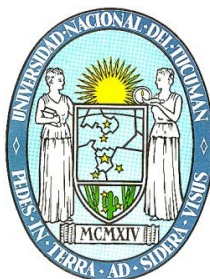


Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN

Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo



“Agregado de valor a *Zuccagnia punctata*, una especie medicinal nativa de Argentina para promover su uso sustentable. Desarrollo de un producto fitoterápico.”

Tesista:

Lic. Antonela Mariana Romero

Directora

Dra. María Inés Isla

Co- Directora

Dra. Iris Catiana Zampini

-2026-

Facultad de Ciencias Naturales e IML

Autoridades

DECANA

Dra. Virginia Sara Luz Abdala

VICEDECANO

Mag. Pablo Sesma

SECRETARIA ACADÉMICA

Dra. María Elena Puchulu

SECRETARIA DE POSGRADO

Dra. Fabiana del Carmen Cuezso

SECRETARIA DE EXTENSIÓN Y BIENESTAR INSTITUCIONAL

Mag. Cecilia Adriana Veggiani Aybar

SECRETARIO DE ECONOMÍA ADMINISTRATIVA

CPN Luis María Rodolfo Geria Reinés

SECRETARIO DE CIENCIA, INNOVACIÓN Y VINCULACIÓN

TECNOLÓGICA

Dr. Sergio Miguel Georgieff

HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Profesores Titulares

Dr. Eduardo Domínguez

Dr. José Pablo López

Profesores Asociados y Adjuntos

Dra. María Verónica Manzo

Dr. Marcelo Sebastián Moyano

Docentes Auxiliares

Dra. Nurit Oliszewski

Dra. Elisa Fanjul

No Docente

Sr. José Luis Roldán

Egresada

Dra. Soledad Bustos

Estudiantes

Florencia L. Rodríguez

Agostina B. Romano

Ana P. Amaya Fed Richa

Trabajo de posgrado para la obtención del grado académico
superior de Doctora en Ciencias Biológicas

Carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas
Acreditado y categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución N°: 279/22.

Tesista
Lic. Antonela Mariana Romero

Directora
Dra. María Inés Isla

Codirectora
Dra. Iris Catiana Zampini

Comisión de Supervisión
Dr. Jorge Esteban Sayago
Dra. Alicia Inés de Fátima Mamani

Tribunal Examinador de Tesis
Dr. Rafael A. Ricco (UBA)
Dra. Brenda Salomé Königheim (UNC)
Dra. Susana Josefina Jerez (FCN-FML-UNT/INSIBIO-CONICET-UNT)

Año:2026

Trabajo realizado en:
Instituto de Bioprospección y Fisiología Vegetal



Con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad Nacional de Tucumán.

Agradecimientos

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que me acompañaron, alentaron y brindaron su apoyo incondicional durante este largo camino. Sin su presencia, orientación y afecto, no hubiese sido posible alcanzar esta meta tan importante en mi vida.

A mi directora de Beca, Dra. María Inés Isla, por haberme recibido en su grupo de trabajo y brindarme la oportunidad de desarrollar esta Tesis bajo su guía. Gracias por su confianza, dedicación y por compartir con generosidad su vasta experiencia científica y humana. Le agradezco por enseñarme que la pasión, la constancia y el esfuerzo son el camino hacia los mejores logros. Su acompañamiento constante y sus consejos, tanto profesionales como personales, fueron esenciales en cada etapa de este proceso.

A mi Co-directora de Tesis, Dra. Catiana Zampini, por aceptar acompañarme en este desafío. Agradezco profundamente su apoyo constante, su compromiso y su entusiasmo por la investigación, que fueron fuente de inspiración y aprendizaje.

A la Dra. Alicia Inés de Fátima Mamani de Marchese y al Dr. Jorge Sayago, miembros de la comisión de supervisión del Trabajo de Tesis Doctoral por sus valiosos aportes, observaciones y el acompañamiento constante a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A las Dra. Soledad Cuello, por su asesoramiento y apoyo en la identificación y caracterización botánica de las especies vegetales estudiadas.

A las Dra. Ana Salas por su colaboración en los ensayos de toxicidad y en los estudios antifúngicos, y por su constante disposición y apoyo durante todos estos años.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio, por el compañerismo diario, la colaboración técnica y las interminables jornadas compartidas. Gracias por los momentos de risas, los intercambios de ideas y por convertir el trabajo cotidiano en un espacio de aprendizaje y amistad.

A mi familia, por su amor incondicional y su apoyo constante. A mi madre, por su ejemplo, por enseñarme valores fundamentales, por impulsarme a seguir mis sueños y sostenerme siempre con cariño y fortaleza, a mi hijo por llenar mi vida de alegría. Y a mis hermanos, por estar presentes en cada momento

A mi esposo, Mateo, por ser mi mayor sostén. Gracias por tu paciencia, por acompañarme en cada desafío, por tu amor y comprensión en los momentos difíciles, y por ser mi compañero incondicional en este camino.

A mis amigos y amigas, de la facultad y de la vida, por estar siempre, por su amistad sincera, por compartir risas, desvelos y palabras de aliento. Gracias por ser parte esencial de mi crecimiento personal.

A Dios y a la Virgen, por ser mi luz y guía, por acompañarme con fe y esperanza en cada paso de mi vida.

A la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia y a la Universidad Nacional de Tucumán, por brindarme la posibilidad de formarme profesionalmente y continuar mis estudios de posgrado de manera gratuita, contribuyendo a mi crecimiento académico.

Al personal del Departamento de Posgrado de la Facultad de Ciencias Naturales e IML por su amabilidad, paciencia y disposición durante todo este tiempo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la Beca de posgrado que hizo posible la realización de esta investigación.

A todas las instituciones que financiaron los proyectos en los que se enmarca este trabajo de Tesis Doctoral. Finalmente, a todas aquellas personas que, de una u otra manera, colaboraron a lo largo de estos años, les extiendo mi más sincero agradecimiento. Cada palabra, gesto y enseñanza fueron parte fundamental de este camino que hoy culmina.

Publicaciones derivadas de este Trabajo de Tesis Doctoral

Trabajos publicados en revistas indexadas

Chemical-Functional Analysis of Extracts Obtained from *Zuccagnia punctata* Powder Using Green Solvents (NaDES) in Conjunction with Traditional and Non-Traditional Techniques.

Romero, A.M., Zampini, I.C., Isla, M.I.

Plants 2024 <https://doi.org/10.3390/plants13182563>.

New Antimycotic Formulation containing *Zuccagnia punctata* extracts based in green solvents (NaDES). Design, characterization and stability studies

Romero, A.M.; Zampini I.C.; Isla, M.I.

Enviado para su publicación

Resúmenes publicados

➤ Análisis químico-funcional de extractos obtenidos de *Zuccagnia punctata* mediante el uso de solventes verdes

Autores: Romero, A.M, Zampini, I.C; Isla M.I

VIII Jornada Nacional de Plantas Aromáticas Nativas y sus aceites esenciales. Tucumán, marzo de 2024.

➤ Estudio comparativo del perfil fitoquímico y actividad antifúngica de extractos de *Zuccagnia punctata* obtenidos por métodos de extracción convencionales y no convencionales.

VI Jornadas de investigación, docencia y extensión en ciencias naturales, Tucumán, noviembre de 2023.

➤ Estudio del perfil fitoquímico y actividad antioxidante de extractos de *Zuccagnia punctata* Cav. obtenidos con diferentes solventes por métodos convencionales y no convencionales.

XXXI Jornadas Científicas de la asociación de biología de Tucumán. Tafí del Valle, Tucumán. Octubre 2022.

➤ Estudio comparativo del perfil fitoquímico de extractos de *Zuccagnia punctata* obtenidos por métodos convencionales y no convencionales amigables con el medio ambiente.

JorAMed VII Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales. Córdoba, Argentina. Octubre 2021.

Proyectos que financiaron esta tesis

2019- 2025 Proyecto Unidad Ejecutora Financiado por CONICET. Agregado de valor a Especies vegetales nativas del monte de sierras y bolsones para Promover su uso sustentable.
229 20180100011 CO

2022-2025 Proyecto financiado por ANPCyT: Aprovechamiento sostenible de Productos forestales no maderables y biomasas residuales de diferentes ecorregiones de Tucumán. PICT-Aplicados SALTO INSTITUCIONAL PICT-2021- CAT-II-0

Índice

Resumen.....	15
Abstract	16
1. Introducción	17
1.1. Plantas medicinales	18
1.2. Metabolitos especializados	18
1.2.1. Compuestos fenólicos	19
Ácidos fenólicos.....	20
Flavonoides	21
Lignanós	23
Taninos	24
1.3. Extracción de compuestos fitoquímicos.....	25
1.3.1. Selección del material vegetal.....	25
1.3.2. Procesamiento del material vegetal.....	26
1.3.3. Relación material vegetal-solvente de extracción.....	26
1.3.4. Solvente utilizado en el proceso de extracción	26
1.3.5. Tiempo o duración de la extracción	27
1.3.6. Métodos de extracción.....	27
1.4. Química analítica verde	31
1.4.1. Solventes verdes.....	33
1.4.1.1. Líquidos iónicos	33
1.4.1.2. Solventes Eutécticos.....	34
1.4.1.3. Solventes Eutécticos Profundos Naturales (NaDES).....	36

1.4.1.4. Preparación de los NaDES	38
1.4.1.4.1. Estructura supramolecular y efecto de la dilución	39
1.4.1.4.2. Propiedades físicas y toxicidad.....	40
1.5. Micosis humana	41
1.5.1. Onicomycosis	41
Onicomycosis subungueal lateral distal	42
Onicomycosis subungueal proximal.....	42
Onicomycosis endonyx.....	42
Onicomycosis distrófica total	42
Onicomycosis superficial blanca	43
1.5.2. Terapias para tratar la onicomycosis	43
Tratamiento oral.....	43
Tratamiento tópico	45
1.5.3. Productos antifúngicos naturales.....	47
1.5.4. Procesos oxidativos en la onicomycosis.....	49
1.5.5. Compuestos fenólicos como antioxidantes naturales.....	49
1.6. <i>Zuccagnia punctata</i>	50
Descripción morfológica.....	51
Usos tradicionales	51
Composición química y actividades biológicas	52
Antecedentes de condiciones de extracción de bioactivos de <i>Z. punctata</i>	56
Hipótesis.....	59
Objetivo General	59

Objetivos Específicos.....	59
2. Materiales y métodos.....	60
2.1. Material vegetal	61
2.2. Preparación de NaDES.....	61
2.3. Extracciones convencionales.....	62
2.4. Extracciones no convencionales.....	62
2.4.1. Extracción asistida por sonda ultrasónica (EAU)	62
2.4.2. Extracción asistida por microondas (EAM).....	62
2.5. Determinación de la composición química	63
2.5.1. Determinación del contenido total de polifenoles y flavonoides	64
2.5.2. HPLC-DAD	65
2.5.3. Cromatografía en Capa fina (CCF)	66
2.6. Determinación de actividades biológicas.....	66
2.6.1. Actividad depuradora de radicales libres ABTS	66
2.6.2. Determinación de la actividad antifúngica.....	67
Microorganismos y medio.....	67
Inóculos de <i>Trichophytum mentagrophytes</i> y <i>Trichophytum rubrum</i>	67
Inóculos de hongos levaduriformes.....	67
Determinación de la concentración inhibitoria mínima.....	67
2.7. Preparación de la formulación tópica antifúngica (FTA)	68
2.8. Estudios de estabilidad de las FTA.....	69
2.8.1. Estabilidad química	69
2.8.2. Estabilidad organoléptica y física	70

