NADES2	Choline chloride	Glycerol	1:2	20%	[25, 28, 38]
NADES3	Choline chloride	Lactic acid	1:2	20%	[25-28]
NADES4	Choline chloride	Levulinic acid	1:1	20%	[25-28]
NADES5	L-Proline	Citric acid	1:2	20%	[25-28]
NADES6	L-Proline	Oxalic acid	1:1	20%	[25-28]
NADES7	L-Proline	Levulinic acid	1:1	20%	[25-28]

Table 4. Bibliographic data on the efficiency of various methodologies regarding boldine recovery from *P. boldus*.

Extraction method, analysis	Boldine yields	Reference
Ethanolic extract, HPLC	0.14%	[10]
European Pharmacopoeia, HPLC-UV	0.016 to 0.059%	[45]
European Pharmacopoeia, HPLC-UV	0.01 to 0.05%	[46]
European Pharmacopoeia, HPLC-UV	0.06%	[47]
European Pharmacopoeia, UHPLC-MS/MS	0.01 to 0.018%	[7]
UAE (water) 23 W/cm ² , 36°C, 40 min	0,148 %	[48]
MAE (water) 200 W, 7.5% S/L, 56 min	0,122%	[49]
NADES6: Proline-oxalic acid, 340 rpm, 50°C, 50 min, HPLC	0.24%	This work

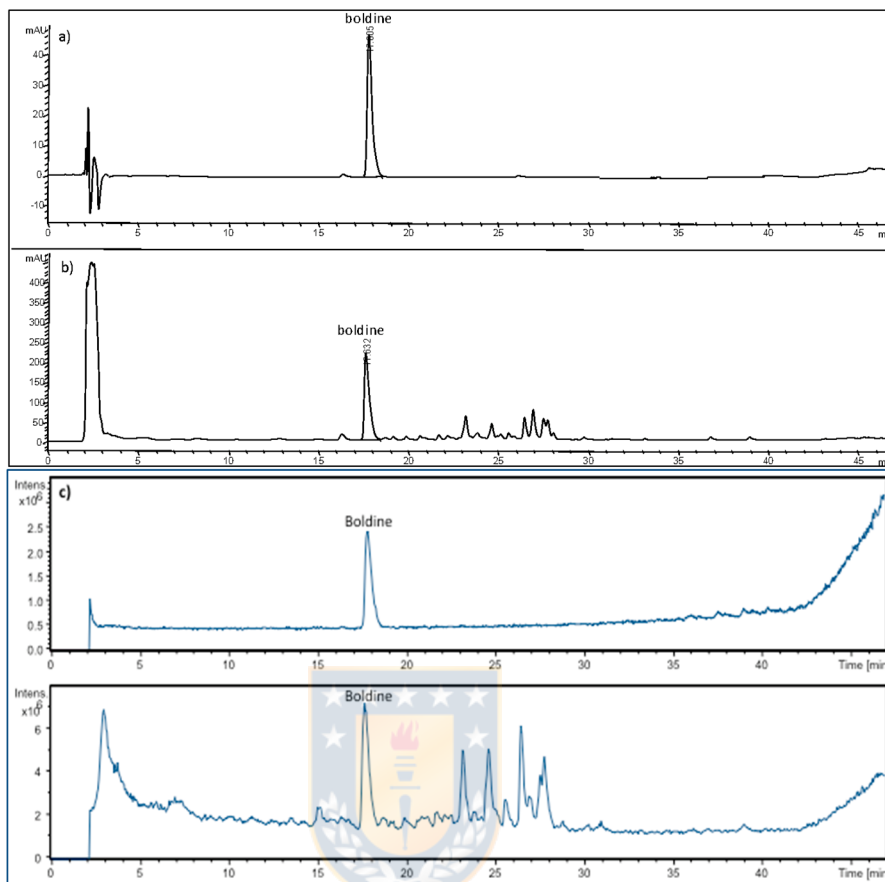


Figure 3. Illustrative HPLC-PDA chromatograms of boldine standard (a) and *Peumus boldus* leaves extracted with NADES6 (b). HPLC-IT/MS chromatograms of boldine standard and *Peumus boldus* leaves extracted with NADES6 (c). HPLC separation was performed in reverse phase under gradient. The trace corresponds to the signals recorded at 304 nm.

So, in **Figure 4** and **5** are illustrated the chromatographic profiles obtained with NADES 1-7 compared with the methanol extract. A prominent peak of boldine ($t_R = 17.8$ min) can be observed for NADES6 in the UV trace (304 nm) and IT-MS detection ($[M+H]^+ = 328.1$).

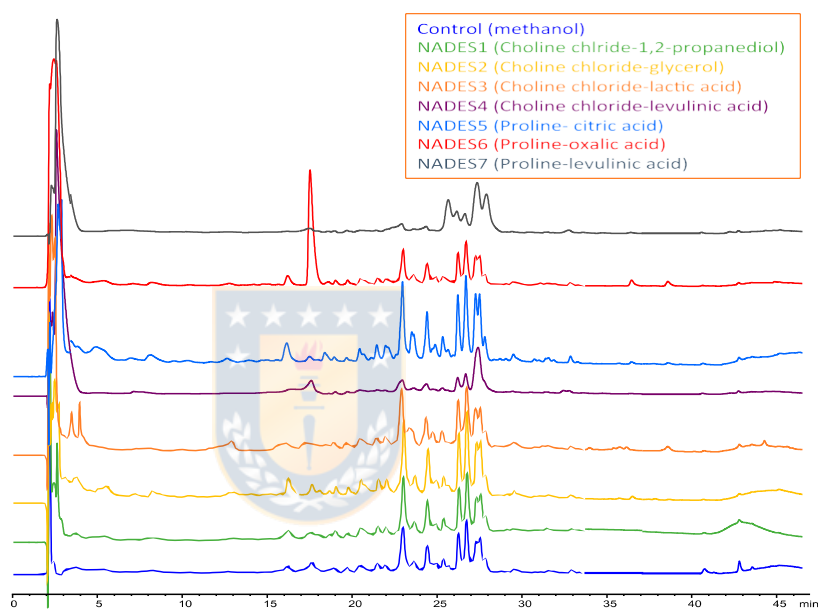


Figure 4. HPLC-PDA chromatograms of the alkaloids from *Peumus boldus* leaves extracted with different NADES solvents. HPLC separation was performed in reverse phase under gradient. The trace corresponds to the signals recorded at 304 nm.

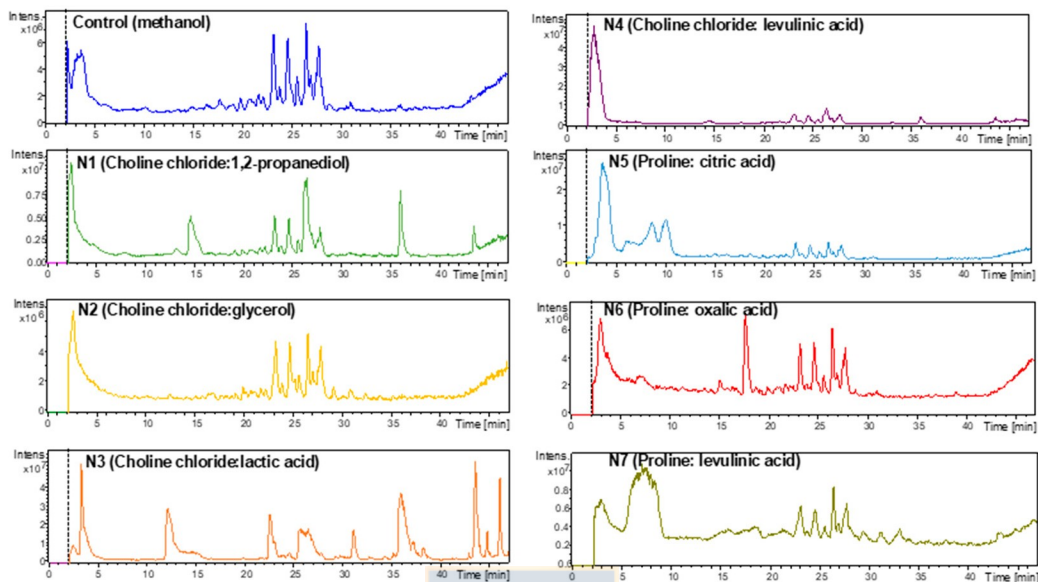


Figure 5. Representative HPLC-ESI-IT-MS chromatograms of the alkaloids from *Peumus boldus* leaves extracted with different NADES solvents. Control solvent (methanol) correspond to the chromatogram depicted in the first frame traced in blue color.

Figure 6 presents the quantitative analysis of boldine, where it is clear that methanol is two-times more efficient than NADES1, NADES2, NADES3, NADES5 and NADES7 (0.1533 mg, 0.1607 mg, 0.1291 mg, 0.1473 mg and 0.1650 mg g⁻¹ dry plant). NADES1 and NADES2 are alcohol-based solvents with polarity quite similar to ethanol [26–28]. Interestingly, we found two NADES that enable better extraction of boldine from *Boldo* leaves. These

solvents were NADES4 (choline chloride-levulinic acid, 1:1) and NADES6 (proline–oxalic acid, 1:1) with 0.4270 mg and 2.3615 mg of boldine per gram of plant, respectively. From these results, it is remarkable that boldine extraction with NADES6 is eight-times more efficient than methanol. Moreover, boldine extraction yields varied greatly depending on the type of HBD used for NADES preparation. For instance, the alcohol based NADES exhibited poor extraction capacity, reaching only 54% alkaloids in comparison with methanol. On the other hand, the extraction efficiencies of carboxylic acid-based such as NADES4 and NADES6 were significantly higher than other NADESs, as well as methanol.

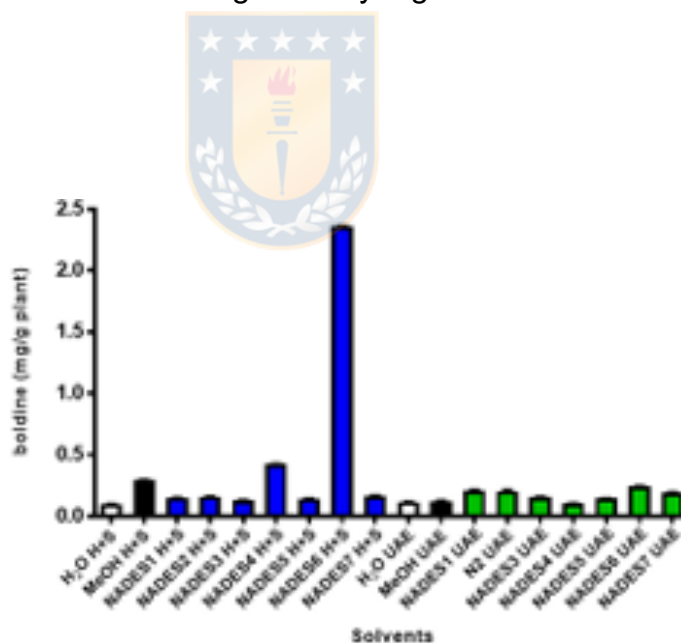


Figure 6. Effect of different NADESs on the extraction of boldine from *Peumus boldus* leaves with using heat + stirring (H+S, blue bars) and ultrasonic assisted extraction (UAE, green bars). In all extraction performed

with NADES 1-7, 20% water was added to reduce viscosity. White and black bars correspond to extraction performed with water and methanol, respectively.

These results are in agreement with the results published by Duan and coworkers [37], for other types of alkaloids such as jatrorrhizine hydrochloride, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride from herb *Berberidis Radix*. The differences observed between NADESs and MeOH can be due to the lack of extractability of partially ionized compounds by MeOH, where electrostatic interactions could significantly contribute to their extraction [38]. Then, when this result is compared with other extraction methods [7,10,45–49], it is observed that the extraction performance for boldine is still more efficient than the other extraction procedures based on conventional solvents (Table 4). This difference can be explained by the variations in the substrate, the extraction procedure or method of analysis. With respect to the extraction process, the difference may be due to the limited selectivity of the adopted method and the resulting contamination of the alkaloid fraction and -at least in part- to the improvements in the solubility of the alkaloids. The latter can be explained by the increase in the solvation of non-polar organic solvents for alkaloids (naturally present as salts in *Boldo* leaves) after pH adjustment of aqueous alcohol solutions in the pretreatment steps. For instance, in acidic conditions, boldine is protonated

and its water solubility is significantly better than in the neutral solvent [26,37].