2.8.2.1. Parámetros cromáticos.....	70
2.8.2.2. Centrifugación	70
2.8.2.3. Medición de pH	70
2.8.3. Estabilidad microbiológica.....	70
2.8.4. Estabilidad biológica.....	71
2.8.4.1. Actividad de eliminación de radicales libres de ABTS	71
2.8.4.2. Determinación de la actividad antifúngica.....	71
Determinación de la concentración inhibitoria mínima.....	71
2.9. Estudio de liberación in vitro.....	71
Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos liberados.....	72
Cromatografía en capa fina y ensayo autográfico	72
2.10. Análisis estadístico	73
2.11 Eficiencia energética relativa.....	73
2.12. Huella de Carbono total y relativa.....	74
3. Resultados y Discusión: Análisis químico-funcional de extractos de <i>Zuccagnia punctata</i> obtenidos con solventes y métodos de extracción convencionales y no convencionales.....	75
3.1. Determinación cuantitativa de fitoquímicos.....	77
Rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos y flavonoides utilizando solventes convencionales y no convencionales con y sin EAU o EAM	77
3.2. Chalconas extraídas de partes aéreas de <i>Z. punctata</i> con solventes verdes y solventes convencionales.....	80
3.3. Cromatografía en capa fina	84
3.4. Actividad antioxidante.....	84

3.5. Correlación entre compuestos fenólicos totales, flavonoides, contenido de chalcona y actividad antioxidante.....	85
3.6. Mapa de calor y dendrograma	86
3.7. Actividad antifúngica	87
3.7.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a hongos dermatofitos..	87
3.7.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a levaduras.....	90
3.8. Toxicidad.....	92
3.9. Eficiencia energética y Huella de Carbono.....	93
4. Resultados y Discusión: Desarrollo de formulaciones tópicas antimicóticas de extracto de <i>Zuccagnia punctata</i> en solventes eutécticos profundos naturales (NaDES). Estudios de estabilidad	96
4.1. Caracterización sensorial de la formulación tópica antifúngica con <i>Z. punctata</i> en NaDES	98
4.2. Estudios de estabilidad.....	100
4.2.1. Estabilidad fisicoquímica	100
4.2.2. Estabilidad biológica de las formulaciones tópicas antifúngicas.....	101
Efecto antifúngico.....	101
Actividad antioxidante.....	103
4.2.3. Estabilidad microbiológica.....	104
4.3. Liberación in vitro de compuestos bioactivos de las formulaciones	105
5. Discusión general	107
6. Bibliografía.....	111

RESUMEN

El presente trabajo de Tesis Doctoral aborda la valorización de *Zuccagnia punctata* Cav. (jarilla), una especie medicinal nativa del Noroeste Argentino, mediante el desarrollo de estrategias de extracción sustentable orientadas a la obtención de compuestos bioactivos con potencial farmacéutico. En este contexto, se emplearon solventes eutécticos profundos naturales (NaDES) como alternativa ecológica a los solventes orgánicos convencionales, en el marco de los principios de la Química Verde.

Se formularon y caracterizaron distintos NaDES a partir de componentes naturales, seguros y biodegradables (ácido láctico, glucosa, cloruro de colina, urea, entre otros), seleccionándose aquellos con mejores propiedades fisicoquímicas y extractivas. Estos solventes se diseñaron para la extracción de metabolitos especializados, principalmente, compuestos fenólicos, flavonoides y chalconas (DHC y DHMC) presentes en *Z. punctata* utilizando métodos convencionales y no convencionales (maceración, ultrasonido y microondas). Este es el primer estudio de extracción de compuestos fenólicos, flavonoides y chalconas de *Z. punctata* mediante el uso de solventes verdes, extracción asistida por microondas (EAM) y extracción asistida por ultrasonido (EAU), en comparación con los métodos tradicionales.

Los resultados demostraron que los NaDESs, en especial las combinaciones ácido láctico:glucosa (LGH) y cloruro de colina:urea (CU), presentaron alta eficiencia en la recuperación de compuestos fenólicos con elevada capacidad antioxidante, comparable o superior a la obtenida cuando se usa etanol como solvente de extracción. Los extractos obtenidos exhibieron además actividad antifúngica significativa frente a *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*.

Finalmente, se desarrollaron formulaciones tópicas con los extractos de *Z. punctata* obtenidos mediante los NaDES: CU y LGH, las cuales mostraron estabilidad fisicoquímica, microbiológica y funcional frente a hongos dermatofitos a corto, mediano y largo plazo evidenciando su potencial uso como antifúngicos destinados al tratamiento de onicomicosis.

Los resultados alcanzados consolidan a *Zuccagnia punctata* como una fuente promisoría de compuestos bioactivos y posicionan a los solventes eutécticos profundos naturales como herramientas versátiles, seguras y sostenibles para la obtención de fitocompuestos de alto valor agregado, contribuyendo al aprovechamiento sustentable de los recursos vegetales autóctonos del Monte Argentino.

ABSTRACT

This doctoral thesis focuses on adding value to *Zuccagnia punctata* Cav. (jarilla), a native medicinal species from northwestern Argentina, through the development of sustainable extraction strategies aimed at obtaining bioactive compounds with pharmaceutical potential. In this framework, Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) were employed as environmentally friendly alternatives to conventional organic solvents, following the principles of Green Chemistry.

Different NaDES were formulated and characterized using natural, safe, and biodegradable components (such as lactic acid, glucose, choline chloride, and urea), selecting those with optimal physicochemical and extraction properties. These solvents were applied for the extraction of specialized metabolites —mainly phenolic compounds, flavonoids, and chalcones— using both conventional and non-conventional extraction techniques.

Results demonstrated that NaDES, particularly the lactic acid–glucose (LGH) and choline chloride–urea (CU) systems, showed high efficiency in recovering phenolic compounds and exhibited strong antioxidant capacity, comparable or even superior to that achieved with ethanol. Moreover, the extracts displayed significant antifungal activity against *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, and Trichophyton mentagrophytes, highlighting the therapeutic potential of the metabolites obtained.

Finally, topical formulations incorporating *Z. punctata* extracts obtained with NaDES were developed. These formulations showed good physicochemical stability and promising potential as natural antifungal phytoproducts for the treatment of onychomycosis.

Overall, the results position *Zuccagnia punctata* as a promising source of bioactive compounds and confirm NaDES as versatile, safe, and sustainable tools for the eco-friendly extraction of high-value phytochemicals, contributing to the sustainable use and valorization of native plant resources from the Argentine Monte region.

Área temática: Química verde, Fitoquímica, Farmacognosia.

Palabras claves: *Zuccagnia punctata*, Compuestos bioactivos, Extracción sustentable, NaDES, Chalconas, Fitocompuestos.



1.INTRODUCCIÓN

1.1. Plantas medicinales

Desde los comienzos de la humanidad las plantas han sido utilizadas por sus propiedades beneficiosas para la salud (Chariandy et al., 1999). La medicina tradicional es la base de la medicina convencional, ya que la mayor parte de los principios activos de síntesis han encontrado su origen en compuestos sintetizados por plantas (Abu-Irmaileh et al., 2003; Sarker et al., 2007). Existen aproximadamente 400 mil especies de plantas en el mundo, de las cuales solo de un 10 % se han validado científicamente sus propiedades medicinales (Singh et al., 2020). Si bien en la actualidad, el uso de formulaciones obtenidas a partir de material vegetal ha aumentado significativamente, el conocimiento de su composición química, seguridad y toxicidad es aún escaso (Etaware et al., 2025).

En Argentina, la variedad de climas y ecosistemas da lugar a una gran diversidad de especies vegetales de las que se conocen alrededor de 10 mil de las cuales solo de 600 se han descripto sus propiedades terapéuticas (Alonso, 2015; Carabajal et al., 2017; Máthé y Bandoni, 2021; Palchetti et al., 2023).

1.2. Metabolitos especializados

Las plantas en general y las plantas medicinales en particular producen una amplia variedad de compuestos químicos mediante distintas vías metabólicas. El metabolismo primario comprende aquellas reacciones bioquímicas esenciales para el desarrollo y la reproducción vegetal. Dentro de este grupo se incluyen compuestos fundamentales como aminoácidos, azúcares, lípidos, proteínas y nucleótidos, los cuales participan activamente en las funciones básicas de la célula (Dewick, 2002). Por otro lado, las especies vegetales sintetizan otros compuestos que no participan de forma directa en procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, pero son indispensables para su supervivencia. A estos metabolitos se los denomina metabolitos especializados (también llamados fitoquímicos, productos secundarios o productos naturales), los cuales, a diferencia de los metabolitos primarios, son moléculas de mayor complejidad tales como compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides (Tiwari et al., 2016), son específicos de especie, no son universales ni conservativos (Suárez-Medina y Coy-Barrera, 2016).

Estos metabolitos permiten la interacción exitosa de las plantas con el entorno incluyendo tanto factores bióticos como abióticos (Weng et al., 2021; Huang y Dudareva, 2023). Si bien el número exacto de metabolitos especializados es desconocido, se han descripto alrededor de 1.000.000 de compuestos (Huang y Dudareva, 2023). Pueden actuar como protectores contra la radiación ultravioleta, como respuesta al estrés por sequía y salinidad, tener función de defensa para disuadir a herbívoros actuando

como anti alimentarios, frente a diferentes patógenos como fitoalexinas, como compuestos alelopáticos en interacciones de competencia con otras especies o para atraer polinizadores o simbiontes (Ignat et al., 2011; Suárez-Medina y Coy-Barrera, 2016; Huang y Dudareva, 2023).

La biosíntesis y niveles de varios de estos metabolitos especializados están influenciadas por el genotipo de la planta, pudiendo ser específicos de cada especie, órgano y tejido (Weng et al., 2021; Huang y Dudareva, 2023). Además, están regulados temporalmente y dependen de diferentes factores bióticos y abióticos (Rienth et al., 2022).

Además de su valor intrínseco para la planta, muchos de estos metabolitos son biológicamente activos y por lo tanto comercialmente valiosos con aplicaciones extensas en alimentos, nutraceuticos, cosméticos y preparaciones farmacéuticas (Tiwari et al., 2016; Huang y Dudareva, 2023).

1.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están constituidos por un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo. Conforman un grupo químico muy diverso, existiendo aproximadamente 8.000 estructuras fenólicas, las cuales son agrupadas en diferentes clases dependiendo de su esqueleto estructural (Balasundram et al., 2006).

La biosíntesis de los compuestos fenólicos tiene lugar a través de dos importantes rutas metabólicas, la del ácido shiquímico y la de los poliacetatos (Leyva et al., 2011).

La vía del ácido shiquímico conduce a la biosíntesis de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina. La fenilalanina es un sustrato para la enzima clave de la vía fenilpropanoide denominada fenilalanina amonio-*liasa*. Esta última desamina la fenilalanina para transformarse en el ácido cinámico. Posteriormente, el ácido *trans*-cinámico se transforma en ácido *p*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático y en otros ácidos fenólicos con diferente grado de hidroxilación y metoxilación.