3.3. Extraction yields of total polyphenols from *Peumus boldus* leaves

In Figure 7, it is observed the results obtained for total content polyphenols (TPC) are expressed as gallic acid equivalents (GAE). The best yield for the extraction of total polyphenols was again obtained with the NADES6 (L-proline: oxalic acid). Interestingly, no significant difference was observed in the results of TPC between heating + stirring extraction ($179.442 \pm 3.79 \text{ mg g}^{-1}$ GAE dw) and UAE extraction ($172.659 \pm 2.55 \text{ mg g}^{-1}$ GAE dw). Moreover, the TPC in extracts obtained with control solvent (methanol) does not show significant differences with NADES6 (one-way ANOVA, $p < 0.05$), suggesting that NADES6 could be used to replace methanol. On the other hand, our results showed that H₂O, NADESs 1-4 and 7 were less suitable for the extraction of polyphenols. Since high viscosity of NADES is one of the main drawbacks for its use, it is worth mentioning that in all the extractions performed in the present study the viscosity was reduced by adding a maximum of 20% of water (Table 3). It has been reported that this strategy does not alter the supramolecular NADES network; on the contrary, it has a dramatic effect by increasing the mass transfer and mobility of the molecules [41,42]. Therefore, the addition of water combined with temperature help to

reduce the strong intermolecular interactions ruled by the H bond network in eutectic solvents [43,50].

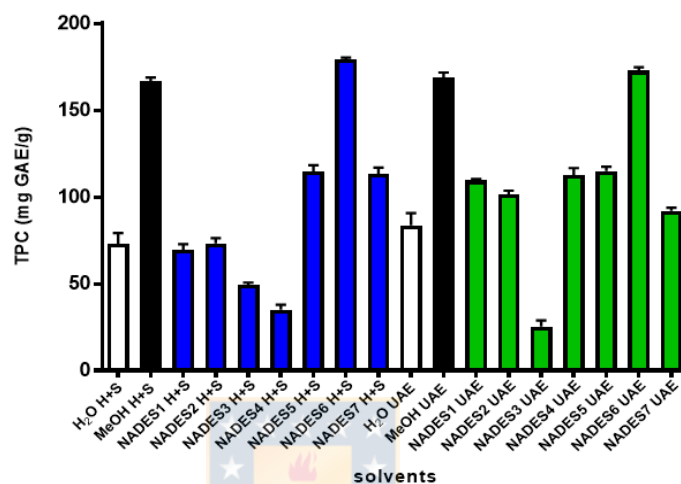


Figure 7. Effect of different NADESs on the extraction of polyphenols from *Peumus boldus* leaves using heat + stirring (H+S, blue bars) and ultrasonic assisted extraction (UAE, green bars). In all extraction performed with NADES 1λ7, 20% water was added to reduce viscosity. White and black bars correspond to extraction performed with water and methanol, respectively.

NADESs prepared with levulinic acid-choline chloride- or 1, 4 butanediol also give good results and could be used too in combination with more exhaustive methods such as ultrasound and microwave-assisted extraction [49–51]. In the case of TPC, NADES6 (H+S and UAE) does not show significant differences when compared with control solvent (methanol) and could be used as a greener

replacement for this solvent (Figure 7). It should be noted that viscosity and negligible volatility of NADES are two properties that constitute a disadvantage compared to traditional solvents (methanol or ethanol). This disadvantage has led to profusely search new eutectic solvents with low viscosity. On the other hand, the volatility of traditional solvents allows their distillation, but in turn it is an environmental problem since they can cause air pollution and cause damage to human health. While it is true, solvents such as water, ethanol or methanol are cheaper and widely used solvents, they have some additional drawbacks. In particular, although they can be as efficient as a NADES, these alcohols have the serious disadvantage of being flammable and in cases where large-scale extraction processes must be scaled, they are considered to be dangerous. Nevertheless, it is clear that there are several points of debate regarding the use of NADES which require attention in the future. For instance, it is necessary to know more about the toxicity and permanence of NADES residues in the environment (degradation) and how these residues could affect living organisms. Furthermore, the use of NADES as bio-compatible solvents require to know if they affect the bioactivity of the bioactive products. The removal or recovery of NADES are points frequently addressed in recent publications. However, several strategies have been proposed. For instance, Liu and coworkers [52] reported the application of counter-current separation (CCS) to recover secondary metabolites from NADES. They also propose use CCS to recycle NADES because it remains intact after CCS and can be

extruded from the column of high-speed counter current chromatography (HSCCC) apparatus. Liquid-Liquid extraction also has been recently proposed by Smink et al. [53]. Other methods such as ultrafiltration, precipitation, solid phase extraction and electro-dialysis have been reported for NADES [54–58].

4. Conclusions

In this work, advanced analytical methods have been used to carry out a thorough characterization of a *P. boldus* extracts. In this report, the identity of main *P. boldus* alkaloids and phenolics compounds was confirmed by HPLC coupled to DAD-IT-MS/MS and Q-ToF HRMS. Finally, from our results, it can be concluded that NADESs are a potential green alternative to conventionally used organic solvents as extraction media to improve the extraction of alkaloids and phenolic compounds. Among the NADESs tested in our study, proline-oxalic acid (1:1) with 20% water was the most promising solvent, attaining higher extraction yields of boldine and TPC from *P. boldus* leaves. Overall, an adequate fine-tuning of HBD/HBA components in a NADES is a powerful strategy that allows us to perform selective extractions of certain molecules with pharmacological interest. This latter, along with its superior extraction efficiency and reduced environmental and lower economic impacts, make NADESs an interesting alternative to organic solvents for the extraction of Boldo bioactive metabolites.

Acknowledgments: J.T. also thanks to the collaboration of the University Castilla-La-Mancha, Ciudad Real, Spain for this help in the instrumentation and structural elucidation of the compounds. These funders played no role in the study design, data collection and analysis, and decision to publish.



References

1. Fernández, J.; Lagos, P.; Rivera, P.; Zamorano-Ponce, E. Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. *Phytother. Res.* 2009, 3, 1024–1027.
2. Looser, G. ¿Cuál es el verdadero nombre botánico del peumo y del boldo? *Rev. Chil. Hist. Nat.* 1935, 39, 203–211.
3. Speisky, H.; Squella, J.A.; Núñez-Vergara, L.J. Activity of boldine on rat ileum. *Planta Med.* 1991, 57, 519–522.
4. Speisky, H.; Cassels, B. Boldo and boldine: An emerging case of natural drug development. *Pharmacol. Res.* 1994, 29, 1–12.
5. O'Brien, P.; Carrasco-Pozo, C.; Speisky, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chem.Biol. Interact.* 2006, 159, 1–17.
6. Simirgiotis, M.J.; Schmeda-Hirschmann, G. Direct identification of phenolic constituents in boldo *Folium* (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 443–449.
7. Fuentes-Barros, G.; Castro-Saavedra, S.; Liberona, L.; Acevedo-Fuentes, W.; Tirapegui, C.; Mattar, C.; Cassels, B. Variation of the alkaloid content of *Peumus boldus* (boldo). *Fitoterapia* 2018, 127, 179–185.
8. Bradley, P.R. *British Herbal Compendium: A Handbook of Scientific Information on Widely Used Plant Drugs*; British Herbal Medicine Association: Bournemouth, UK, 2006; p. 2.
9. EMA-HMPC. Community Herbal Monograph on *Peumus boldus* Molina, *Folium*. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-opinion/opinion_hmpc-european-union-herbalmonograph-peumus-boldus-molina-folium_en.pdf

10. Schmeda-Hirschmann, G.; Rodríguez, J.A.; Theoduloz, C.; Astudillo, S.L.; Feresin, G.E.; Tapia, A. Free-radical Scavengers and Antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free Radic. Res.* 2003, 37, 447–452.
11. Quezada, M.; Asencio, M.; Valle, J.M.; Aguilera, J.M.; Gomez, B. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. *J. Food Sci.* 2004, 69, 371–376.
12. Cermanova, J.; Kadova, Z.; Zagorova, M.; Hroch, M.; Tomsik, P.; Nachtigal, P.; Kudlackova, Z.; Pavek, P.; Dubecka, M.; Ceckova, M.; et al. Boldine enhances bile production in rats via osmotic and Farnesoid X receptor dependent mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2015, 285, 12–22.
13. Gomez, G.; Velarde, V. Boldine Improves Kidney Damage in the Goldblatt 2K1C Model Avoiding the Increase in TGF-B. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1864.
14. Konrath, E.; Santin, K.; Nassif, M.; Latini, A.; Henriques, A.; Salbego, C. Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation in vitro. *Neurotoxicology* 2008, 29, 1136–1140.
15. Schirckel, S.; Bittner, M. La salud en nuestras manos: Plantas medicinales en Chile, Riqueza Natural y Científica, 2nd ed.; Lamas y Cía Ltd.: Concepción, Chile, 2010; p. 238.
16. Soto, C.; Caballero, E.; Pérez, E.; Zúniga, M. Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. *Food Bioprod. Process.* 2013, 92, 328–333.
17. Lu, P.; Sun, H.; Zhang, L.; Hu, H.; Zhang, L.; Zhao, F.; Ge, C.; Yao, M.; Wang, T.; Li, J. Isocorydine targets the drug-resistant cellular side population through PDCD4-related apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Mol. Med.* 2012, 18, 1136–1146.

18. Pastene, E.; Parada, V.; Avello, M.; Ruiz, A.; García, A. Catechin-based Procyanidins from *Peumus boldus* Mol. Aqueous Extract Inhibit Helicobacter pylori Urease and Adherence to Adenocarcinoma Gastric Cells. *Phytother. Res.* 2014, 28, 1637–1645.
19. Abbott, A.P.; Boothby, D.; Capper, G.; Davies, D.L.; Rasheed, R.K. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 9142–9147.
20. Zhang, Q.; De Oliveira Vigier, K.; Royer, S.; Jerome, F. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 7108–7146.
21. Smith, E.L.; Abbott, A.P.; Ryder, K.S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* 2014, 114, 11060–11082.
22. Abidin, Z.; Hamdi, M.; Maan, H.; Adeb, H.; Subramanian, J.N. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Anal. Chim. Acta* 2017, 979, 1–23.
23. Choi, Y.H.; van Spronsen, J.; Dai, Y.; Verberne, M.; Hollmann, F.; Arends, I.W.C.E.; Witkamp, G.J.; Verpoorte, R. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiol.* 2011, 156, 1701–1705.
24. Liu, Y.; Friesen, J.B.; McAlpine, J.B.; Lankin, D.C.; Chen, S.N.; Pauli, G.F. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J. Nat. Prod.* 2018, 81, 679–690.
25. Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G.J.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* 2013, 766, 61–68.

26. Jiang, Z.M.; Wang, L.W.; Gao, Z.; Zhuang, B.; Yin, Q.; Liu, E.H. Green and efficient extraction of different types of bioactive alkaloids using deep eutectic solvents. *Microchem. J.* 2019, 145, 345–353.
27. Takla, S.S.; Shawky, E.; Hammada, H.; Darwish, F. Green techniques in comparison to conventional ones in the extraction of Amaryllidaceae alkaloids: Best solvents selection and parameters optimization. *J. Chromatogr. A* 2018, 1567, 99–110.
28. Shawky, E.; Takla, S.S.; Hammada, H.; Darwish, F. Evaluation of the influence of green extraction solvents on the cytotoxic T activities of *Crinum* (Amaryllidaceae) alkaloid extracts using in-vitro-in-silico approach. *J. Ethnopharmacol.* 2018, 227, 139–149.
29. He, Y.; Cheng, P.; Wang, W.; Yan, S.; Tang, Q.; Liu, D.; Xie, H. Rapid Investigation and Screening of Bioactive Components in Simo Decoction via LC-Q-TOF-MS and UF-HPLC-MD Methods. *Molecules* 2018, 23, 1792.
30. Sharma, B.; Yadav, A.; Dabur, R. Interactions of a medicinal climber *Tinospora cordifolia* with supportive interspecific plants trigger the modulation in its secondary metabolic profiles. *Sci. Rep.* 2019, 9, 14327.
31. Bakiri, A.; Hubert, J.; Reynaud, R.; Lanthony, S.; Harakat, D.; Renault, J.H.; Nuzillard, J.M. Computer-Aided ¹³C NMR Chemical Profiling of Crude Natural Extracts without Fractionation. *J. Nat. Prod.* 2017, 80, 1387–1396
32. Soares, E.R.; da Silva, F.M.; de Almeida, R.A.; de Lima, B.R.; da Silva Filho, F.A.; Barison, A.; Koolen, H.H.; Pinheiro, M.L.B.; de Souza, A.D. Direct infusion ESI-IT-MSn alkaloid profile and isolation of tetrahydroharman and other alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* maas (Annonaceae). *Phytochem. Anal.* 2015, 26, 339–345.
33. Nikolic, D.; Gödecke, T.; Chen, S.N.; White, J.; Lankin, D.; Pauli, G.F.; Van Breemen, R. Mass spectrometric dereplication of nitrogen-containing constituents of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.). *Fitoterapia* 2012, 83, 441–460.

34. Singh, A.; Bajpai, V.; Kumar, S.; Singh, A.K.; Kumar, B. Analysis of isoquinoline alkaloids from *Mahonia leschenaultia* and *Mahonia napaulensis* roots using UHPLC-Orbitrap-MSn and UHPLC-QqQLIT-MS/MS. *J. Pharm. Anal.* 2017, 7, 77–86.
35. Del Mar-Contreras, M.; Noureddine, B.; Gómez-Caravaca, A.; Gálvez, J.; Segura-Carretero, A. Alkaloids Profiling of *Fumaria capreolata* by Analytical Platforms Based on the Hyphenation of Gas Chromatography and Liquid Chromatography with Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Int. J. Anal. Chem.* 2017, 2017, 5178729.
36. De Lima, B.R.; da Silva, F.M.A.; Soares, E.R.; de Almeida, R.A.; da Silva-Filho, F.A.; Barison, A.; Costa, E.V.; Koolen, H.H.F.; de Souza, A.D.L.; Pinheiro, M.L.B. Integrative Approach Based on Leaf Spray Mass Spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for Comprehensive Characterization of Isoquinoline-Derived Alkaloids in Leaves of *Onychopetalum amazonicum* R. E. Fr. *J. Braz. Chem. Soc.* 2020, 31, 79–89.
37. Duan, L.; Dou, L.L.; Guo, L.; Li, P.; Liu, E.H. Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2016, 4, 2405–2411.
38. Bajkacz, S.; Adamek, J. Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta* 2017, 168, 329–335.
39. Katsampa, P.; Valsamedo, E.; Grigorakis, S.; Makris, D. A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box–Behnken experimental design and kinetics. *Ind. Crops Prod.* 2015, 77, 535–543.
40. Ruesgas-Ramón, M.; Figueroa-Espinoza, M.C.; Durand, E. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 3591–3601.
41. González, C.; Mustafa, N.; Wilson, E.; Verpoorte, R.; Choi, Y. Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour Fragr. J.* 2018, 33, 91–96.

42. Savi, L.; Carpiné, D.; Waszczynskyj, N.; Ribani, R.; Haminiuk, C. Influence of temperature, water content and type of organic acid on the formation, stability and properties of functional natural deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilibria* 2019, 488, 40–47.
43. Mulia, K.; Krisanti, E.; Terahadi, F.; Putri, S. Selected Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of α -Mangostin from Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Pericarp. *Int. J. Technol.* **2015**, 6, 1211.
44. Rogalinski, T.; del Valle, J.M.; Zetzi, C.; Brunner, G. Extraction of boldo (*Peumus boldus* Mol.) leaves with hot pressurized water and supercritical CO₂. *Food Res. Int.* **2003**, 38, 203–213.
45. Schwanz, M. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da boldina em *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae) e avaliação preliminar de sua estabilidade. Ph.D. Thesis, University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, April 2006.
46. Espic, M. Evaluación de la producción de biomasa aérea y del rendimiento en aceite esencial y boldina, en boldo (*Peumus boldus* Mol.) en la comuna de Papudo V región. Bachelor's Thesis, Faculty of Forestry Sciences, University of Chile, Santiago, Chile, 2007.
47. Camara, C.I.; Bornancini, C.A.; Cabrera, J.L.; Ortega, M.G.; Yudi, L.M. Quantitative analysis of boldine alkaloid in natural extracts by cyclic voltammetry at a liquid–liquid interface and validation of the method by comparison with high performance liquid chromatography. *Talanta* **2010**, 83, 623–630.
48. Petigny, L.; Périno-Issartier, S.; Wajsman, J.; Chemat, F. Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* Mol.). *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14, 5750–5764.
49. Petigny, L.; Périno, S.; Minuti, M.; Visinoni, F.; Wajsman, J.; Chemat, F. Simultaneous Microwave Extraction and Separation of Volatile and Non-Volatile Organic Compounds of Boldo Leaves. From Lab to Industrial Scale.

Int. J. Mol. Sci. **2014**, *15*, 7183–7198.

50. Gómez, A.V.; Tadini, C.C.; Biswas, A.; Buttrum, M.; Kim, S.; Boddu, V.M.; Cheng, H.N. Microwave-assisted extraction of soluble sugars from banana puree with natural deep eutectic solvents (NADES). *LWT* **2019**, *107*, 79–88

51. Si, Y.Y.; Sun, S.W.; Liu, K.; Liu, Y.; Shi, H.L.; Zhao, K.; Wang, J.; Wang, W. Novel Deep Eutectic Solvent Based on Levulinic Acid and 1,4-Butanediol as an Extraction Media for Bioactive Alkaloid Rutaecarpine. *Processes* **2019**, *7*, 171.

52. Liu, Y.; Garzon, J.; Friesen, J.B.; Zhang, Y.; McAlpine, J.B.; Lankin, D.C.; Chen, S.-N.; Pauli, G.F. Countercurrent assisted quantitative recovery of metabolites from plant-associated natural deep eutectic solvents. *Fitoterapia* **2016**, *112*, 30–37.

53. Smink, D.; Kersten, S.R.A.; Schuur, B. Recovery of lignin from deep eutectic solvents by liquid-liquid extraction. *Sep. Purif. Technol.* **2020**, *235*, 116127.

54. Kim, K.H.; Dutta, T.; Sun, J.; Simmons, N.; Singh, S. Biomass pretreatment using deep eutectic solvents from lignin derived phenols. *Green Chem.* **2018**, *20*, 809–815.

55. Liang, X.; Fu, Y.; Chang, J. Effective separation, recovery and recycling of deep eutectic solvent after biomass fractionation with membrane-based methodology. *Sep. Purif. Technol.* **2019**, *210*, 409–416.

56. Sanap, A.K.; Shankarling, G.S. Eco-Friendly and recyclable media for rapid synthesis of tricyanovinylated aromatics using biocatalyst and deep eutectic solvent. *Catal. Commun.* **2014**, *49*, 58–62.

57. Phadtare, S.B.; Shankarling, G.S. Halogenation reactions in biodegradable solvent: Efficient bromination of substituted 1-aminoanthra-9, 10-quinone in deep eutectic solvent (choline chloride: Urea). *Green Chem.* **2010**, *12*, 458–462.

58. Singh, B.S.; Lobo, H.R.; Pinjari, D.V.; Jarag, K.J.; Pandit, A.B.; Shankarling, G.S. Ultrasound and deep eutectic solvent (DES): A novel blend of techniques for rapid and energy efficient synthesis of oxazoles. *Ultrason. Sonochem.* **2013**, *20*, 287–293.

59. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.

60. Bordiga, M.; Gómez-Alonso, S.; Locatelli, M.; Travaglia, F.; Coisson, J.D.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Arlorio, M. Phenolics characterization and antioxidant activity of six different pigmented *Oryza sativa* L. cultivars grown in Piedmont (Italy). *Food Res. Int.* **2014**, *65*, 282–290.

61. Directive 2002/657/EC. Commission Decision of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results (Notified under Document Number C (2002) 3044); L221/8-36; Official Journal of the European Communities: Brussels, Belgium, 2002.

Supplementary material:

Table S1: HPLC IT-MS and MS/MS data for *P. boldus* phenolics compounds and their proposed structures.

Peak #	t _R (min)	[M-H] ⁺ m/z	MS-MS fragments	λ Max (nm)	Identified compound
1	3.1	579.1	560.9, 453.0, 427.0 , 409.0 , 291.0, 247.0, 163.0	280	procyanidin dimer
2	3.5	579.1	561.1, 453.1, 427.0, 409.0 , 291.0, 246.9	280	procyanidin dimer
3	4.3	290.4	272.0, 244.0, 226.0 , 208.0, 123.0	279	catechin
4	5.1	291.1	273.0, 165.0, 139.0, 123.1	280	epicatechin
5	8.4	579.2	561.0, 525.1, 453.0, 427.0, 409.0 , 332.9, 300.9, 291.0	280	procyanidin dimer
11	19.0	727.2	595.0, 433.0 , 287.0	267, 288, 349	luteolin-pentosyl glucosylrhamnose
12	19.8	611.1	449.0 , 303.0	263, 289 sh, 354	heperidin-7-O-rhamnoglucoside
13	20.6	757.2	625.0, 463.0 , 317.0	263, 290 sh, 354	myricetin-rhamnosyl-glucosyl pentoside
14	20.9	581.1	449.0, 303.0	264, 290, 353	quercetin pentosyl-rhamnoside
16	21.6	595.1	433.0, 287.0	264,291 sh, 352	luteolin 3-O-rutinoside
17	22.1	697.2	565.0, 433.0 , 419.0, 383.0, 353.0, 287.0	264, 292 sh, 348	luteolin dipentosyl rhamnoside
18	23.1	595.1	433.0, 287.0	270, 284, 351	luteolin 7-O-rutinoside
19	23.4	625.2	463.0, 316.9	266, 288 sh, 351	myricetin rhamnosyl-hexose
20	23.8	727.1	595.0, 463.0, 413.0, 317.0	265, 289, 352	quercetin pentosyl di-rhamnoside
22	24.9	771.2	625.0, 463.0, 317.0	264, 290 sh, 349	isorhamnetin rhamnosyl-glucosyl-rhamnoside
23	25.1	286.2	269.0, 237.0, 175.0, 143.0	264, 282 sh, 349	luteolin
24	25.6	595.2	463.0, 317.0	265, 288 sh, 353	myricetin rhamnosyl-pentoside

25	25.8	595.1	463.0, 317.0, 287.0	266, 289 sh, 346	luteolin rhamnosyl-pentoside
26	26.4	579.1	433.0, 287.0	265, 315,344	luteolin-dirhamnoside
29	27.7	609.1	463.0, 317.0	264, 317, 348	myricetin hexoxyl-rhamnose
30	28.0	741.2	609.1, 595.0, 463.0 , 445.0, 317.0	267, 348	kaempferol-3-O-glucosyl-rhamnosyl-rhamnose
31	43.2	595.1	308.9, 286.9	268, 304 sh, 314	kaempferol 3-O-coumaroyl-glucoside

Table S2: HPLC QTOF-MS for the phenolics compounds of *P. boldus* and their proposed structures.

Peak *	t _R	Formula	Mass experimental	Mass Calculated	Error ppm	Identified compound
1	3.1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578.14142	578.14243	1.74	procyanidin dimer
2	3.5 4.3	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ C ₁₅ H ₁₄ O ₆	578.14152 290.07839	578.14273 290.07904	1.21 2.21	procyanidin dimer catechin
4	5.1	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.07839	290.07904	2.24	Epicatechin
13	20.6	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	756.20935	756.21129	2.57	myricetin-rhamnosyl-glucosyl pentoside
17	22.1	C ₃₄ H ₃₂ O ₁₆	696.17072	696.16903	1.68	luteolin dipentosyl rhamnoside
19	23.4	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.16833	624.16903	1.14	myricetin rhamnosyl-hexose
24	25.6	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	594.13636	594.13734	1.67	myricetin rhamnosyl-pentoside
30	28.0	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	740.21449	740.21638	2.55	kaempferol-3-O-glucosyl-rhamnosyl-rhamnose