A partir de la ruta de los poliacetatos se biosintetizan otros polifenoles principalmente en hongos, líquenes y microorganismos. En plantas superiores, la ruta de los poliacetatos participa en procesos de biogénesis mixta aportando moléculas de malonil CoA. Un ejemplo de ello es la biosíntesis de flavonoides donde la vía del ácido shiquimico aporta cumaroil-CoA y la vía del acetato malonato aporta tres moléculas de malonil-CoA cuya condensación conduce a la formación de una chalcona. La reacción es catalizada por la chalcona sintasa, la enzima clave del bloque de biosíntesis de flavonoides (Figura 1)

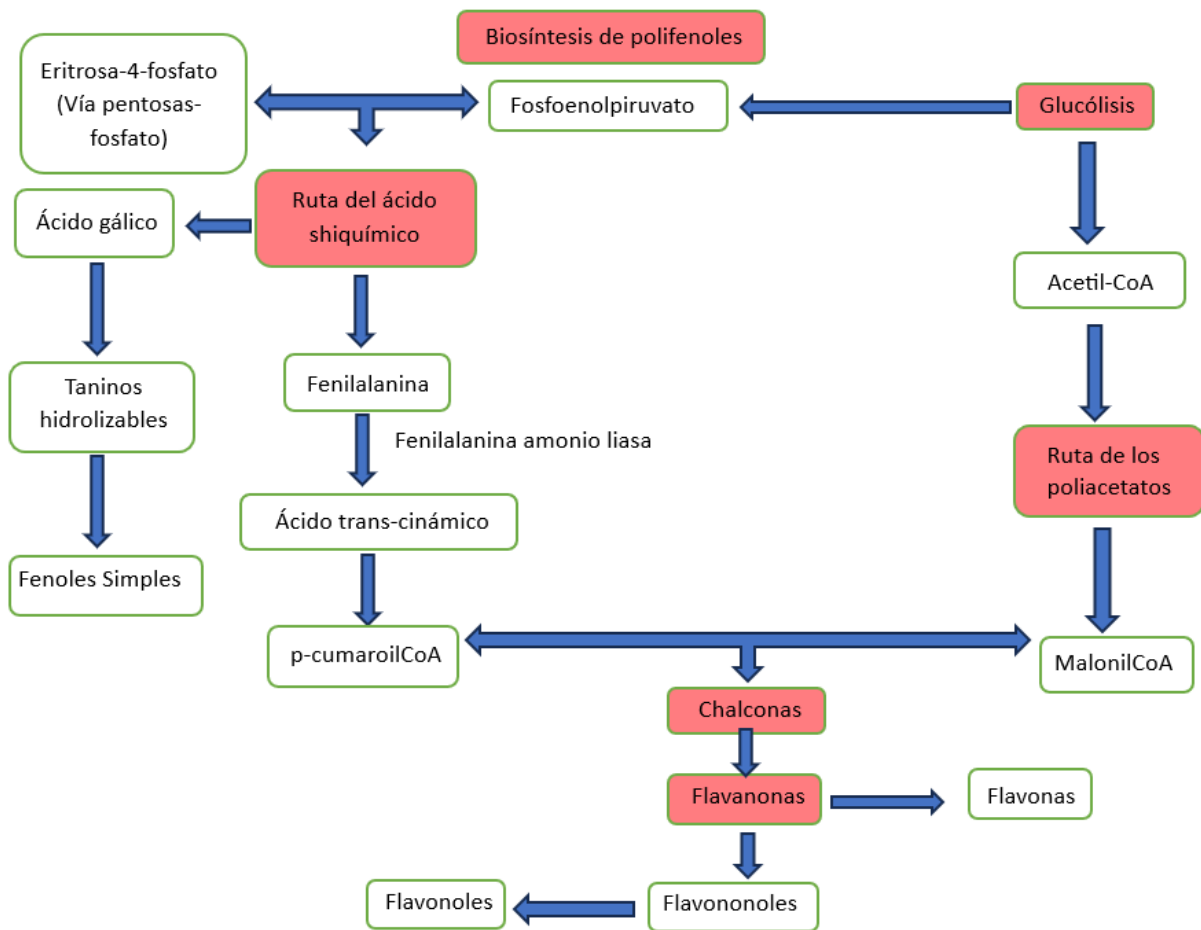


Figura 1: Esquema de las rutas del ácido shiquímico y de la ruta de poliacetatos para la biosíntesis de los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar de diferentes maneras porque están constituidos por un gran número de estructuras heterogéneas que van desde moléculas simples como los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides hasta compuestos altamente polimerizados como taninos, y ligninas.

Ácidos fenólicos:

Los ácidos fenólicos se agrupan principalmente en dos grandes clases estructurales: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Los primeros derivan del ácido benzoico y se caracterizan por un anillo bencénico con uno o más grupos hidroxilos y un grupo carboxilo; entre ellos destacan el ácido gálico, protocatéquico, vainílico y sirínico (Ignat et al., 2011). Por otro lado, los ácidos

hidroxicinámicos derivan del ácido cinámico, con una cadena lateral de tres átomos de carbono unida al anillo aromático, y comprenden compuestos como el ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico y sinápico (Figura 2) Estas moléculas presentan distintos grados de sustitución que influyen en sus propiedades biológicas. (Clifford 2000; Tomas-Barberan y Clifford 2000).

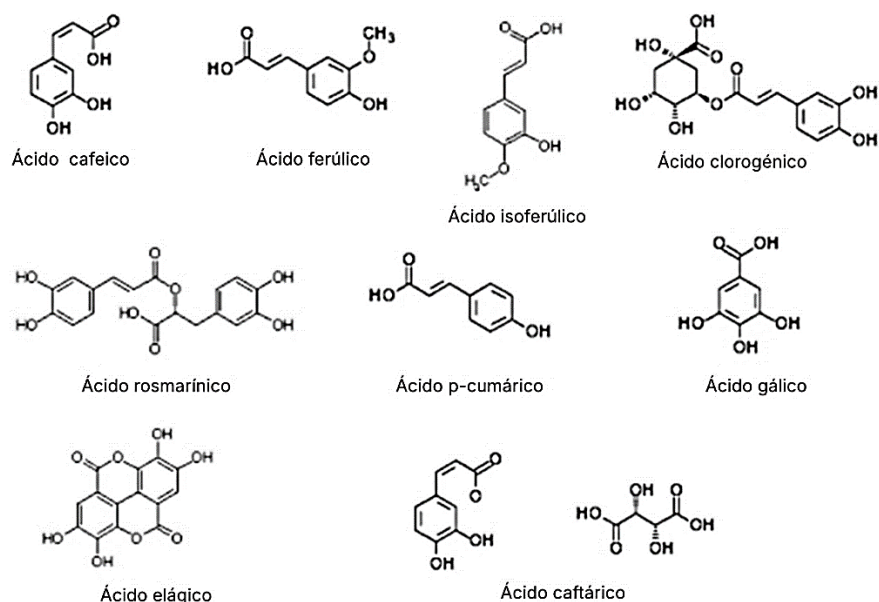


Figura 2. Principales estructuras de ácidos fenólicos

Flavonoides

Los precursores de los flavonoides son las chalconas. Se caracterizan por la ausencia del "anillo C" en la estructura básica del esqueleto flavonoide (Figura 3). Las chalconas presentan una amplia gama de actividades terapéuticas, como anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias, antihipertensivas, antipalúdicas, antiulcerosas, antivirales, antifúngicas, antibióticas, antiprotozoarias cardiovasculares y mutagénicas (Rammohan et al., 2020 ; Villa et al., 2024; Adhikari et al., 2025; Carmona-Gutierrez et al., 2025; Hussen et al., 2025; Maschio-Lima et al., 2025; Vani et al., 2025). El interés medicinal de las chalconas y su potencial aplicación en el área cosmética y en la industria alimentaria ha incrementado notablemente en los últimos años (Ramírez et al., 2012; Insuasty-Obando, 2016).

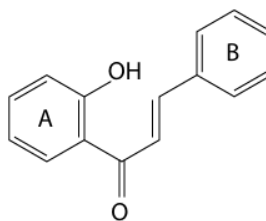


Figura 3. Estructura general de una chalcona.

A partir de las chalconas se sintetizan los flavonoides (Figura 4). Los flavonoides constituyen un grupo relevante de compuestos bioactivos de origen natural; específicamente, forman parte de los metabolitos especializados vegetales con una característica estructura polifenólica (Panche et al., 2016). Estos compuestos se encuentran de manera abundante en frutas, verduras, legumbres y diversas bebidas como el té y el vino (Terahara, 2015). Los flavonoides desempeñan un papel fundamental en aplicaciones nutracéuticas, farmacológicas, terapéuticas y cosméticas, gracias a sus reconocidas propiedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas, además de su capacidad para regular procesos celulares mediante la modulación de enzimas claves (Kumar y Pandey, 2013; Panche et al., 2016; Al Aboody y Mickymaray, 2020; Rodriguez et al., 2023; Salazar et al., 2025). Se pueden dividir en diferentes subgrupos dependiendo del carbono del anillo C en el que está unido el anillo B y el grado de insaturación y oxidación del anillo C. Los flavonoides en los que el anillo B está unido en la posición 3 del anillo C se denominan isoflavonas. Aquellos en los que el anillo B está unido en la posición 4 se denominan neoflavonoides, mientras que aquellos en los que el anillo B está unido en la posición 2 se pueden subdividir en varios subgrupos en función de las características estructurales del anillo C. Estos subgrupos son: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, flavanoles o catequinas y antocianinas (Panche et al., 2016).

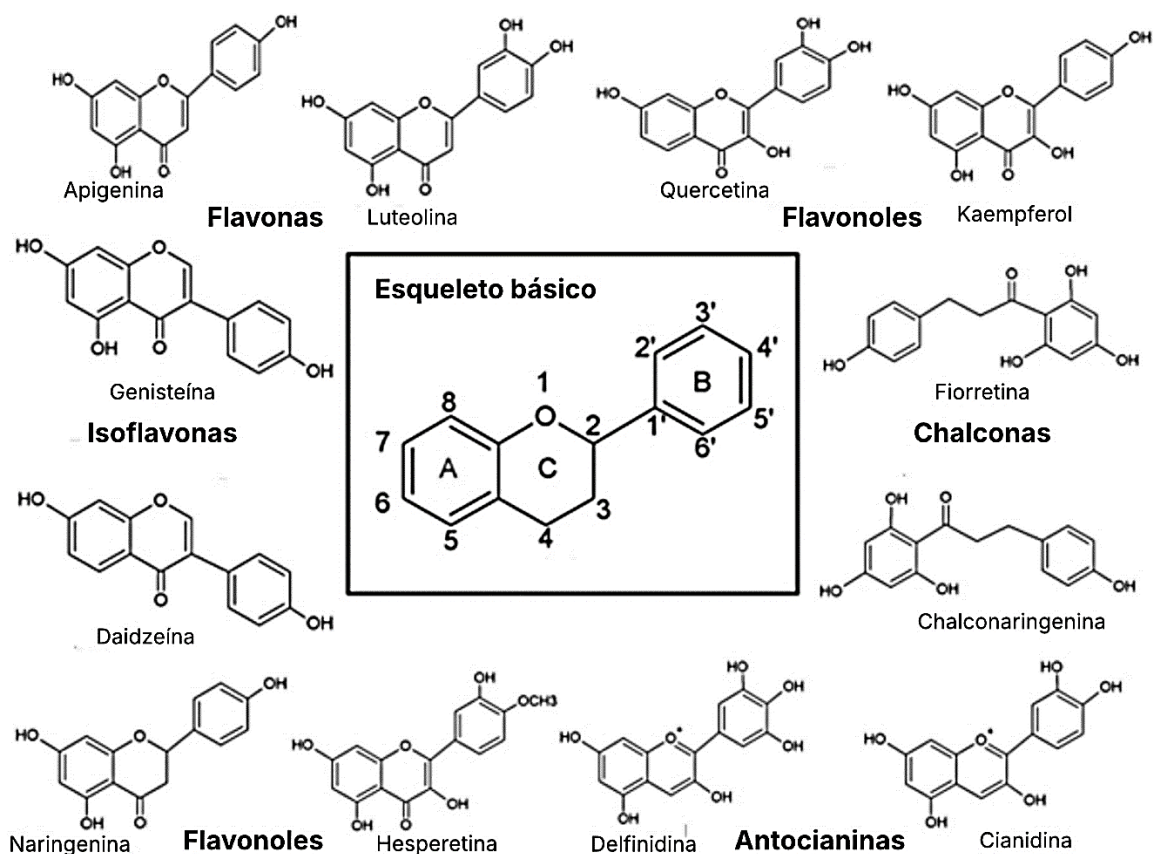


Figura 4. Estructura básica del esqueleto de los flavonoides y diferentes tipos de flavonoides.

Lignanós:

Los lignanos son compuestos fenólicos de origen vegetal que se forman a partir de la dimerización de dos unidades de ácido cinámico, unidas por un enlace β en la posición C8 de cada cadena lateral de propilo (Umezawa, 2003). Pueden ser clasificados en cinco tipos de acuerdo con sus estructuras: lignanos, neolignanos, norlignanos, lignanos híbridos y lignanos oligoméricos (Zhang et al., 2014). Estos metabolitos secundarios o especializados están distribuidos en más de 70 familias botánicas y se localizan en diversos órganos de la planta, incluyendo raíces, rizomas, tallos, hojas, semillas y frutos (Pan et al., 2009). Los lignanos desempeñan un papel en la defensa de la planta contra patógenos y plagas porque poseen algunas propiedades antifúngicas, antimicrobianas, antivirales, e incluso insecticidas (Harmatha et al., 2003; Pan et al., 2009; Cunha et al., 2012; Ražná et al., 2021). Las aplicaciones de los lignanos son numerosas gracias a sus propiedades como agentes antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos (Osmakov et al., 2022; Karimi y Rashidinejad, 2023). Se utilizan en

la industria alimentaria como ingredientes en alimentos y bebidas funcionales o como complementos alimenticios (Di et al., 2017; Sangorgio et al., 2023). Se incorporan como componentes en cosméticos y artículos de tocador, como productos para el cuidado del cabello o la piel (Draganescu et al., 2015). Los lignanos también se utilizan como ingredientes activos en productos farmacéuticos (De Silva et al., 2019; Plaha et al., 2022).

Taninos:

Los taninos son compuestos fenólicos de alto peso molecular que van desde 500 Da a más de 3000 Da, que se encuentran en hojas, corteza, frutos y raíces. Han sido estrechamente asociados con los mecanismos de defensa de las plantas contra herbívoros mamíferos, aves e insectos (Hagerman y Butcher, 1981; Hassanpour et al, 2011). Se clasifican en dos grupos principales, según su estructura química y propiedades: taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) son moléculas que contienen un carbohidrato, generalmente D-glucosa, como núcleo central (Min y Hart, 2003). Los grupos hidrolizables de estos carbohidratos están esterificados con grupos fenólicos, como el ácido elágico o el ácido gálico (Mangan, 1988).

Los taninos condensados o proantocianidinas consisten en unidades flavonoides (flavan-3-ol) unidas por enlaces carbono-carbono (Hassanpour et al, 2011). Los taninos condensados son el tipo más común de taninos presentes en leguminosas forrajeras (Barry y McNabb, 1999; MacAdam y Villalba, 2015; Lagrange, et al., 2021). Los efectos más destacados a nivel biológico y farmacológico atribuidos a los taninos condensados pueden agruparse en funciones antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias y cardioprotectoras, se asocian con un menor riesgo de enfermedades crónicas como las cardiovasculares, el cáncer y la diabetes (Amarowicz y Pegg, 2024; Cosme et al., 2025; Hoque et al., 2025). Los taninos, están presentes en una variedad de alimentos y bebidas de origen vegetal (té, vino, jugos de frutas), donde contribuyen significativamente al sabor, la astringencia y numerosos beneficios para la salud. Su biodisponibilidad y metabolismo se ven afectados por factores como la polimerización, la solubilidad y las interacciones con el microbiota intestinal (Cosme et al., 2025). Tanto los taninos hidrolizables como los condensados están emergiendo rápidamente como ingredientes activos claves en productos cosmeceúticos muy diversos, especialmente adecuados para el cuidado de la piel y el cabello. Los taninos sustituyen con éxito a sustancias químicas nocivas asociadas a riesgos significativos para la salud y la seguridad, como la p-fenilendiamina, el amoníaco, los oxidantes o los reveladores de color (Ciriminna et al., 2025)

1.3. Extracción de compuestos fitoquímicos

La extracción, desde un punto de vista fenomenológico, es un proceso de transferencia de masa de uno o más componentes de una fase a otra. Al emplear productos naturales, la muestra a extraer habitualmente es un material sólido, aunque en algunos casos se utilizan muestras líquidas. El disolvente de extracción suele ser un líquido, pero también puede ser un sólido, gas o un fluido supercrítico (Dasgupta, 2023). En particular, en matrices vegetales, la optimización del procedimiento de extracción de compuestos químicos es el primer paso del análisis de la composición química y actividades biológicas de plantas y juega un papel crucial en su posterior separación y caracterización.

Los compuestos fitoquímicos son considerados como "ingredientes activos" o "principios activos" de medicinas naturales (Dasgupta, 2023). Las plantas medicinales y aromáticas contienen numerosos principios activos presentes en raíces, tallos, cortezas, semillas, hojas, flores y frutos (Li et al., 2006), tal como lo indicado previamente y es de gran importancia que el proceso que se lleve a cabo para extraerlos sea el adecuado.

La eficiencia de extracción es influenciada por diversos factores incluyendo la selección del material vegetal, el procesamiento, la relación sólido-solvente, el tiempo de extracción, la temperatura, la función de los solventes de extracción y el método de extracción.

1.3.1. Selección del material vegetal

En la investigación de la medicina herbaria, la información obtenida mediante la quimiotaxonomía y la etnofarmacología se utiliza para la selección del material vegetal de interés. La etnofarmacología es el estudio de las costumbres y los conocimientos ancestrales relacionados con la aplicación de remedios herbales en diversas sociedades y civilizaciones. La identificación y comprensión de las características medicinales de las plantas que se han utilizado tradicionalmente para tratar ciertas dolencias médicas son los objetivos del estudio etnofarmacológico (Heinrich y Gibbons, 2001). Esta información resulta útil para orientar la selección de plantas para la extracción de principios activos.

Por otro lado, la quimiotaxonomía es el estudio de la composición química y la categorización de las plantas según sus componentes químicos y estatus taxonómico. Para determinar si ciertas sustancias químicas o grupos de compuestos son responsables de las características medicinales de una planta usada popularmente como medicinal, es necesario conocer antecedentes sobre los potenciales grupos químicos presentes en las plantas. Al realizar búsqueda bibliográfica para conocer antecedentes sobre la química de la familia o el género o especie vegetal de interés, los investigadores pueden elegir qué

plantas priorizar para la extracción, considerando tanto el conocimiento tradicional como su composición química (Saleh et al., 2019).

1.3.2. Procesamiento del material vegetal

La calidad del extracto final y el procedimiento de extracción pueden verse fuertemente afectados por el estado de la planta (fresca o seca). Las plantas frescas pueden contener mayores cantidades de sustancias químicas volátiles, pero el secado puede provocar la degradación o desaparición de algunas moléculas (Chen et al., 2023). Sin embargo, la presencia de un alto nivel de humedad en el material vegetal fresco puede interferir en el rendimiento y el proceso de aislamiento de principios activos. Por lo tanto, los tipos y las cantidades de metabolitos presentes en el extracto pueden variar según se utilice material vegetal fresco o seco. Durante el proceso de secado, algunas sustancias pueden ser más termosensibles y desnaturalizarse o sufrir procesos de oxidación al exponerse al aire o al calor. Por lo tanto, se debe tener en cuenta la estabilidad de los componentes a separar. Por otro lado, es importante considerar en el proceso de extracción el grado de molienda del material vegetal ya que a menor tamaño de partícula mayor eficiencia en el proceso de extracción (Krakowska-Sieprawska et al., 2022).

1.3.3. Relación material vegetal-solvente de extracción

La relación material vegetal- solvente utilizadas en el proceso de extracción, desempeña un papel crucial. Asimismo, el tamaño de partículas del material vegetal también es importante ya que a menor granulometría mayor superficie de interacción con el solvente y en consecuencia mayor eficiencia en el proceso de extracción (Norris, 2005; Sulaiman et al., 2017; Lück et al 2020; Kronograwa et al., 2022).

1.3.4. Solvente utilizado en el proceso de extracción

La elección del solvente empleado en el proceso de extracción es un factor clave para el éxito del proceso. Los distintos solventes tienen diferentes propiedades físicas tales como puntos de ebullición y presión de vapor, lo que determina la temperatura de extracción. La selección de un solvente adecuado permite la extracción a temperaturas que evitan la degradación o variación de los fitocomponentes (Ribeiro et al., 2018). Por otro lado, los diferentes solventes tienen distintas afinidades por fitoconstituyentes específicos, lo que genera diferencias en la eficiencia de extracción y la selectividad de diversos compuestos. La polaridad del solvente juega un papel importante en su capacidad para

disolver diversos tipos de compuestos. Los solventes polares como el agua o el etanol, son ideales para extraer compuestos polares como los compuestos fenólicos, mientras que los disolventes apolares u orgánicos, como el hexano, éter de petróleo o el cloroformo, permiten extraer compuestos apolares como los lípidos o los aceites esenciales. La solubilidad de los fitocomponentes, la polaridad, el punto de ebullición y la compatibilidad de los solventes también influyen en la capacidad de disolver y extraer constituyentes específicos. Un aspecto relevante para considerar es la posible toxicidad del solvente de extracción, tanto para el operador y el usuario del producto final como para el ambiente

1.3.5. Tiempo o duración de la extracción:

La cantidad y composición de los químicos bioactivos en el extracto pueden verse significativamente influenciadas por la duración del proceso de extracción. El tiempo óptimo de extracción proporciona tiempo suficiente para que el material vegetal en polvo esté en contacto con el disolvente para la transferencia de masa óptima de compuestos.

En ocasiones, extracciones más prolongadas pueden resultar en mayores rendimientos de los químicos deseados, ya que un mayor tiempo permite una mayor difusión de los compuestos desde el material vegetal al solvente. Sin embargo, podría haber un período de extracción ideal, después del cual la extracción adicional no tenga efecto sobre el rendimiento. Diversas sustancias pueden manifestar cinéticas de extracción distintas y su solubilidad y estabilidad pueden sufrir variaciones temporales. Teniendo en cuenta esto, es posible que la duración del procedimiento de extracción pueda influir en las cantidades proporcionales de los diferentes componentes del extracto obtenido (Fan et al., 2014).

Los períodos de extracción prolongados pueden provocar la degradación o el agotamiento de ciertos compuestos como consecuencia de factores como la luz, el calor, el tratamiento físico o la actividad enzimática. Por lo tanto, es fundamental minimizar la degradación de compuestos sensibles y maximizar la extracción de sustancias deseables.