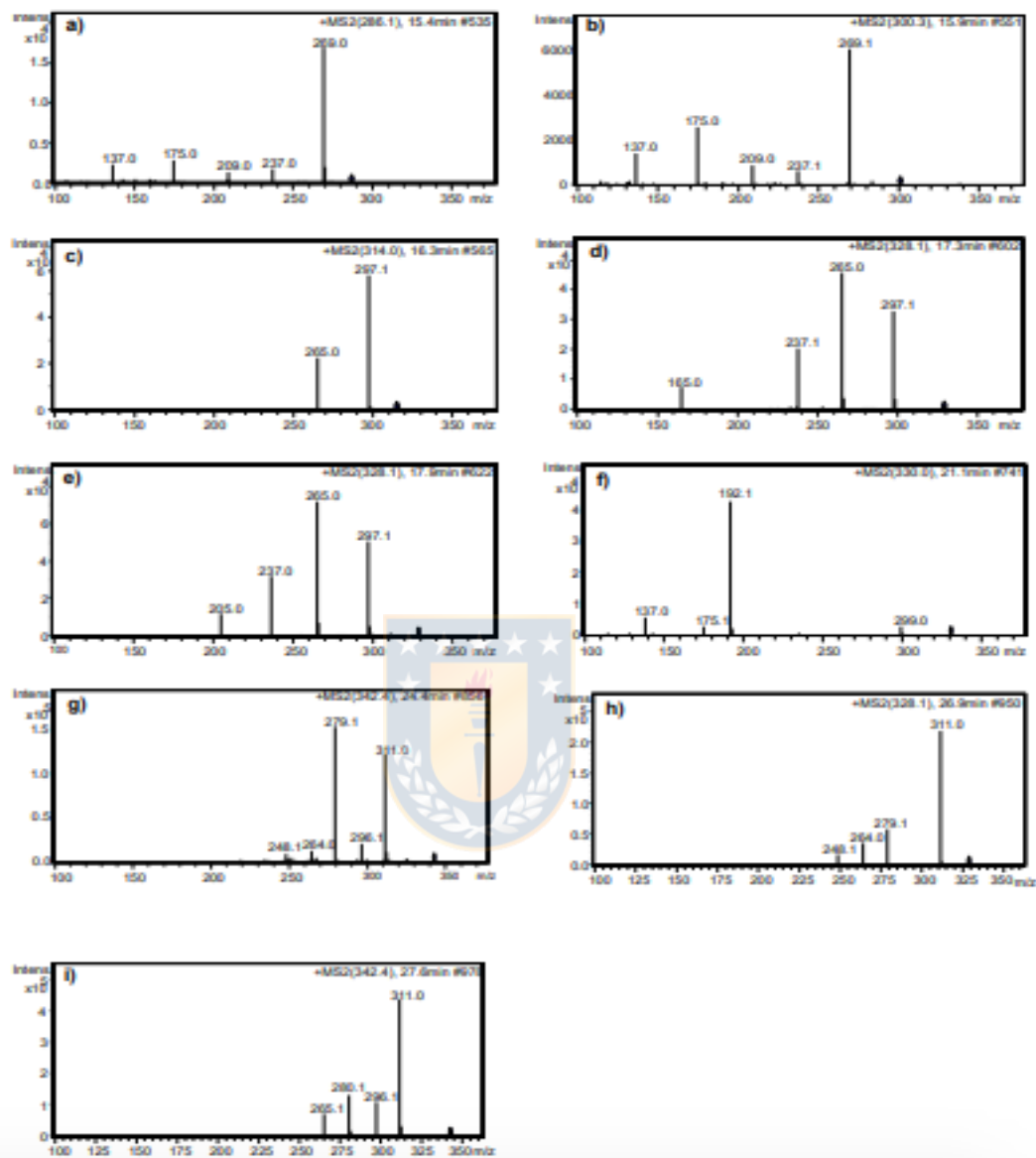


Figure S1: MS-MS spectra of *P. boldus* alkaloids. The spectra correspond to: (a) coclaurine, (b) *N*-methylcoclaurine, (c) lauroilsine, (d) isoboldine, (e) boldine, (f) reticuline, (g) isocoridine, (h) laurotetanine (i) *N*-methyllaurotetanine,

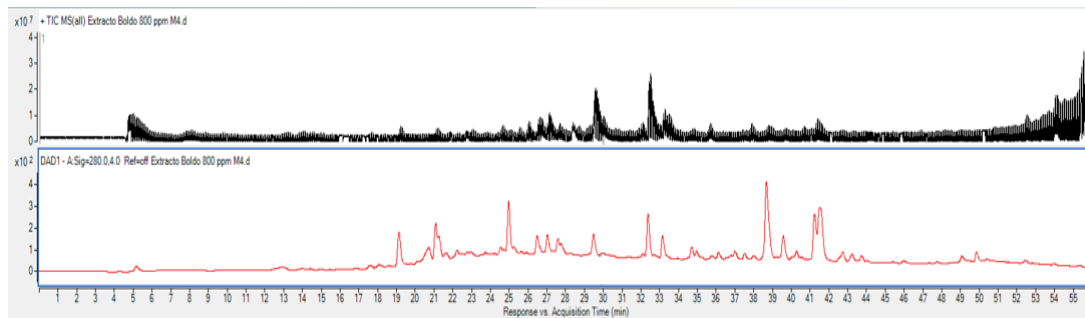


Figure S2: HPLC-PDA-QTOF-MS of *P. boldus*. UV trace is at 280 nm.

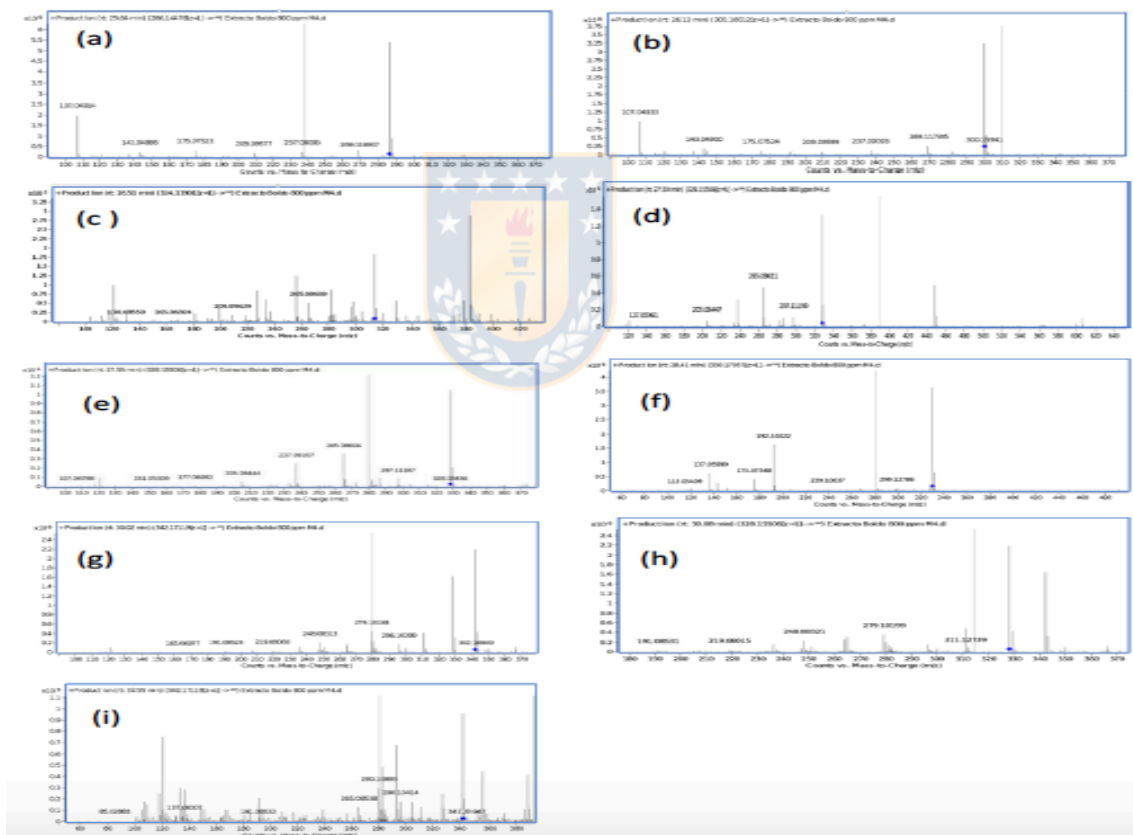


Figure S3: QTOF MS/MS spectra of *P. boldus* alkaloids. The spectra correspond to: (a) coclaurine, (b) *N*-methylcoclaurine, (c) laurolitsine, (d)

isoboldine, (e) boldine, (f) reticuline, (g) isocoridine, (h) laurotetanine (i) *N*-methyllaurotetanine.

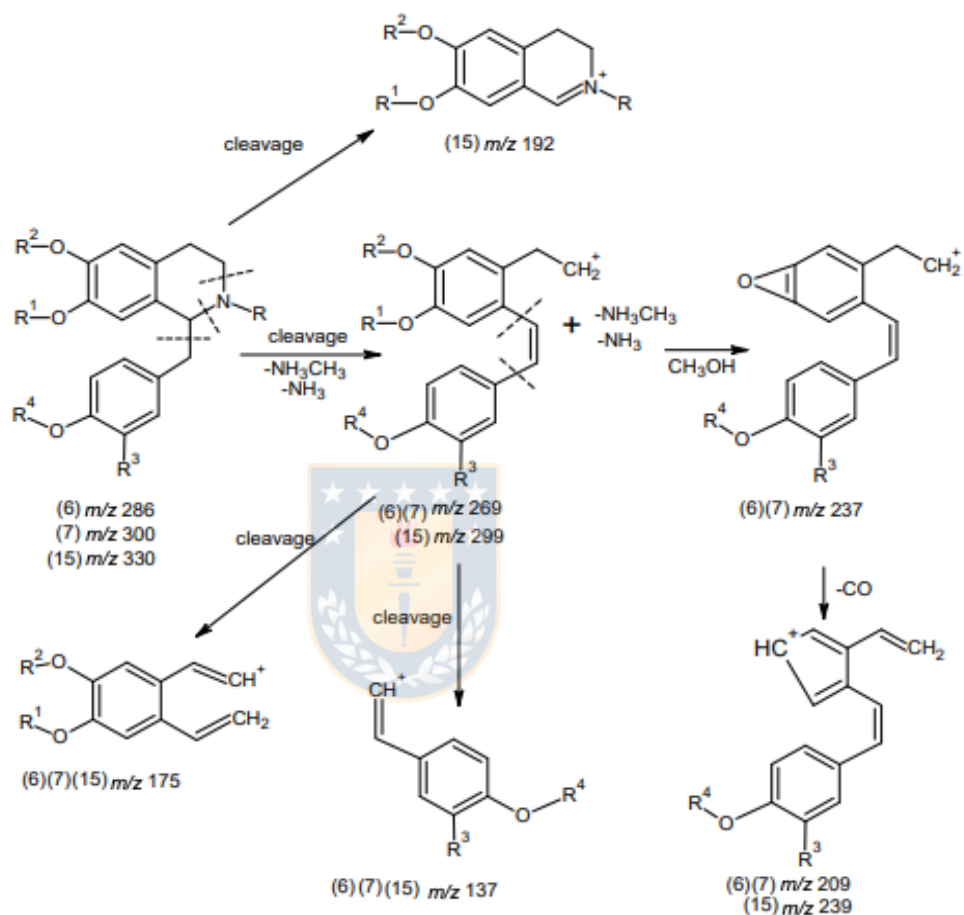


Figure S4. General scheme of fragmentation for isoquinoline alkaloids identified in *P. boldus*. Numbers between round brackets correspond to the alkaloids listed in Table 1 and 2 in the main manuscript.

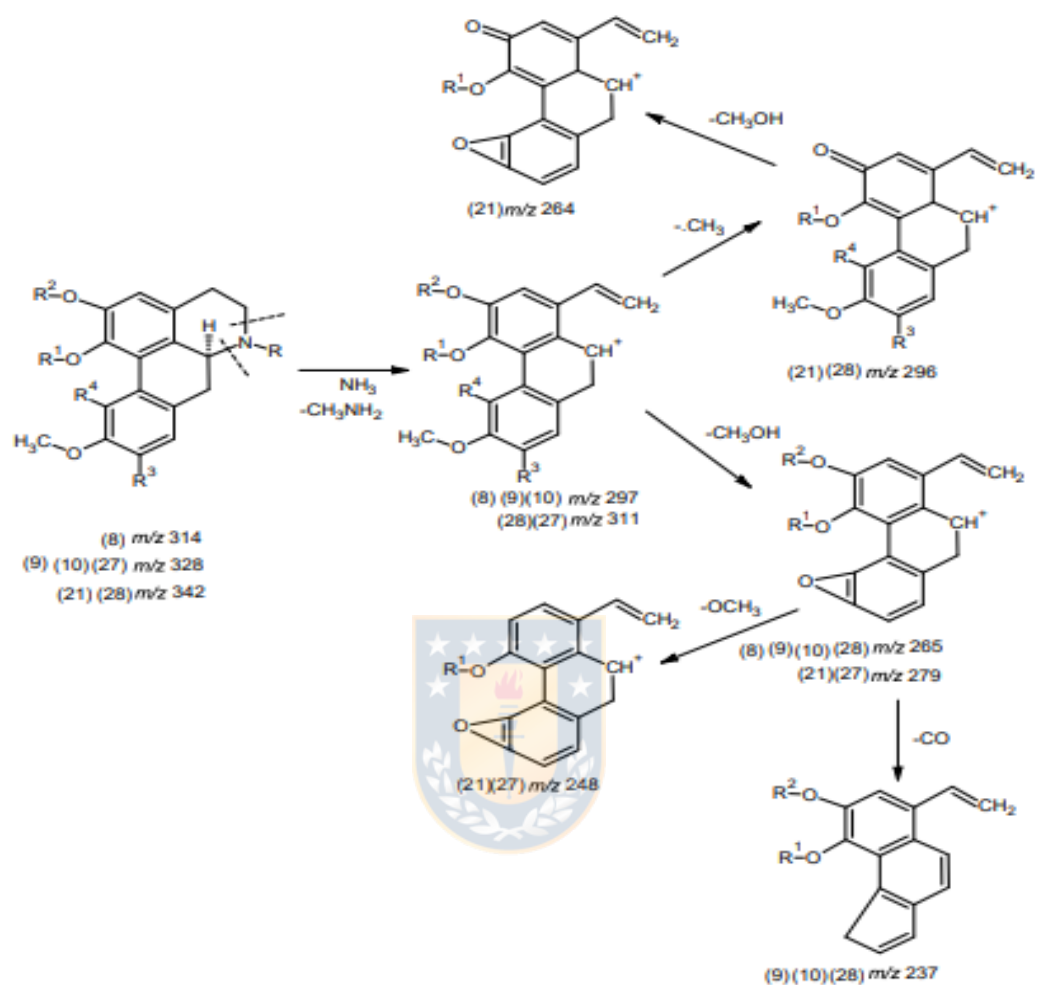


Figure S5. General scheme of fragmentation for aporphine alkaloids identified in *P. boldus*. Numbers between round brackets correspond to the alkaloids listed in Table 1 and 2 in the main manuscript.

Capítulo 3: Sección 2

Título:

Evaluación de diferentes actividades farmacológicas de los extractos de *Peumus boldus* utilizando la estrategia de sustracción química.

Resumen:

La cromatografía de partición centrífuga en el modo refinamiento de zona de pH, es una técnica preparativa que permitió separar los alcaloides y los polifenoles de un extracto total de boldo obtenido mediante extracción soxhlet. Se obtuvo 2 fracciones, la primera corresponde al extracto knock-out (alcaloides), un total de 8 alcaloides fueron identificados y separados del extracto total, en donde había 9, solo 1 (reticulina), no fue aislado. Y la segunda fracción corresponde al extracto *knock-out* de alcaloides (polifenoles), en donde se identificaron tentativamente 22 compuestos polifenólicos, y algunos alcaloides como reticulina fueron detectados pero en concentraciones bajo el límite de detección. Para estos extractos se probó diferentes actividades biológicas. En cuanto a la citotoxicidad en células AGS y el ensayo del cometa con linfocitos, para ambos el extracto *knock-out* (sólo alcaloides) fue moderadamente citotóxico y genotóxico a concentraciones mayores o igual a 0.672 mg/mL y 0,280 mg/mL respectivamente. Por otro,

lado los polifenoles del boldo (*knock-out* de alcaloides) mostraron que protegen las células AGS hasta una concentración de 1.96 mg/mL, así como también no producen un daño en el ADN. Lo anterior se debería a su alto poder antioxidante.

1. Materiales y métodos

1.1 Reactivos y solventes

Acetonitrilo, metanol, ácido fórmico, formiato de amonio, y metanol, fueron de grado HPLC y n-propanol, acetato de etilo, n-heptano, etanol de grado analítico fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). El agua ultrapura fue producida por un dispositivo Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.). El estándar analítico de Boldina (> 99%), agarosa, PBS, cloruro de sodio, EDTA, trietilamina, ácido acético, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-carboxílico (Trolox), y el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), tritón, sal de fluoresceína sódica, hidrobromuro de galantamina, Histopaque -1119, Histopaque -1077 fueron proporcionados por Sigma (St. Louis, MO, USA.). El suero fetal bovino (FBS, Corning), resazurina, células AGS, fueron donados por el Dr. Edgar Pastene.

Los linfocitos se extrajeron de la siguiente manera: se agregó 3 ml de HISTOPAQUE -1119 a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml. Con cuidado se superpuso 3 ml de HISTOPAQUE -1077, sobre el HISTOPAQUE -1119. Cuidadosamente se superpuso 6 ml de sangre completa en el gradiente

superior del tubo del paso 2. Se centrifugó a 700 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se retiraron los tubos de la centrífuga. Se observaron dos capas opacas distintas. (capas A y B). Luego se aspiró y desechó el líquido dentro de 3 mm de la capa A. Se transfieren las células de esta capa a un tubo cónico limpio de 15 ml. Se vuelve a aspirar y se desecha el líquido dentro de los 3 mm de la capa B. Se transfieren las células de esta capa a un tubo cónico limpio de 15 ml. Luego se lavan las células agregando 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a los tubos y finalmente se centrifuga a 200 x g durante 10 minutos, se retira y se desecha el sobrenadante y se tienen los linfocitos. (Boyum and Scand 1968)



1.2 Material vegetal

El material vegetal utilizado en éste estudio consistió en las hojas de *Peumus boldus* (*boldo*), las hojas fueron secadas acorde a la metodología descrita en el capítulo 3 en el numeral 2.3 de la sección 1.

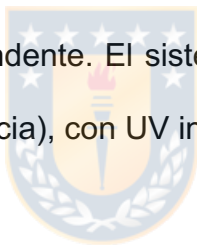
1.3. Extracción del material vegetal.

La extracción del material vegetal se llevó a cabo utilizando un sistema Soxhlet. En resumen, se pesaron 25.008 g del material pulverizado y se usó metanol puro como solvente. El proceso se llevó a cabo hasta que se produjo

el agotamiento del material vegetal (16 h). Luego, el metanol se eliminó a presión reducida ($> 40^{\circ} \text{C}$) hasta sequedad, luego se liofilizó y se obtuvo 6,2911 g, que es equivalente a un rendimiento del 25,16%.

1.4. Aparato de CPC

Se utilizó un cromatógrafo de partición centrífugo Bio-Extractor Spot-CPC-250-B (Armen, Francia) con un volumen total de 250 ml. Este sistema tiene válvulas de conmutación de cuatro vías que permiten la operación en los modos descendente o ascendente. El sistema CPC se conectó a un sistema SPOT.PREP II (Armen, Francia), con UV integrado y colector de fracciones.



1.4.1. Refinamiento de la zona de pH usando CPC (pHZR CPC)

En el procedimiento de separación mediante el refinamiento de la zona de pH, se usó el sistema de disolvente de dos fases compuesto por: n-heptano: acetato de etilo: n-propanol: agua (1: 3: 1: 3 v / v). La fase superior (que contiene TEA 15 mM) se usó como la fase estacionaria, mientras que la fase inferior (ácido acético glacial y ácido fórmico 100% en cantidad suficiente para alcanzar una concentración final de 3 mM cada uno) se usó como la fase móvil. La solución de muestra se preparó disolviendo 500 mg de extracto de boldo de soxhlet liofilizado, el que se pesó en un tubo Falcón y se añadieron

10 ml de las fases, es decir, 5 ml de la fase superior o estacionaria y 5 ml de la fase inferior o móvil. Luego se agitó vigorosamente hasta que la muestra se disolvió por completo. El rotor de CPC se llenó primero con 1,5 volúmenes de columna usando la fase superior con un flujo de 30 ml/min y rotación de 500 rpm. La fase móvil se bombeó al sistema en modo descendente a flujo de 9 ml/min, mientras que la rotación fue de 2000 rpm. Luego, la muestra preparada anteriormente se inyectó a través de la válvula de inyección. En la siguiente etapa de elución, el aparato CPC se hizo rotar a 2000 rpm y con un caudal de 12 ml/min se mantuvo durante 60 min. Finalmente, para la extrusión la rotación se redujo a 1200 rpm y el flujo se aumentó a 30 ml / min, utilizando la fase superior para recuperar todos los productos del extracto retenidos en el equipo. Las fracciones recogidas en tubos de 25 ml de capacidad se monitorizaron a través de su espectro de absorción, cuyas longitudes de onda fueron $\lambda = 280, 308$ y 360 nm Cromatógrafo de líquidos Armen Glider spot prep II, 56890 Saint-Avé, Francia). Las fracciones eluidas se evaporaron a presión reducida por debajo de 40°C , y luego se secaron por congelación y se almacenaron a -20°C .

1.4.2. Determinación del coeficiente de partición (Kd)

La determinación del coeficiente de partición (Kd) se llevó a cabo disolviendo 5 mg de extracto e una mezcla de 5 mL de la fase superior sin TEA y 5 ml de

la fase inferior sin ácidos y equilibrada previamente. La mezcla se agitó en un embudo de decantación y una vez separadas se llevaron a sequedad. Para determinar la K_{acid} y K_{basic} se realizó el mismo procedimiento y además se agregó a la fase superior orgánica el agente retenedor trietilamina (TEA), cantidad suficiente para llegar a una concentración final de 15 mM y a la fase acuosa inferior se le agrega los desplazadores, ácido acético glacial y ácido fórmico 100% en cantidad suficiente para llegar a una concentración final de 3 mM de cada uno. El valor de KD fue calculado como el área del pico del compuesto en la fase inferior dividido entre el área del pico en la fase superior.



1.5. Análisis e identificación de las fracciones

Las fracciones de *P. boldus* fueron analizadas por HPLC-DAD-IT-MS y por HPLC-Q-TOF, metodología descrita en el capítulo 3 en el numeral 3.5. de la sección 1.

1.6. Preparación de los extractos diseño (*knock-out*)

Se preparó una solución de los 3 extractos de diseño liofilizados (total, alcaloides y fracción de “polifenoles” sin alcaloides. Para esto, se tomaron 35.2, 5,6 y 39.3 mg de cada extracto, respectivamente, y se solubilizaron en

DMSO al 1% preparado con PBS al 1% para obtener una concentración de 3520, 1120 y 3930 mg/L, respectivamente. Los extractos se sonicaron durante 15 min. Posteriormente, las soluciones de extracto se filtraron en condiciones estériles con un filtro de 0.2 μ m para pruebas celulares y capacidad antioxidante. Las soluciones se almacenaron a -20°C hasta su uso.

1.7. Ensayos biológicos

1.7.1. Ensayo de citotoxicidad con resazurina

Las células AGS se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS), una mezcla de antibióticos de 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. El cultivo se mantuvo a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez que se alcanzó la confluencia, las células se tripsinizaron con tripsina-EDTA 1X durante 5 minutos, a 37°C, obteniendo una suspensión celular que se contó en la cámara de Neubauer por el método de exclusión de azul de tripano.

Las células AGS se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 20,000 células por pocillo con medio DMEM suplementado. Las células se incubaron a 37 ° C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron las diferentes concentraciones de los extractos de diseño en medio DMEM suplementado, para este propósito se realizó una dilución en serie de las concentraciones preparadas. Las células

fueron incubadas con las diferentes concentraciones de los extractos de diseño durante 6 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después se añadió resazurina al 1% v/v un volumen de 10 uL y se incubó durante 1 hora. Luego del tiempo de incubación, las placas se leyeron a una longitud de onda de excitación de 570 nm y emisión de 600 nm en un lector TECAN.

1.7.2. Ensayo del cometa

Se realizó un ensayo de cometa similar a estudios anteriores (Salas 2014). Los linfocitos se trataron con diferentes concentraciones de extracto durante 2 h, y la viabilidad celular > 75%, H₂O₂ (500 µg/ml) y DMSO (0,5%) se usaron como controles positivos y negativos, respectivamente. Las células se incrustaron en una agarosa de bajo peso molecular (LMP) y se fijaron en los portaobjetos. Para la lisis de las membranas celulares, los portaobjetos se colocaron en cubetas con solución de lisis por 1 h a 4°C, protegidos de la luz (cubeta envuelta en papel aluminio). Transcurrido el tiempo los portaobjetos se sumergen en la cámara de electroforesis con una solución alcalina muy fría para producir la desnaturalización del ADN. A continuación se procede a realizar la electroforesis en condiciones alcalinas (pH 13), durante 20 minutos a 25 V y 300 mA (el ADN migrará hacia polo positivo). Los portaobjetos se retiran cuidadosamente de la cubeta y se sumergen brevemente en tampón de neutralización (0,4 mM Tris-HCl a pH 7.5). Las preparaciones deben ser

guardadas en cajas oscuras evitando luz directa y a temperatura ambiente. Para la visualización de las células se tiñeron agregando 20 μL de solución de yoduro de propidio (1mg/mL) sobre cada una de las preparaciones, y se cubren con cubreobjetos. La visualización se realiza utilizando un microscopio de fluorescencia, equipado con filtro de excitación de 488 nm dando una coloración roja-anaranjada. Se analizaron al menos 100 células seleccionadas al azar para cada grupo, por triplicad. Para cuantificar el daño del ADN, se calculó el porcentaje de ADN de la cola utilizando un sistema de análisis de imágenes CASP (CaspLab, Polonia).



1.7.3. Actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad enzimática de la acetilcolinesterasa se midió utilizando el método descrito por Ellman et al. (1961), con algunas modificaciones. Se miden 50 μL de muestra preparada en metanol y buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.0 (1:1) y se agregan en una microplaca de 96 pocillos y se diluyó en serie veces. Posteriormente se agrega 50 μL de acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* 0.4 U/ml disuelta en albumina de suero bovino 0.1 %, la mezcla se agitó e incubó por 30 minutos a 37°C. Luego se adicionó 100 μL de sustrato preparado de la siguiente forma: 4 mg de DNTB y 3.4 mg de ATCl (que es?, incluir en reactivos) se disolvieron en 50 ml de tampon Tris-HCl con 0.1 M NaCl y 0.02 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La placa se incubó por 15 minutos y se realizó la

lectura a 405 nm. El hidrobromuro de galantamina se usó como control positivo.