1.3.6. Métodos de extracción

En particular, para la obtención de compuestos bioactivos a partir de matrices vegetales, las técnicas convencionales de extracción incluyen maceración, decocción, soxhlet e infusión. Muchas de ellas son recomendadas en farmacopeas oficiales nacionales como la Farmacopea Argentina (Farmacopea Argentina VII, 2003) o en métodos oficiales internacionales como la AOAC (Association of Official

Agricultural Chemists) (Luo et al., 2003; Uysal et al., 2017; Belwal et al., 2018). Los métodos de extracción convencionales suelen utilizar disolventes orgánicos o agua y requieren un gran volumen de disolventes y una extracción prolongada en el tiempo (Handa, 2008; Belwal et al., 2018; Yolci et al., 2019). Con el objetivo de optimizar la eficiencia, la estabilidad y la seguridad en los procesos de extracción de compuestos vegetales, en los últimos años se ha observado una tendencia creciente hacia la investigación y el desarrollo de nuevas metodologías y tecnologías extractivas. Las técnicas de extracción no convencionales, ya consolidadas en el ámbito científico, se orientan a minimizar el impacto ambiental asociado a estos procesos. En este contexto, la Química Analítica ha desempeñado un papel fundamental en las últimas décadas, impulsando el uso de métodos alternativos o no convencionales como la extracción asistida por ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos, cavitación, entre otros (Tabla1) (Cao et al., 2025).

Tabla 1: Metodologías convencionales y no convencionales de extracción de compuestos bioactivos a partir de plantas medicinales.

Técnicas convencionales	Técnicas	Descripción	Ventajas	Desventajas
	Maceración	Se coloca en contacto el material vegetal con el solvente y se deja reposar a temperatura ambiente con agitación frecuente.		-Grandes cantidades de solventes. -Generación de residuos (contiene solventes orgánicos) -Procedimientos largos
	Infusión	Las infusiones son preparadas macerando el material vegetal por un período corto de tiempo ya sea con agua hirviendo o fría. Éstas son consideradas soluciones diluidas de los constituyentes fácilmente solubles. La farmacopea argentina VII Edición establece un tiempo de 20 minutos, únicamente con agua hirviendo y sugiere una concentración de 5% p/v		-Por su naturaleza acuosa éstas tienden a sufrir contaminación microbiana por lo que es necesario usarlas antes de las 12 horas de preparada o almacenarlas a baja temperatura.

	Decocción	Se obtienen por acción del agua mantenida a ebullición sobre el material vegetal por un tiempo definido. Luego es enfriado, colado o filtrado con o sin presión. Este procedimiento es aplicado a compuestos solubles en agua y termoestables. -La farmacopea argentina VII Ed. establece un tiempo de 20 minutos y sugiere una concentración de 5 % p/v.	Metodologías sencillas, No requieren de equipamiento costoso Alta velocidad de extracción	-Los metabolitos deben ser termoestables.
	Soxhlet (extracción continua con calor)	El material vegetal finamente molido es colocado en una bolsa porosa de papel de filtro o celulosa ubicada en la cámara del Soxhlet. El solvente de extracción es calentado en el matraz y los vapores son condensados en el condensador. Las gotas caen y extraen por contacto con el material vegetal. Cuando el líquido contenido en la cámara llega al sifón, vuelve a comenzar el proceso. Se utilizan solventes orgánicos.	Requiere cantidades menores de solvente que la maceración. No requiere de filtrado posterior	-Exposición a emisiones tóxicas de solventes orgánicos. Largo tiempo de extracción. No es considerado amigable con el ambiente. -Se limita a muestras secas y finamente divididas. -Posibilidad de descomposición térmica de los compuestos.
	Ultrasonido (extracción asistida por ultrasonido o EAU)	Se basa en usar el ultrasonido (entre 20 kHz – 2000 kHz) para lograr un efecto mecánico de cavitación acústica que aumenta el contacto entre el solvente y la muestra. Además, al someterse la matriz vegetal a ultrasonido aumenta la permeabilidad de la pared celular	Reducción de tiempo y volumen de solvente	Se debe controlar la energía de ultrasonido para evitar generar radicales libres.

Técnicas no convencionales		facilitando la liberación de los compuestos de interés.		
	Microondas (Extracción asistida por microondas o EAM)	Esta técnica consiste en utilizar energía microondas para facilitar la partición de los analitos desde la matriz al solvente. La radiación interactúa con dipolos de materiales polares y con materiales polarizables (solventes y muestras) causando calor cerca de la superficie de los materiales. El calor es transferido por conducción. La rotación de los dipolos de las moléculas inducidas por las ondas electromagnéticas rompe enlaces puente hidrógeno aumentando el contacto solvente- matriz.	-Reduce tiempos de extracción y volumen de solvente. -Se ha informado aumento en la recuperación de analitos y en la reproducibilidad	-Se limita a moléculas pequeñas. -Se debe controlar la temperatura y ciclos para no generar degradación de moléculas activas.
	Fluidos supercriticos	Se emplea una sustancia que en condiciones de presión y temperaturas superiores a su punto crítico comparte propiedades con los líquidos y los gases, pudiendo actuar como solvente. El más usado es el CO ₂	Permite mayor selectividad y aumentar la eficiencia de extracción.	Equipamiento costoso.
	Pulso eléctrico	Aplica alto voltaje eléctrico para aumentar la permeabilidad de la membrana celular y facilitar el flujo hacia afuera de la célula	Emplea bajo costos de energía, mejora el rendimiento de la extracción con respecto a las técnicas convencionales, disminuye la degradación de sustancias sensibles al calor (técnica no térmica) y purifica la extracción sin impacto ambiental.	-Uso limitado para muestras sólidas y semisólidas, ya que el campo eléctrico atraviesa mejores sustancias líquidas.
	Extracción asistida por enzimas	Usa enzimas específicas para degradar la pared celular y favorecer la liberación de compuestos de interés	-Bajo consumo de solventes -Método respetuoso con el medio ambiente -Condiciones de procesamiento suaves.	- Elevados precios y restricciones en la disponibilidad comercial de ciertos tipos de enzimas.

	Extracción asistida mecanoquímica	Pulverización inducida por fuerza mecánica (molienda a alta velocidad) de los tejidos y las membranas celulares de los materiales vegetales, liberando las moléculas intracelulares.	-Aumenta el rendimiento de extracción y selectividad con respecto a las técnicas convencionales -Emplea bajas temperaturas, permitiendo la extracción de compuestos termolábiles -Utiliza agua como solvente en lugar de solventes orgánicos. -Reduce el tiempo de extracción.	-No se aplica en sustancias hidrófobas. -No es adecuada para la producción industrial.
--	-----------------------------------	--	---	---

Durante la optimización de un proceso de extracción, la selección de un solvente adecuado resulta esencial para obtener rendimientos satisfactorios. El agua y los solventes orgánicos, tales como etanol, metanol, isopropanol son los más comúnmente usados. Mientras que el agua es efectiva como solvente de extracción de metabolitos polares, los solventes orgánicos permiten extraer compuestos de distinta polaridad. Sin embargo, el uso de estos últimos está limitado debido a su alto costo, baja biodegradabilidad y toxicidad tanto para el operario como para el ambiente (Dai et al., 2013; Paiva et al., 2014).

En este contexto, la implementación de procesos libres de solvente sería ideal, sin embargo, ellos juegan un rol de suma importancia en la etapa de extracción (Vian et al., 2017). Por lo tanto, la búsqueda de alternativas sustentables a los solventes orgánicos se ha convertido en uno de los grandes desafíos de la Química Verde (Pena-Pereira et al., 2015).

1.4. Química analítica verde

La Química Analítica es la disciplina encargada de generar resultados que reduzcan al mínimo la incertidumbre asociada a la información cualitativa, cuantitativa y estructural de la materia, considerando su dimensión espacial y temporal.

Uno de los elementos fundamentales vinculados a esta disciplina es la elección de una metodología adecuada que permita obtener datos confiables y de alta calidad, con el fin de tomar decisiones fundamentadas respecto a un problema específico, de manera eficiente. Para alcanzar dicho objetivo,

una metodología analítica comprende una secuencia de etapas cuya cantidad y selección adecuada dependen de las características de la muestra como también de la respuesta que buscamos obtener. Los efectos adversos de la aplicación de procedimientos analíticos pueden causar daños al medio ambiente y graves riesgos para los operadores. Por lo tanto, es esencial considerar los efectos y las consecuencias de las acciones tomadas por los investigadores/usuarios de los métodos analíticos. Respetando el punto de vista de las personas que cuidan el medio ambiente y considerando los aspectos económicos de las metodologías analíticas, se debe prestar especial atención al riesgo inherente de algunos tipos de muestras, reactivos y solventes utilizados, el consumo de energía relacionado con la instrumentación avanzada y, sin duda, los desechos y emisiones de laboratorio resultantes de los numerosos pasos de las metodologías analíticas (Guardia y Garrigues, 2011).

Enmarcados en una tendencia mundial al desarrollo de procesos sostenibles y cuidado del medio ambiente, el desafío de actuar responsablemente compromete también al área de la Química. En los años 90 surge la Química Verde (QV) como una contribución de la comunidad química al desarrollo sustentable. En 1999 se propone que los principales objetivos de la QV son la reducción y, en el caso ideal, la eliminación del uso de reactivos tóxicos, así como también la disminución y eliminación de los residuos generados (Anastas, 1999). Mas tarde se establecieron los 12 principios de la QV, los cuales resaltan la necesidad de evitar el uso de reactivos tóxicos, reducir el consumo energético, la generación de residuos y buscar tanto el cuidado del operario como del ambiente, Tabla 2 (Anastas y Warner, 2000; Galuszka et al., 2012). Otros autores expresaron la problemática de la cantidad de solventes tóxicos usados y de residuos generados en procedimientos analíticos; incluso en aquellos servicios destinados a la detección de contaminantes ambientales, siendo esto una contradicción. Ante esta situación, proponen como principal estrategia la miniaturización de las metodologías para lograr la reducción de volúmenes (Guardia y Ruzicka, 1995).

Tabla 2. Principios de la Química Analítica Verde

PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA ANALÍTICA VERDE	
1	Aplicar técnicas analíticas directas para evitar el tratamiento de muestra.
2	Integrar procedimientos analíticos y operaciones.
3	Generar la mínima cantidad de residuos y tratarlos correctamente.
4	Ahorrar energía y reducir el uso de reactivos.
5	Seleccionar métodos automatizados y miniaturizados.
6	Evitar la derivatización.
7	Se debe proporcionar una gestión adecuada de los residuos analíticos.
8	Realizar mediciones in-situ.
9	Proteger al operador.
10	Se deben preferir los reactivos obtenidos de fuentes renovables.
11	Elegir métodos multianalito o multiparamétrico en lugar de los métodos que utilizan un solo analito.
12	Se deben eliminar o reemplazar los reactivos tóxicos.

Analizando el concepto de Química Analítica desde una perspectiva sustentable podemos decir que un “procedimiento analítico verde”, debe ser capaz de resolver un problema con el máximo nivel de confiabilidad, generando el mínimo impacto tanto medio ambiental como para el operario.

1.4.1. Solventes verdes

1.4.1.1. Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos (LI) se definen como líquidos compuestos por iones con un punto de fusión inferior a 100° C. Están formados por un catión orgánico y un anión que puede ser tanto inorgánico como orgánico, formando sales (líquidas) u óxidos. Entre sus componentes se encuentran derivados de imidazol, amonio, pirrol, piridina y fósforo acompañados de aniones orgánicos o inorgánicos. El primer LI (nitrato de etilamonio), cuyo punto de fusión es 12 °C, fue descrito por Paul Walden en 1914. Una de las propiedades que hacen especialmente atractivos a los LIs es su baja presión de vapor, por lo que se les considera disolventes no volátiles. Además, poseen otras ventajas atractivas tales como estabilidad química y térmica, no son inflamables, tienen alta conductividad y capacidad de solubilizar compuestos orgánicos. Tanto el anión como la longitud de la cadena n-alquil del catión afectan las propiedades fisicoquímicas (viscosidad, polaridad, etc), pudiendo estas ser modificadas variando la composición del solvente (Dai et al., 2013).

Aunque los líquidos iónicos han sido propuestos como una alternativa viable y eficiente frente a los solventes convencionales, su sustentabilidad ha sido objeto de un creciente escrutinio en los últimos años. Este cuestionamiento se fundamenta principalmente en las propiedades intrínsecas de los cationes y aniones comúnmente empleados en su síntesis, los cuales presentan limitaciones significativas para su implementación a gran escala debido a su toxicidad, elevado costo de producción y considerable impacto ambiental (Dai et al., 2013).

1.4.1.2. Solventes Eutécticos

Los solventes eutécticos profundos (DES, Deep eutectic solvent) surgen como alternativa a los LIs (Abbott et al., 2004). Estos autores demostraron que combinaciones de urea con sales de amonio cuaternarias sustituidas, tales como cloruro de colina, producían mezclas eutécticas líquidas a temperatura ambiente con propiedades interesantes como solventes (Abbott et al., 2003). En términos generales, un sistema eutéctico representa una mezcla de componentes que, en virtud de proporciones específicas, presentan el punto de fusión más bajo. Como se observa en el diagrama de fases (Figura 5), la temperatura y la proporción de los componentes son dos determinantes principales en un sistema eutéctico.

Estos componentes interactúan mediante fuerzas intermoleculares por puente hidrógeno. A diferencia de los líquidos iónicos a temperatura ambiente, estas mezclas eutécticas son fáciles de preparar en estado puro. No reaccionan con el agua, muchas son biodegradables y las propiedades toxicológicas de sus componentes están bien caracterizadas (Yang et al., 2018). Estos solventes pueden clasificarse en subgrupos de acuerdo con su origen o fuente de sus componentes o su propósito por ejemplo Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) or THEDESs (Therapeutic Deep Eutectic Solvents); (Giner et al., 2025). Los DES han demostrado una excelente capacidad de extracción de diferentes compuestos. A la hora de seleccionar un sistema DES adecuado, hay que tener en cuenta varios factores. En primer lugar, la combinación de aceptor y dador de puentes hidrogeno es crucial, como el cloruro de colina (ChCl) combinado con ácidos orgánicos o azúcares. Dependiendo de las combinaciones seleccionadas, se obtendrán mezclas hidrofóbicas o hidrofílicas. En segundo lugar, hay que determinar los compuestos que se van a extraer y sus características. Los compuestos polares, como los polifenoles, los flavonoides y los alcaloides, por ejemplo, prefieren los DES hidrofílicos debido a su alta polaridad y capacidad para formar enlaces de hidrógeno. Esto mejora la solubilidad y, por lo tanto, su capacidad de extracción. En el caso de los compuestos ácidos y los antioxidantes, las combinaciones con ácidos orgánicos favorecen la interacción con los grupos funcionales carboxilo e hidroxilo, mejorando así la

captura de estos compuestos bioactivos. Los compuestos de bajo peso molecular y los grupos funcionales hidroxilo/carbonilo prefieren los sistemas formados por ChCl y azúcares, ya que estos permiten extracciones compatibles con aplicaciones farmacéuticas y alimentarias debido a su baja toxicidad y biodegradabilidad. En el caso de compuestos aromáticos, se prefieren los DES hidrofóbicos, como los basados en fenoles, ya que permiten la extracción de compuestos menos polares, aunque se debe tener cuidado con la toxicidad y la aplicación final. Por último, hay que tener en cuenta el peso molecular, la polaridad y los grupos funcionales. Para maximizar la solubilidad, la polaridad de los sistemas debe ser similar a la de los compuestos objetivo, es decir, DES polares para compuestos polares y DES hidrofóbicos para compuestos no polares. Los grupos funcionales del soluto deben complementar la capacidad de enlace de hidrógeno del DES para mejorar su interacción y, por lo tanto, la extracción (Rodríguez-Llorente et al., 2020, Negi et al., 2024, Giner et al., 2025).

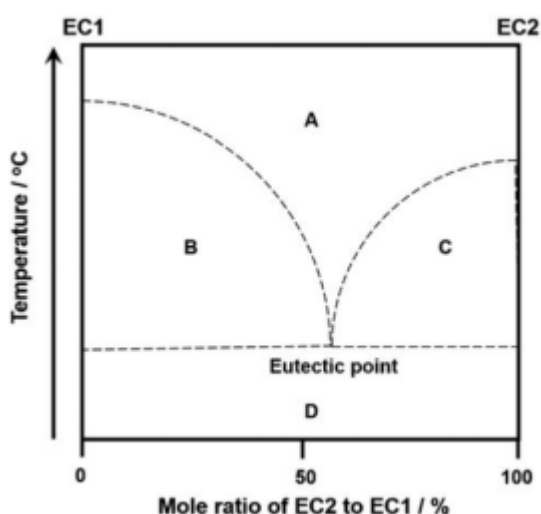


Figura 5: Diagrama esquemático del punto eutéctico en una fase de dos componentes (1 y 2), donde EC significa componente eutéctico. La curva discontinua representa los puntos de fusión de una familia binaria de NaDES bajo diferentes relaciones molares. Todos los medios líquidos unificados se ubican en A, mientras que las especies de NaDES aplicadas se encuentran a temperatura ambiente o inferior, formando parte de A. B y C representan las mezclas de EC1 y EC2 (sólido/líquido o líquido/sólido), y D es una mezcla de EC1 y EC2 (sólido/ sólido). El punto eutéctico es notable porque dos o más compuestos pueden combinarse en proporciones precisas y fortuitas para volverse mutuamente compatibles, de tal manera que reduce drásticamente el punto de fusión de la mezcla.

1.4.1.3. Solventes Eutécticos profundos Naturales (NaDES)

Cuando los compuestos que constituyen los DES son metabolitos primarios presentes en el metabolismo celular de todos los organismos vivos., a saber, aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares o derivados de la colina (Figura 6,7), los DES se denominan solventes eutécticos profundos naturales (NaDES). En este sentido, los NaDES se alinean con los principios de la Química Verde, por su naturaleza, bajo costo, fácil preparación y biodegradabilidad. Además de las ventajas ambientales ya mencionadas, los NaDES tienen propiedades fisicoquímicas muy útiles como disolventes, como puntos de fusión muy bajos, viscosidad ajustable y extremadamente baja presión de vapor con puntos de inflamación muy altos. Como disolventes, presentan una alta capacidad de solubilización de compuestos con un amplio rango de polaridad y una alta selectividad.

Debido a su naturaleza no tóxica, el interés por las aplicaciones de los NaDES en sectores como la industria alimentaria, agroquímica, cosmética y farmacéutica ha experimentado un notable crecimiento desde su introducción (Choi et al., 2011). Entre sus principales aplicaciones se encuentran la extracción de compuestos bioactivos a partir de plantas medicinales (Dai et al., 2013; Dai et al., 2016; Huang et al., 2018), la solubilización de principios activos farmacéuticos (Wikene et al., 2017; Hikmawanti et al., 2021; Mustafa et al., 2021; Chevé-Kools et al., 2025), la obtención de extractos vegetales destinados a formulaciones cosméticas (Jeong et al., 2017), su uso en formulaciones agroquímicas (Zahrina et al., 2018), así como su incorporación como aditivos saborizantes en productos alimenticios (González-Laredo et al., 2018).

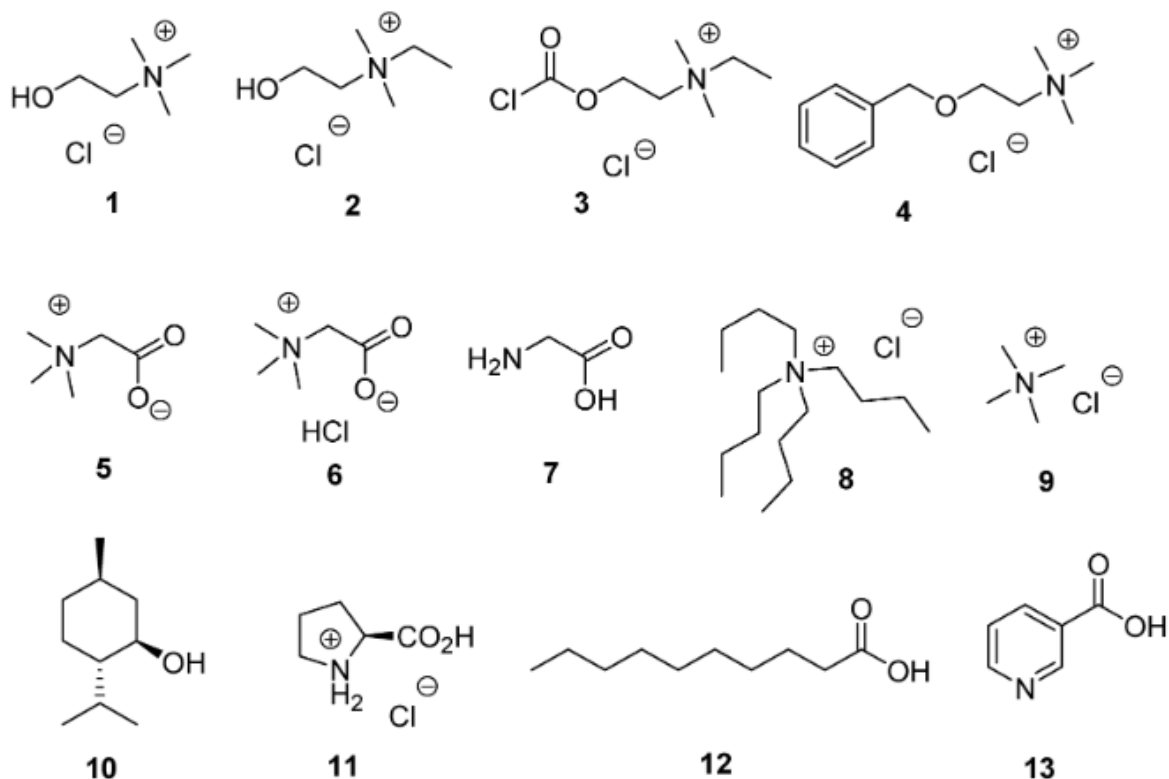


Figura 6. Estructura química de diferentes compuestos con capacidad de formar solventes eutécticos profundos naturales. Aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA) derivado de productos naturales utilizado en NaDES [Cloruro de colina (1), cloruro de (2-hidroxietil) etildimetilamonio (2), cloroformiato de cloruro de colina (3), cloruro de O -bencilcolina (4), betaína (5), clorhidrato de betaína (6), glicina (7), cloruro de tetrabutilamonio (8), cloruro de tetrametilamonio (9), mentol (10), clorhidrato de prolina (11), ácido decanoico (12), ácido nicotínico (13).