1.8. Determinación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se midió mediante el método DPPH y ORAC, cuyas metodologías corresponden a los trabajos de Brand et al.,1994 y Ou et al., 2013 con algunas modificaciones, las que están descritas en el capítulo 2 numeral 1.8 de la sección 2. Los resultados presentados son la media de 3 repeticiones.



1.9. Análisis estadístico

La comparación estadística se realizó con GraphPad Prism 5. (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

2- Resultados y discussion

2.1. Selección del sistema de solventes

Para llegar al sistema de fases adecuado primero se realizaron varias pruebas de otros sistemas de solventes utilizados para separar alcaloides que fueran similares, ya que para este tipo de alcaloides en la bibliografía no hay reportes para separar por medio de refinamiento de zona de pH. Se utilizó un

sistema de fases propuesto por Feng et al 2015, cuyo sistema de fases hexano: acetate de etilo: MeOH: agua (3:7:1:9, v/v/v/v) en modo descendente y uso como desplazadores TEA 20 mM en la fase superior y HCl 3mM en la fase inferior, sin embargo, con este sistema de fases, los alcaloides eluyen junto a los polifenoles. Esto es debido a que el ácido desplazante es muy fuerte. También se probó con un sistema de fases compuesto por metil tert-butil éter, acetonitrilo y agua (4:1:5 v/v/v) (la fase acuosa inferior se acidificó), que implementaron Renault y colaboradores, pero tampoco se obtuvieron buenos resultados. Finalmente se probó otra fase utilizada previamente por Toribio et al., 2007, en donde utilizó n-heptano: acetato de etilo: n-propanol: agua y cuyas proporciones fueron (1:3:1:3 v/v/v/v), además se agregó trietilamina (TEA) a la fase superior y los ácidos acético y fórmico en la fase inferior. En la tabla 1 se observan las concentraciones que fueron probadas para llegar al sistema de fase adecuada.

Tabla 1. Experimentos de refinamiento de zona de pH 1 al 3, sistema de solventes usando n-heptano: acetato de etilo: n-propanol y agua (1: 3: 1: 3 v/v/v/v) con diferentes concentraciones de retenedor y desplazante.

Experimento	Concentración (mM) Del Retenedor (TEA)	Concentración del desplazante
1	10	10 mM ácido fórmico
2	15	5 mM ácido fórmico + 5 mM ácido acético
3	15	3 mM ácido fórmico + 3 mM ácido acético

Finalmente cada fase de los sistemas se analizó por HPLC para calcular los coeficientes de partición de los compuestos principales (boldina) y así estudiar el comportamiento de los compuestos en el sistema bifásico en condiciones ácidas y básicas, de esta manera se eligió el experimento tres (tabla 1), los valores obtenidos para éste experimento se observan en la tabla 2, este sistema es adecuado para la separación ya que de acuerdo con Ito (Ito & Ma, 1996) un sistema bifásico adecuado para la separación en refinamiento de zona de pH es en el que en condiciones ácidas la $K_{acid} \gg 1$ y en condiciones básicas la $K_{basic} \ll 1$.

Tabla 2. Coeficiente de partición para el alcaloide

	Boldina
K_D	2,7
K_{acid}	30,1
K_{base}	0,43

De esta forma el sistema de solventes utilizado fue n-heptano: acetato de etilo: n-propanol y agua (1: 3: 1: 3 v/v/v/v) con concentración 15 nm para el retenedor TEA y para el desplazante 3 mM para ácido fórmico y ácido acético.



2.2. Fraccionamiento del extracto de metanol de *P. boldus* por pHZR CPC

La técnica de refinamiento de zona de pH se basa en el desplazamiento de moléculas con diferencia de solubilidad de la forma ionizada y neutra. Los sistemas de disolventes bifásicos requieren fases con polaridades muy diferentes y generalmente se observa la formación de picos rectangulares con alta concentración de analito en la zona central (Ito & Ma, 1996). La separación se realizó en modo descendente, manteniendo velocidades de rotación relativamente altas y un caudal de velocidad media. Se obtuvieron 2 peaks que se observan en la Figura 1, donde al estar en condiciones

descendentes el pH inicial es alcalino (aproximadamente 10), allí la fracción correspondiente a la eliminación de alcaloides (polifenoles) se recogió y se neutralizó rápidamente una vez que terminó de eluir (5 minutos) para evitar la degradación y oxidación de éstos. Luego, el pH fue disminuyendo a medida que los alcaloides eluían hasta alcanzar un pH cercano a 2, momento en el cual éstos dejan de acumularse (30 min).

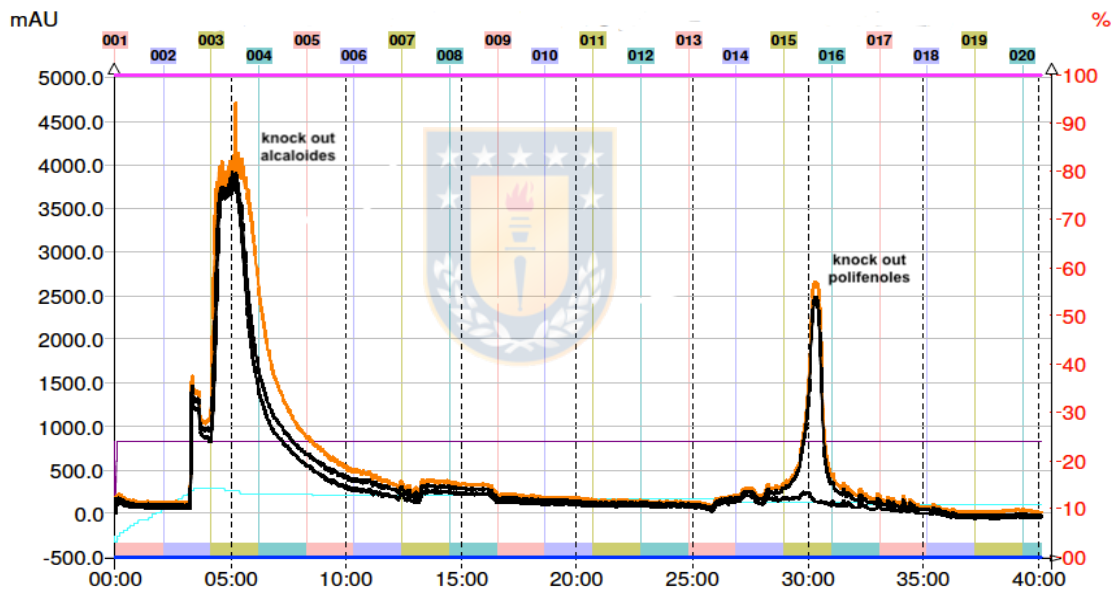


Figura 1. Registro de un refinamiento de zona de pH obtenido desde CPC, de la separación del extracto metanólico de *Peumus boldus*, cuyo peak a los 5 minutos corresponde al extracto knock-out alcaloides (solo con polifenoles) y alrededor de los 30 minutos al extracto knock-out polifenoles (alcaloides)

2.3. Análisis e identificación de las fracciones por HPLC-DAD-IT-MS/MS y HPLC-DAD-QTOF

Mediante refinamiento de zona de pH se obtuvo dos fracciones: la primera fracción correspondiente a los tubos 3 al 7 en donde estaban presentes los polifenoles se denomina *knock-out* de alcaloides (ver figura 3 y tabla 1S) y segunda fracción que corresponde a los tubos 15 al 17 posee los alcaloides del boldo y se denomina *knock-out* de polifenoles (ver figura 4 y tabla 4). Se puede observar un peak prominente que corresponde a la boldina. Esta es primera vez que se hace este tipo de separación para esta planta, en donde se pudo separar los alcaloides de los polifenoles, si bien antes ya se había utilizado la cromatografía en contracorriente para separar alcaloides, la diferencia radica en que aquí se utilizó un extracto crudo o total (figura 1) es decir, no se separaron los alcaloides previamente.

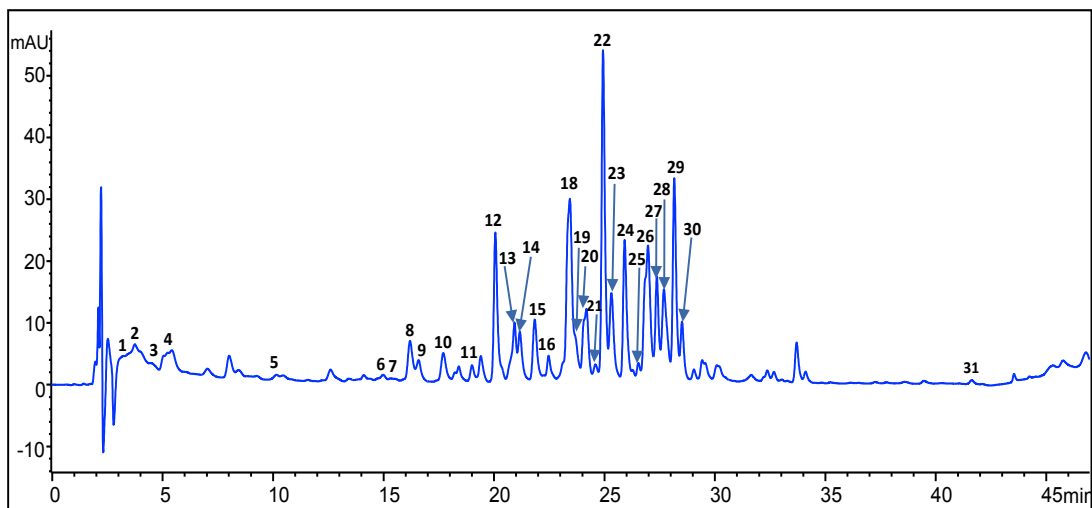


Figura 2. Cromatograma UV, en el extracto total de metanol (650 ppm) de *P. boldus* usando un HPLC-DAD-IT-MS obtenido a 304 nm.

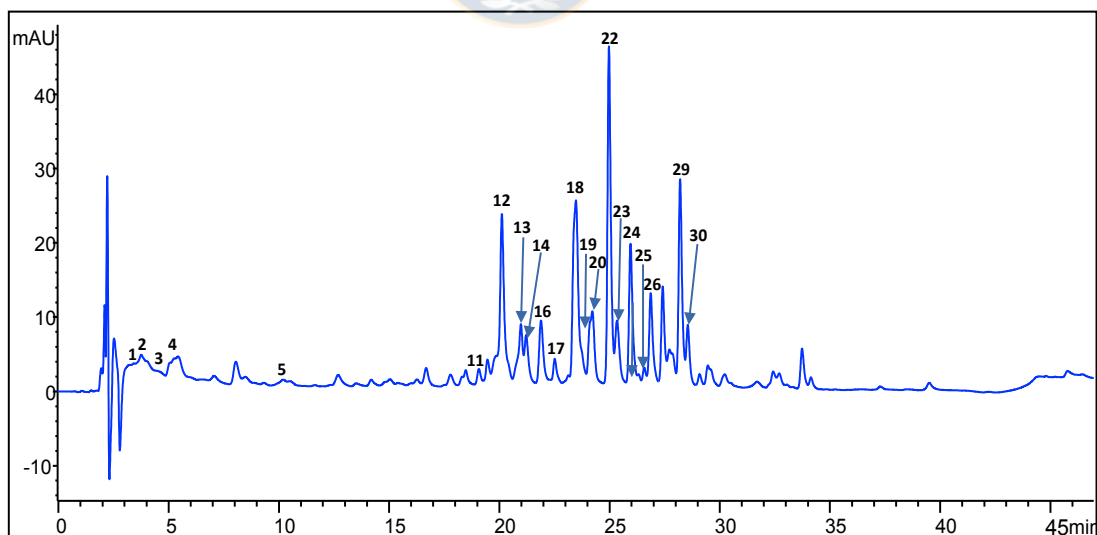


Figura 3. Cromatograma UV del extracto *knock-out* alcaloides (polifenoles) de 700 ppm de *P. boldus* usando un HPLC-DAD-IT-MS obtenido a 304 nm.