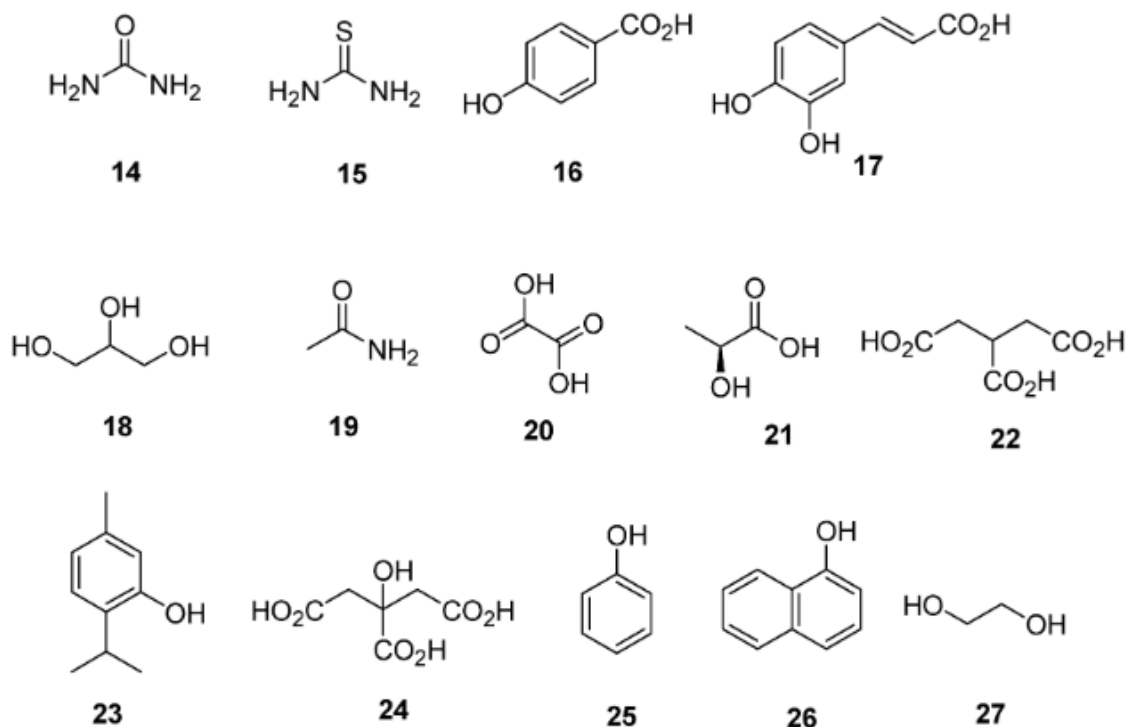


Figura 7. Estructura química de diferentes compuestos con capacidad de formar disolventes eutécticos profundos naturales. Donante de enlaces de hidrógeno (HBD) derivado de productos naturales utilizado en NADES [Urea (14), tiourea (15), ácido 4-hidroxibenzoico (16), ácido cafeico (17), glicerina (glicerol, 18), acetamida (19), ácido oxálico (20), ácido láctico (21), ácido propano-1,2,3-tricarboxílico (22), timol (23), ácido cítrico (24), fenol (25), α -naftol (26), etilenglicol (27), ácido malónico.

1.4.1.4. Preparación de los NaDES

Los NaDES son conocidos como solventes de diseño ya que, debido a la gran cantidad de combinaciones que pueden originarse, sus propiedades pueden ajustarse buscando la mezcla más adecuada para una determinada aplicación (Francisco et al., 2013; Paiva et al., 2014).

Se han informado diferentes combinaciones de NaDES como líquidos estables y pueden ser clasificadas en cuatro grupos: derivados de ácidos orgánicos, derivados de cloruro de colina, mezclas de azúcares y otras combinaciones.

La mayoría de las mezclas son constituidas por cloruro de colina con diferentes metabolitos, siendo con ácido láctico la más estudiada en diferentes ratios molares (1:1;1:2;1:3;1:4;1:5;1:9;2:1 y 3:1) (Espino et al., 2016).

Para su preparación, el NaDES se sintetiza habitualmente mediante seis métodos físicos:

a) Calentamiento y agitación: Los componentes de la mezcla son transferidos en un vaso de precipitado, sellado con papel aluminio. La mezcla se calienta (50-100°C) y se agita, hasta que se forma un líquido homogéneo (Dai et al., 2013).

b) Liofilización: Pesar cada componente con precisión y añadir una proporción molar específica de agua. Posteriormente, la mezcla se liofiliza y el agua se sublima para obtener NaDES en estado puro (Gutiérrez et al., 2009).

c) Evaporación: Los componentes son disueltos en agua y evaporados a 50 °C con un rotavapor. El líquido obtenido es colocado en un desecador hasta peso constante (Dai et al., 2013).

d) Síntesis asistida por ultrasonidos: En este procedimiento, las ondas sonoras causan cavitación, que consiste en la formación y colapso de burbuja (Rutkowska et al., 2017). Cuando la burbuja alcanza un tamaño crítico e implosiona, se produce una liberación abrupta de calor y presión muy elevados. La energía liberada facilita las interacciones entre los componentes, lo que lleva a la formación de los NaDES.

e) Síntesis asistida por microondas: Los componentes son sometidos a ondas electromagnéticas en microondas (180 W) por 30 segundos, lo que hace que este método sea muy rápido (Popovic et al., 2022)

El método de agitación y calentamiento ha sido el más ampliamente empleado en comparación con otras técnicas, presentando diversas adaptaciones en cuanto a tiempo y temperatura, en función de la naturaleza específica de los componentes que conforman el NaDES.

1.4.1.4.1. Estructura supramolecular y efecto de la dilución

La formación de DES depende de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre las especies constituyentes debido a la naturaleza química de los grupos funcionales predominantes en sus componentes (hidroxilo, carbonilo y carboxilo), y simultáneamente reducción de la red original de enlaces de hidrógeno existente entre los componentes individuales. Al introducir agua en el sistema, se rompen los enlaces de hidrógeno entre los componentes del DES y se forman nuevos entre ellos y el agua. La estructura supramolecular de los NaDES se debe principalmente a estos enlaces hidrógeno entre las moléculas, y las moléculas de agua fuertemente unidas (Dai et al., 2013), la cual, está determinada por la naturaleza química de los constituyentes que forman la mezcla y su relación molar específica.

Con el fin de explorar y conocer la estructura de los NaDES, se han utilizado técnicas tales como Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) (Liu et al., 2018).

Se ha demostrado que el agua puede encontrarse formando parte de la red supramolecular, ya sea desde su preparación o por posteriores diluciones del solvente. Se han llevado a cabo numerosas investigaciones, tanto teóricas como experimentales, para estudiar el efecto del agua sobre la nanoestructura de los NaDES (Tiecco et al., 2019). El gradual cambio en su estructura durante la dilución puede afectar las propiedades fisicoquímicas de los NaDES, (viscosidad, conductividad, densidad y polaridad), lo que luego se puede adaptar controlando la cantidad de agua agregada (Tiecco et al., 2019). Sin embargo, se ha determinado que la incorporación progresiva de agua puede conducir a la desestabilización de la supraestructura. El límite de agua que puede añadirse sin provocar dicha alteración está condicionado por la composición particular de cada sistema NaDES.

Se estudió el efecto de la adición de agua sobre la nanoestructura de varios DES basados en cloruro de colina. Estos estudios parecen indicar una ruptura progresiva de los enlaces de hidrógeno durante la dilución, pero la estructura supramolecular de los DES se conserva hasta un 50% de adición de agua (Gabriele et al., 2019).

1.4.1.4.2. Propiedades físicas y toxicidad

Los NaDES, son disolventes químicamente adaptables; es decir, sus propiedades fisicoquímicas pueden ajustarse con precisión modificando su composición, como la elección de los componentes y sus proporciones molares, para una aplicación específica. Estos solventes presentan ventajas como la escasa volatilidad y bajo punto de solidificación (menor a 0 °C) lo que permite que sean usados como solventes en diferentes áreas, especialmente en procesos de extracción, sin embargo, uno de los grandes obstáculos es su elevada viscosidad, inclusive mayor, a la de muchos disolventes orgánicos convencionales. La elevada viscosidad de todos los DES y NaDES, resulta principalmente de la extensa red de enlaces hidrógeno dentro de la mezcla eutéctica y, en menor medida, de las interacciones de van Der Waals y electrostáticas. Esta se puede reducir significativamente elevando la temperatura o el contenido de agua (Al-Wahaibi et al., 2012; Zhao et al., 2015; Xin et al., 2017). La conductividad de los NaDES también puede ser ajustada con el contenido de agua y la temperatura (Abbott et al., 2011, Zhao et al., 2015). Otra propiedad fisicoquímica susceptible de ser modificada es la polaridad del disolvente. En este sentido, para aplicaciones en procesos de extracción, es posible formular NaDES con un mayor

contenido de agua que presenten un mejor desempeño en la extracción de compuestos polares, mientras que sistemas con menor proporción de agua resultan más adecuados para la recuperación de compuestos de baja polaridad (Dai et al., 2013).

Dado el origen natural de la mayoría de sus componentes y su baja toxicidad, los disolventes eutécticos profundos suelen presentar una escasa peligrosidad. No obstante, considerando su potencial uso en la industria farmacéutica y en la producción de alimentos, diversos estudios se han enfocado en evaluar los posibles riesgos asociados a su aplicación (Wen et al. 2015, Hayyan et al. 2016, Radošević et al. 2016).

1.5. Micosis humana

Las infecciones fúngicas o micosis causan una amplia gama de enfermedades en humanos. La extensión de las micosis varía desde infecciones superficiales que afectan la capa externa del estrato córneo de la piel hasta infecciones diseminadas que afectan el cerebro, el corazón, los pulmones, el hígado, el bazo y los riñones. Se pueden clasificar según el sitio de infección, la vía de adquisición y el tipo de virulencia. Cuando se clasifican según el sitio de infección, las infecciones fúngicas se designan como superficiales, cutáneas, subcutáneas y profundas (Walsh y Dixon, 1996)

1.5.1. Onicomycosis

La onicomycosis es la infección fúngica de uñas más común a nivel mundial, que causa decoloración y engrosamiento de la lámina ungueal afectada. La mayoría de las onicomycosis son causadas por dermatofitos pertenecientes a tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. Varios hongos pueden ser agentes causales, pero tres especies predominan a nivel mundial: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *E. floccosum*. El resto se origina a partir de mohos no dermatofitos como *Scopulariopsis* y *Scytalidium hyalinum* y levaduras, siendo *Candida* spp, la especie más frecuente.

La onicomycosis puede ocurrir a cualquier edad, aunque se vuelve cada vez más común en ancianos, en quienes la prevalencia continúa siendo alta (Elewski y Charif, 1997; Gupta, 2000; Vasconcellos et al., 2013). Aquellos con trauma persistente en la uña, los pacientes con psoriasis, diabetes, HIV, con mala circulación periférica, inmunosupresión y los fumadores también son especialmente susceptibles (Gupta et al., 1997; Elewski, 1998).

Típicamente, la onicomycosis se presenta como una coloración blanca o amarillenta-marrón de la uña (Allevato et al., 2010; Thomas et al., 2010). También se ha observado coloración violácea, verde y negra de la placa ungueal (Thomas et al., 2010; Lipner y Scher, 2019; Monteagudo et al., 2019). El

dermatofitoma que se presenta como bandas lineales, únicas o múltiples, blancas, amarillas, anaranjadas o marrones en la placa ungueal es específico de la onicomycosis. En general, las uñas de los pies se ven afectadas con una frecuencia de siete a diez veces mayor que las de las manos.