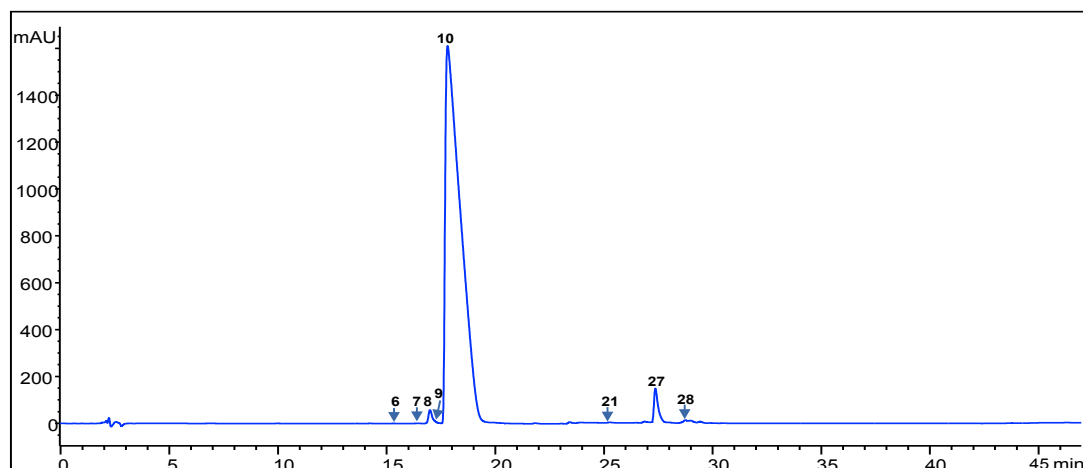


Figura 4. Cromatograma UV del extracto de *knock-out* polifenoles de 700 ppm de *P. boldus* usando un HPLC-DAD-IT-MS obtenido a 304 nm.

Table 3. Alcaloides identificados en el extracto *knock-out* polifenoles (alcaloides) mediante HPLC QTOF-MS/MS modo de ionización positivo.

Peak*	Formula	Mass Experimental	Mass Calculated	Error ppm	[M+H] ⁺ m/z	Identified compound
6	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285.13621	285.13649	0.99	286.14349	Coclaurina
7	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299.152189	299.15214	0.85	300.15937	N-methylcoclaurina
8	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313.13016	313.13141	3.97	314.13859	Laurolitsina
9	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.14701	327.14706	0.16	328.15444	Isoboldina
10	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.14606	327.14706	3.04	328.15445	Boldina
21	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	341.16259	341.16271	0.34	342.17014	Isocorydina
27	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.14692	327.14706	0.44	328.13587	Laurotetanina
28	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	341.16240	341.16271	0.89	342.17048	N-Methyl-laurotetanina

2.4. Ensayos biológicos:

2.4.1. Ensayo de citotoxicidad

Los resultados de los extractos diseñados se pueden observar en la figura 5, en donde el extracto de knock-out polifenoles (alcaloides) de *P. boldus* (Fig. 5A) redujo la viabilidad celular en más del 50% a una concentración de 0.672 mg/mL, así también han reportado otros autores como Falé et al 2012., para las células HeLa, una concentración de extracto de decocción de *P. boldus* de 0.66 mg/mL fue capaz de reducir la viabilidad celular en un 50%. Los valores de alrededor de 0.1 mg de extracto/mL se consideran tóxicos (Oonsivilai et al., 2008), pero el efecto depende en gran medida de las células utilizadas (Cárdenas et al., 2006). Esta toxicidad detectada puede atribuirse a la presencia de boldina, ya que es el compuesto que está en mayor proporción en el extracto de alcaloides obtenido en esta tesis. La toxicidad de boldina es conocida (Stévigny et al., 2005), aunque no se puede descartar que el resto de los alcaloides contribuyan en este aspecto. Lo anterior, se pudo comprobar al utilizar un estándar de boldina, lo que se puede observar en la figura 5B.

Por otro lado, el extracto *knock-out* alcaloides (polifenoles) tiene efectos citoprotectores. Este extracto no causa una disminución apreciable en la viabilidad celular (AGS) hasta una concentración de 1.96 mg/ml (Fig. 5C).

Finalmente, el extracto total mostró que a una concentración de 1.98 mg/mL disminuye la viabilidad celular en un 50%. (Fig.5D)

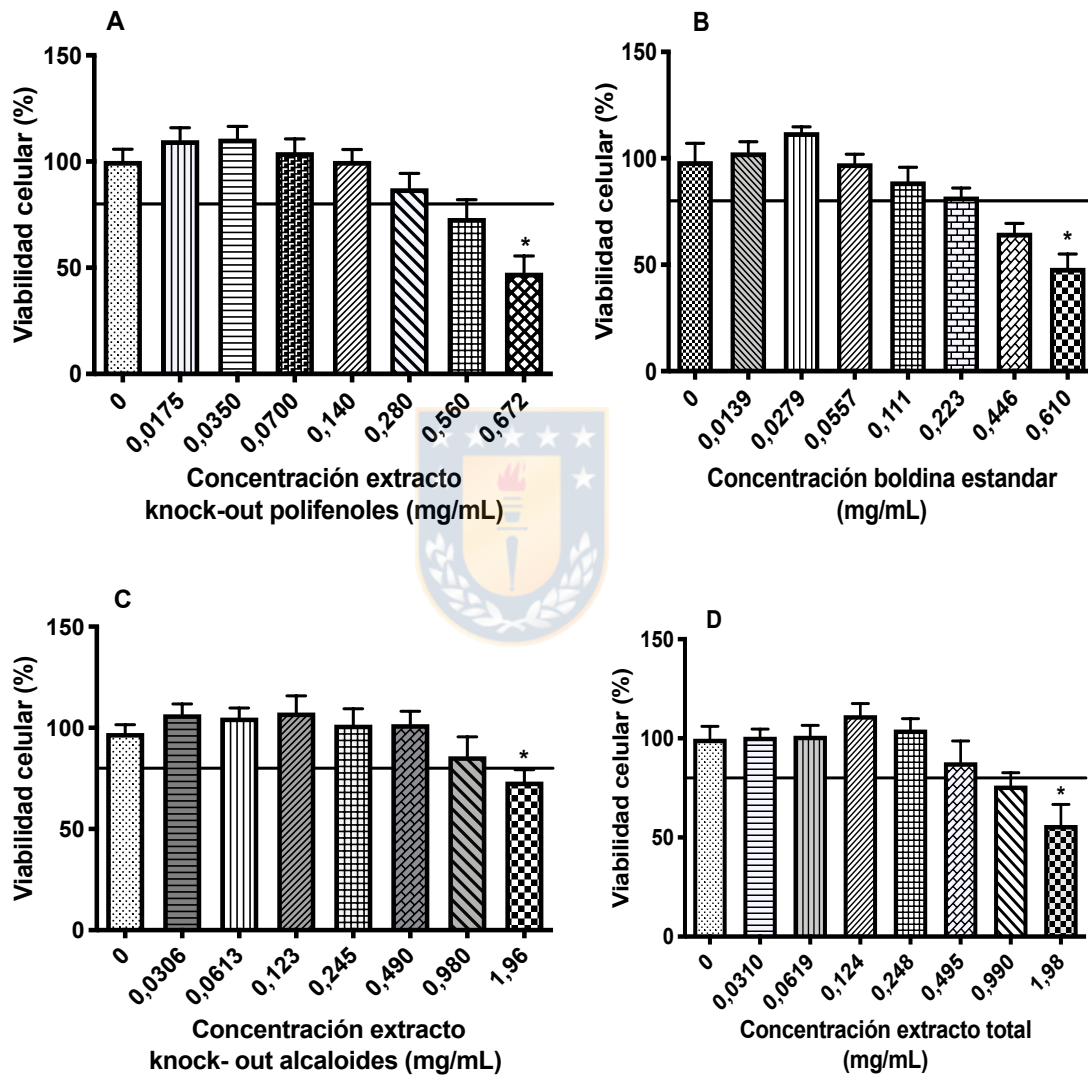


Figura 5. Efecto citotóxico de las fracciones de *P. boldus* en células AGS.

Experimento realizado por cuadruplicado. (* $p < 0.05$)

2.4.2. Ensayo del cometa

El ensayo del cometa es un método altamente sensible para evaluar la formación y reparación de daños en el ADN. En la tabla 4 se muestra la genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a extractos diseñados de boldo, detectados por el ensayo del cometa. Se observa el promedio de los datos, en donde si hay una diferencia significativa en comparación con el control con $p < 0.05$ para el peróxido de hidrógeno, alcaloides y extracto total. Estos resultados indican que existe un efecto genotóxico para los extractos de alcaloides y total. Sin embargo, no hay una diferencia significativa en comparación con el extracto Knock out alcaloides (polifenoles), por lo que no causan daño a las células. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba de Tukey para evaluar diferencias significativas entre los grupos. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

En la Figura 6, se observa el daño del ADN, en términos de fragmentación del ADN, lo que se determinó midiendo la longitud de la cola del cometa bajo un microscopio. Las fotografías de daño en el ADN observadas después del tratamiento de células de linfocitos por *P. boldus* extracto corresponden a los tratamientos a) Control; b) peróxido de hidrógeno (100 μM); c1 y c2) *knock-out* (alcaloides) 0.28 y 0.56 mg/mL, d1 y d2) *knock out* alcaloides (polifenoles) (0.983 y 1.97 mg/ml) y extracto total (0.50 mg/ml).

Tabla 4: Daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes dosis de control, peróxido de hidrogeno (control positivo) y los extractos diseñados *knock-out* polifenoles (alcaloides), *knock-out* alcaloides (polifenoles) y el total (soxhlet) de hojas de *Peumus boldus*, (n=3, *p<0.05).

Extractos diseñados	% cola ADN	DV
Control	3.77	2.5
Peróxido hidrogeno (100 µM)*	97.4	5.9
<i>Knock-out</i> polifenoles (0.56 mg/ml)	95.6	4.3
<i>knock-out</i> polifenoles (0.28 mg/ml)	87	11
<i>knock out</i> alcaloides (1.97 mg/ml)	6.28	3.9
<i>knock-out alcaloides</i> (0.983 mg/ml)	4.00	2.9
Tota, soxhlet (0.50 µg/ml)	96.8	4

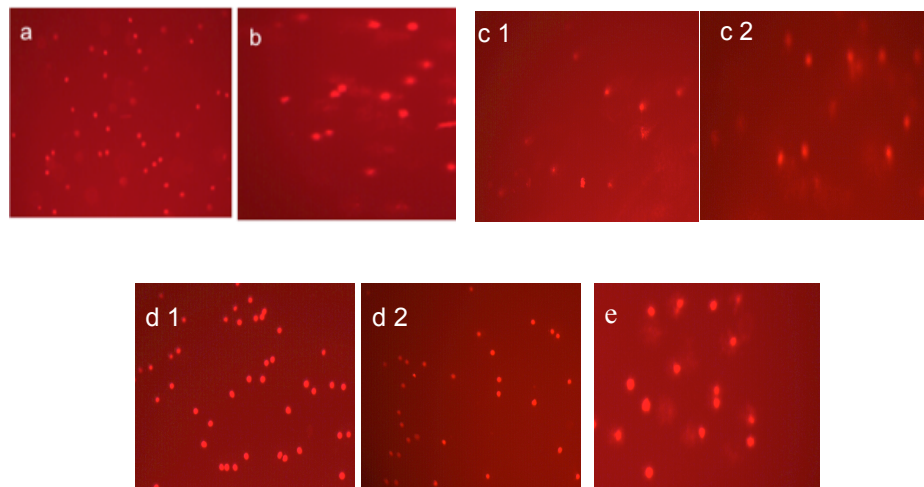


Figura 6. Imágenes del daño en el ADN observado después del tratamiento de células de linfocitos humanos con extracto diseñado de *P. boldus* a) Control; b) peróxido de hidrógeno (100 μ M); c1) *knock-out* polifenoles (alcaloides) 0.28 mg/ml, c2) *knock-out* polifenoles (Alcaloides) 0.56 mg/ml d1) *knock-out* alcaloides (polifenoles) 0.983 mg/ml, d2) *knock-out* alcaloides (polifenoles) 1.97 mg/ml y e) extracto total soxlet (0.50 mg /ml).

2.4.3. Ensayo inhibición de la acetilcolinesterasa

En la tabla 5 se observan los resultados obtenidos para los extractos diseñados de *P. boldus*, se puede observar que el extracto *knock-out* polifenoles (alcaloides) son los que presentan mayor inhibición de la acetilcolinesterasa, cuando se compara con los otros 2 extractos. Cuando se compara este resultado con lo reportado en el trabajo de Falé y

colaboradores, en donde también evaluó la inhibición de la actividad acetilcolinesterasa (valor IC₅₀), ellos obtuvieron un valor IC₅₀ de 0.93 mg/ml para un extracto acuoso de las hojas de boldo, ellos atribuyen esta actividad a los derivados de flavonoides glicosilados detectados, que fueron los compuestos principales, aunque también estaban presentes la boldina y otro derivados de aporfina (Falé et al., 2012). Gracias a esta herramienta de separación podemos concluir que son los alcaloides los responsables de esta actividad y no los polifenoles.

Tabla 5. Inhibición de la acetilcolinesterasa

Extractos diseñados	IC₅₀ mg/mL
Galantamina	0.00126 ± 0.00080
Knock-out alcaloides	0.566 ± 0.022
Knock-out polifenoles	0.304 ± 0.009
Total (soxhlet)	0.606 ± 0.030

2.5. Ensayos de capacidad antioxidante de los extractos diseñados

En la tabla 6 y figura 7 se observan los resultados para el ensayo DPPH y ORAC-FL obtenido para las fracciones sustraidas mediante CPC. Los resultados nos muestran que los polifenoles presentes en la hoja de boldo

son los que contribuyen a la actividad antioxidante, así también lo han reportado otros autores (Quezada et al., 2004) en donde se evaluó un extracto crudo de boldo, así como sus fracciones ricas en alcaloides y flavonoides. Los resultados de Quezada y colaboradores indicaron que la capacidad antioxidante observada para el extracto crudo se debe principalmente a la presencia de flavonoides.

Tabla 6: Resultados del ensayo DPPH de las fracciones sustraidas mediante refinamiento de la zona de pH-CPC, para las el extrato total (obtenido por soxhlet), fracción *knock-out* alcaloides (polifenoles), *knock-out* polifenoles (alcaloides), (n=3).



Extractos diseñados	IC ₅₀ DPPH (ug/mL)
Total (soxhlet)	63.05 ± 1.1
<i>knock-out</i> alcaloides (polifenoles)	43.73 ± 0.66
<i>knock-out</i> polifenoles (alcaloides)	109.0 ± 0.88

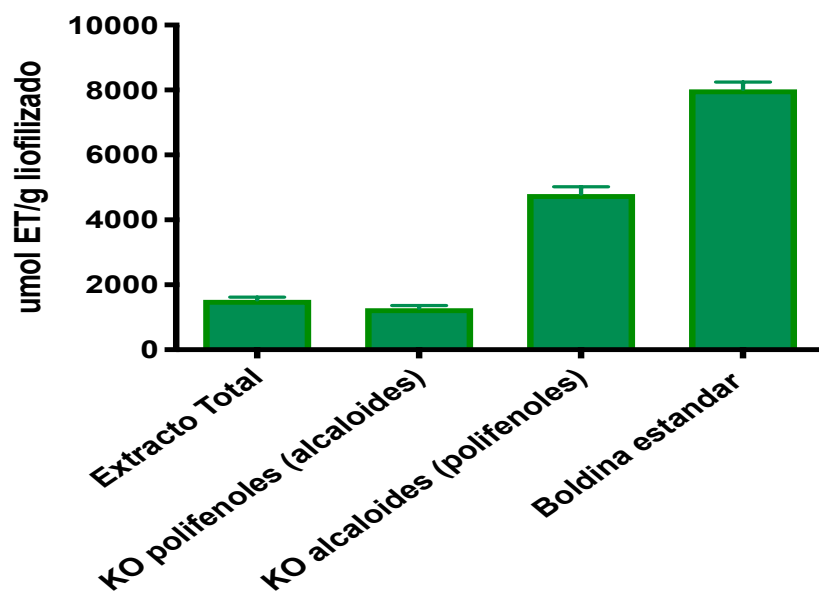


Figura 7. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) usando fluoresceína como sonda. Para las fracciones sustraidas por refinamiento de la zona de pH- CPC para el extracto de total de boldo, fracciones *knock-out* polifenoles (alcaloides), *knock-out* alcaloides (polifenoles) y boldina estandar. (n=3)

3. Conclusiones

La estrategia de sustracción química permitió eliminar selectivamente los alcaloides del extracto metanólico de *P. boldus* sin alterar el perfil polifenólico. La fracción *knock-out polifenoles* (alcaloides) redujeron la viabilidad celular en más del 50% a una concentración de 0.672 mg/mL mostrando una toxicidad en comparación con el extracto de *knock-out* alcaloides (polifenoles). Por otro lado, también fue posible verificar que los alcaloides producen un daño genotóxico moderado mediante el ensayo cometa donde causan daños significativos en el ADN. También la fracción *knock-out* polifenoles (alcaloides) mostró actividad inhibitoria moderada en el ensayo con AChE. Sin embargo, la fracción *knock-out* alcaloides (polifenoles) mostró efectos citoprotectores. Este extracto no causa una disminución apreciable en la viabilidad celular (AGS) hasta 1.96 mg/mL. Además, las altas concentraciones de este extracto fueron seguras en el ensayo de daño del ADN. Nuestros resultados sugieren que la actividad citoprotectora está asociada mayormente con la actividad antioxidante de los polifenoles en lugar de los alcaloides.

4. Referencias

Berthod A, (2007) Countercurrent chromatography and the journal of liquid chromatography: a love story, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30, 1447–1463.

Falé, P.L., F. Amaral, P.J. Amorim Madeira, M. Sousa Silva, M.H. Florêncio, F.N. Frazão M.L.M. (2012). Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines Serralheiro. *Food and Chemical Toxicology.* 50, 2656–2662.

Fang L, Liu Y.Q, Yang B., Wang X., Huang L.Q., (2011). Separation of alkaloids from herbs using high-speed counter-current chromatography, *J. Sep. Sci.* 34 2545–2558.

Ito Y, Bowman R.L, (1970) Countercurrent chromatography liquid-liquid partition chromatography without solid support, *J. Chromatogr. Sci.* 8, 315–323

Keohavong, Phouthone, Grant, Stephen G. (2005). *Molecular Toxicology Protocols.* Humana Press, (1) 85-93.

Kukula-Koch, W.; Kruk-Słomka, M.; Stępnik, K.; Szalak, R.; Biała, G. The Evaluation of Pro-Cognitive and Antiamnestic Properties of Berberine and Magnoflorine Isolated from Barberry Species by Centrifugal Partition Chromatography (CPC), in Relation to QSAR Modelling. *Int. J. Mol. Sci.* (2017), 18, 2511.

Lee. S.S. (1994). Application of centrifugal partition chromatography to the separation of Lauraceous alkaloids. *Journal of Chromatography A*, 667. 322-326

Renault J.H, Nuzillard J. M, Le Crouérou G, Thé penier P, Zéches-Hanrot M, Le Men-Olivier L. (1999). Isolation of indole alkaloids from *Catharanthus*

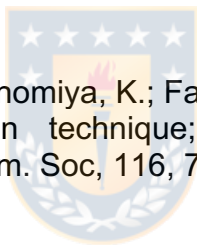
roseus by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode, *Journal of Chromatography A*, 849, 421–431.

Pauli G.F, Pro S.M, Friesen J.B, (2008). Countercurrent separation of natural products, *J. Nat. Prod.* 71, 1489–1508.

Salas Sierralta, Maria Isabel. (2014). Evaluación de la genotoxicidad utilizando el ensayo cometa en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Dimetil Sulfoxido (DMSO). Tesis para optar al Título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Ricardo Palma, Perú,

Stévigny, C., Bailly, C., Quetin-Leclercq, J., (2005). Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. *Curr. Med. Chem. Anti Canc. Agents.* 5, 173–182.

Weisz, A.; Scher, A.L.; Shinomiya, K.; Fales, H.M.; Ito, Y. (1994). A new preparative-scale purification technique; pH-zone-refining countercurrent chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 704–708.



Información suplementaria

Tabla 1S: HPLC-DAD-IT-MS/MS para la fracción *knock-out* alcaloides (polifenoles) de *P. boldus*

Peak #	t _R (min)	[M-H] ⁺ m/z	MS-MS fragments	λ Max (nm)	Identified compound
1	3.1	579.1	560.9, 453.0, 427.0 , 409.0 , 291.0, 247.0, 163.0	280	procyanidin dimer
2	3.5	579.1	561.1, 453.1, 427.0, 409.0 , 291.0, 246.9	280	procyanidin dimer
3	4.3	290.4	272.0, 244.0, 226.0 , 208.0, 123.0	279	catechin
4	5.1	291.1	273.0, 165.0, 139.0, 123.1	280	epicatechin
5	8.4	579.2	561.0, 525.1, 453.0, 427.0, 409.0 , 332.9, 300.9, 291.0	280	procyanidin dimer
11	19.0	727.2	595.0, 433.0 , 287.0	267, 288, 349	luteolin-pentosyl glucosylrhamnose
12	19.8	611.1	449.0 , 303.0	263, 289 sh, 354	heperidin-7-O-rhamnoglucoside
13	20.6	757.2	625.0, 463.0 , 317.0	263, 290 sh, 354	myricetin-rhamnosyl-glucosyl pentoside
14	20.9	581.1	449.0, 303.0	264, 290, 353	quercetin pentosyl- rhamnoside
16	21.6	595.1	433.0, 287.0	264,291 sh, 352	luteolin 3-O-rutinoside
17	22.1	697.2	565.0, 433.0 , 419.0, 383.0, 353.0, 287.0	264, 292 sh, 348	luteolin dipentosyl rhamnoside
18	23.1	595.1	433.0, 287.0	270, 284, 351	luteolin 7-O-rutinoside
19	23.4	625.2	463.0, 316.9	266, 288 sh, 351	myricetin rhamnosyl-hexose
20	23.8	727.1	595.0, 463.0, 413.0, 317.0	265, 289, 352	quercetin pentosyl di-rhamnoside
22	24.9	771.2	625.0, 463.0, 317.0	264, 290 sh, 349	isorhamnetin rhamnosyl-glucosyl-rhamnoside
23	25.1	286.2	269.0, 237.0, 175.0, 143.0	264, 282 sh, 349	luteolin
24	25.6	595.2	463.0, 317.0	265, 288 sh, 353	myricetin rhamnosyl-pentoside
25	25.8	595.1	463.0, 317.0, 287.0	266, 289 sh, 346	luteolin rhamnosyl-pentoside
26	26.4	579.1	433.0, 287.0	265, 315,344	luteolin-dirhamnoside

29	27.7	609.1	463.0, 317.0	264, 317, 348	myricetin hexoxyl-rhamnose
30	28.0	741.2	609.1, 595.0, 463.0 , 445.0, 317.0	267, 348	kaempferol-3-O-glucosyl-rhamnosyl-rhamnose



Capítulo 4: Conclusiones finales

1. Los solventes naturales eutécticos profundos (NADES) son una alternativa verde potencial a los solventes orgánicos utilizados convencionalmente como medios de extracción para mejorar la extracción de alcaloides y compuestos fenólicos.
2. El NADES preparado con prolina: ácido cítrico fue el solvente más prometedor, logrando mayores rendimientos de extracción de verbascósido de las hojas de *B. globosa*. Sin embargo, otros NADES preparados con cloruro de colina-glicerol-agua y cloruro de colina-glicerol dieron buenos resultados y podrían usarse como alternativa. En el caso del luteolina 7-O-glucósido, los NADES preparados con cloruro de colina: 1,2-propanodiol permitieron un mayor rendimiento de extracción que las muestras extraídas con metanol al 80%.
3. El NADES prolina- ácido oxálico fue el solvente más prometedor, logrando mayores rendimientos de extracción de boldina y TPC de las hojas de *P. boldus*. En el caso de TPC, no mostró diferencias significativas en comparación con el disolvente de control (metanol) y podría usarse como un sustituto más ecológico de este disolvente.
4. La cromatografía de partición centrifuga (CPC), que es una técnica preparativa que permitió sustraer para el matico, 3 fracciones, que corresponden a los extractos *knock-out* 1 en donde el compuesto

mayoritario es el verbascósido y el extracto *knock-out* 2 corresponde a la fracción cuyo compuesto mayoritario es el Forsitosido B, y la fracción que quedo desprovista se denominó *knock-down*.

5. Para el matico se identificaron un total de 25 compuestos fenolicos, de los cuales 13 fueron reportados identificados por primera vez para esta planta, esto se realizó mediante HPLC-DAD-IT-MS/MS y HPLC-Q-TOF.
6. La cromatografía de partición centrifuga en su modo de refinamiento en la zona de pH, permitió eliminar selectivamente los alcaloides desde el extracto metanolico de *P. boldus*. De esta forma se obtuvieron dos fracciones, *knock-out* polifenoles (fracción de alcaloides) y *knock-out* alcaloides (polifenoles).
7. El extracto *knock-out* (alcaloides) del boldo redujeron la viabilidad celular en más del 50% a una concentración de 0.672 mg/ml mostrando una toxicidad en comparación con el extracto de *knock-out* alcaloides (polifenoles). También fue posible verificar que los alcaloides producen un daño genotoxico mediante el ensayo cometa donde causan daños significativos en el ADN. También mostró actividad inhibitoria moderada en el ensayo AChE.