La onicomycosis puede dividirse en los cinco subtipos clínicos:

Onicomycosis subungueal lateral distal

La onicomycosis subungueal lateral distal es el subtipo clínico más común (Loo, 2007; Seebacher et al., 2008; Shemer, 2012; Goldstein y Bhatia, 2019), suele estar causado por *Trichophyton rubrum* y, con menor frecuencia, por *Trichophyton mentagrophytes* (Goldstein y Bhatia, 2019, Grove y Khurana, 2012, Shemer, 2012). Clínicamente, la onicomycosis subungueal lateral distal se presenta como una coloración amarillenta, blanquecina o pardusca del ángulo distal de la uña.

Onicomycosis subungueal proximal

La onicomycosis subungueal proximal se desarrolla cuando el hongo invade la superficie inferior del pliegue ungueal proximal en la proximidad de la cutícula y luego se extiende distalmente (Lipner y Scher, 2015; Goldstein y Bhatia, 2019). Este subtipo clínico suele estar causado por *Trichophyton rubrum* y *Fusarium* spp. (Shemer, 2012). Clínicamente, la onicomycosis subungueal proximal se presenta como un área de leuconiquia en la lámina ungueal proximal y se desplaza distalmente con el crecimiento ungueal (Grove y Khurana, 2012).

Onicomycosis endonyx

La onicomycosis endonyx es causada por una infección fúngica de la placa ungueal sin infección del lecho ungueal (Shemer, 2012; Lipner y Scher, 2015,2019; Piraccini y Alessandrini, 2015). Este subtipo clínico suele estar causado por *Trichophyton soundanense* y *Trichophyton violaceum* (Shemer, 2012; Piraccini y Alessandrini, 2015; Lipner y Scher, 2019). Clínicamente, la onicomycosis endonyx se caracteriza por manchas lechosas en la placa ungueal, hendiduras y división lamelar (Westerberg y Voyack, 2013; Piraccini y Alessandrini, 2015; Lipner y Scher, 2019).

Onicomycosis distrófica total

La onicomycosis distrófica total se caracteriza por la destrucción total de todo el aparato ungueal y suele ser la etapa final de la onicomycosis, que puede presentarse después de cualquiera de los otros subtipos (Grove y Khurana, 2012; Shemer, 2012; Lipner y Scher, 2015;). Clínicamente, la onicomycosis distrófica total se presenta con una placa ungueal gravemente distrófica y desmenuzada, amarillenta, difusamente engrosada y friable (Grove y Khurana, 2012).

Onicomycosis superficial blanca

En la onicomycosis superficial blanca, la superficie superior de la placa ungueal se ve afectada por el hongo, en particular *Trichophyton*. Típicamente, la onicomycosis superficial blanca se presenta como puntos o manchas blancas en la superficie de la placa ungueal (Grove y Khurana, 2012; Shemer, 2012; Goldstein y Bhatia, 2019).

1.5.2. Terapias para tratar la onicomycosis

El tratamiento de la onicomycosis es difícil debido al conocimiento inadecuado de la fisiopatología subyacente y otros factores, como el patrón de crecimiento fúngico y la susceptibilidad del paciente.

Existen varias opciones de tratamiento para esta patología, incluyendo antimicóticos orales, tópicos y dispositivos. Los antifúngicos tópicos actúan sobre el hongo desde el exterior, penetrando desde la placa ungueal dorsal, mientras que los medicamentos sistémicos actúan desde el interior, penetrando desde la placa ungueal ventral. Los láseres son terapias basadas en dispositivos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) para la eliminación temporal o la mejora de las uñas. La erradicación de hongos probablemente se realiza mediante calor en los sistemas láser infrarrojos; su eficacia se ha confirmado mediante termografía, histología y microscopía electrónica (Nair et al., 2011; Nenoff et al 2014; Nematollahi et al., 2015)

Tratamiento oral

Los medicamentos sistémicos administrados por vía oral se utilizan para tratar la onicomycosis debido a su accesibilidad, costo relativamente bajo y eficacia. Se incluyen antimicóticos como griseofulvina, ketoconazol, itraconazol, fluconazol y terbinafina (Gupta et al., 2001). Dado que el crecimiento de las uñas es lento, el tratamiento con antimicóticos orales requiere una duración prolongada, esto puede provocar efectos secundarios importantes e interacciones farmacológicas. En la Tabla 3 se detallan el mecanismo de acción, el espectro de actividad y la dosificación de los antimicóticos.

Tabla 3: Terapias orales para el tratamiento de la onicomicosis.

Drogas	Mecanismo	Actividad	Dosis	Descripción	Referencia
Griseofulvina	Produce la inhibición de la síntesis fúngica de ácidos nucleicos y de la producción de la pared celular.	Muestra acción fungistática y no fungicida contra <i>Trichophyton</i> , <i>Epidermophyton</i> y <i>Microsporum</i> .	500 mg/día en adultos durante 6-8 meses y 12-18 meses para las uñas de las manos y de los pies respectivamente.	Requiere largos períodos de tratamiento (9 años para las infecciones de las uñas de los pies). Bajas tasas de curación y altas tasas de recaída	Roberts et al., 2003.
Ketoconazol	Actúa inhibiendo la síntesis del ergosterol, un componente esencial de la membrana celular de los hongos.	Muestra acción fungistática frente a <i>Candida</i> y dermatofitos.	200 mg al día.	Debido a la hepatotoxicidad, se evita su utilización en tratamientos de la onicomicosis.	Markinson et al., 1997.
Itraconazol	Inhibe la enzima 14 α -desmetilasa, la cual altera la biosíntesis de la membrana celular fúngica.	Su actividad antifúngica es más amplia que la de la terbinafina, siendo eficaz contra dermatofitos, levaduras y no dermatofitos.	200 mg diarios durante 12 semanas y 6 semanas para las uñas de los pies y de las manos respectivamente.	La tasa de curación micológica de las uñas de los pies es del 54% y la tasa de curación completa es del 14%.	Gupta et al., 2013.
Fluconazol	Compuestos azólicos responsables de la inhibición del citocromo P450 14 α -desmetilasa, necesaria para la conversión de lanosterol en ergosterol.	Muestra actividad frente a algunos dermatofitos y especies de <i>Candida</i> .	150 mg, 300 mg o 450 mg una vez a la semana durante 12 meses.	Mostraron altas tasas de curación micológica (47 % - 62 %) y tasas de curación clínica (28 % - 36 %) en comparación con placebo.	Brown, 2009

Terbinafina	Inhibe la enzima escualeno epoxidasa, inhibiendo así el desarrollo funcional de la membrana celular fúngica	Muestra una fuerte actividad antifúngica contra dermatofitos como <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Trichophyton rubrum</i> . No es tan eficaz como los azoles contra la onicomycosis por <i>Candida</i>	250 mg diarios durante 6 o 12 semanas, para infecciones de uñas de manos y pies, respectivamente.	La tasa de curación micológica para las uñas de los pies es del 70% y la tasa de curación completa es del 38%.	Gupta y Gregurek-Novak, 2001. Evans, 2003.
-------------	---	--	---	--	--

Existen efectos secundarios asociados con la medicación administrada en forma oral, predominantemente síntomas gastrointestinales, hepatotoxicidad, dolores de cabeza y erupciones cutáneas, pero éstos generalmente no se consideran lo suficientemente graves como para suspender el tratamiento. Los pacientes pueden experimentar con poca frecuencia pérdida o cambio del gusto (Walters et al., 1985; Gunt y Kasting, 2007).

Tratamiento tópico

Debido a los posibles efectos secundarios sistémicos de los antimicóticos orales, ha aumentado la demanda de opciones tópicas con efectos secundarios mínimos y sin interacciones farmacológicas. La administración del fármaco a través de la placa ungueal se denomina administración transungueal.

La Tabla 4 detalla el mecanismo de acción, el espectro de actividad y el tratamiento de las soluciones y lacas ungueales disponibles en el mercado para el tratamiento tópico.

Tabla 4: Formulaciones antimicóticas tópicas disponibles para el tratamiento de la onicomycosis.

Antifúngico	Acción	Actividad	Tratamiento
Amorolfina laca de uña 5% p/v	La amorolfina es un fármaco morfolino que inhibe las enzimas fúngicas $\Delta 14$ reductasa y $\Delta 7$ - $\Delta 8$ isomerasa, lo que interfiere con las vías de síntesis de esteroides fúngicos.	Es eficaz contra dermatofitos, algunas levaduras y mohos.	Una vez por semana durante 6 y 9-12 meses para las uñas de las manos y de los pies respectivamente.
Solución de tioconazol 28% p/v	Es un compuesto triazólico responsable de la inhibición del citocromo-P450, que está presente en la biosíntesis del ergosterol.	Muestra un amplio rango de actividad contra especies de <i>Candida</i> y algunos de los dermatofitos.	6-12 meses.
Laca de ciclopirox 8% p/v	Una hidroxipiridona que es responsable de la inhibición de enzimas dependientes de metales al unirse con cationes trivalentes como Fe^{3+}	Muestra un amplio espectro de acción contra dermatofitos y mohos no dermatofitos.	Una vez por semana durante 6 meses y 1 año para las uñas de las manos y de los pies, respectivamente.
Solución de efinaconazol 10% p/v	Es un triazol que inhibe la lanosterol 14α -desmetilasa e interrumpe la síntesis de ergosterol en la membrana celular fúngica.	Muestra un efecto potente contra <i>Trichophyton</i> , <i>Epidermophyton</i> , <i>Microsporum</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Pseudallescheria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Scopulariopsis</i> , <i>Candida</i> .	Una vez por semana durante 1 año para las uñas de los pies.
Solución de tavaborol 5% p/v	Es un fármaco a base de boro que inhibe la síntesis de proteínas fúngicas en el punto	Muestra propiedad antifúngica hacia <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton</i>	Una vez por semana durante 1 año para las uñas de los pies

	de la leucil-ARN sintetasa citosólica.	<i>mentagrophytes y algunas otras especies como Epidermophyton floccosum, Fusarium solani, Malassezia spp. Microsporum canis, Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus fumigatus, Candida spp.</i>	
--	--	---	--

Otro estudio señaló que los esmaltes de uñas, las pastas, los geles y las cremas pueden utilizarse para aplicación tópica. Sin embargo, las formulaciones en solución han demostrado ventajas importantes frente a estas presentaciones convencionales. Diversos trabajos destacan que soluciones como efinaconazol al 10 % poseen baja afinidad por la queratina, lo que facilita una mayor penetración transungueal y una llegada más eficiente del fármaco al lecho ungueal, traduciéndose en tasas de curación micológica significativamente superiores a placebo (Elewski et al., 2015). De manera similar, la solución de tavaborol al 5 % ha mostrado mayor eficacia clínica y micológica que su vehículo, manteniendo el beneficio terapéutico incluso tras finalizar el tratamiento (Rock et al., 2015; Lahfa et al., 2017). A diferencia de pastas y geles (que no garantizan una distribución uniforme y requieren un apósito para permanecer en la zona específica), las soluciones permiten una aplicación homogénea, mejor aceptabilidad cosmética y no necesitan oclusión, constituyendo así una alternativa tópica más ventajosa (El-Sherif et al., 2018).

1.5.3. Productos antifúngicos naturales

Tomando en cuenta el aumento de la prevalencia de la onicomycosis en la población y los efectos adversos que presentan los medicamentos administrados en forma oral, es necesario el desarrollo de nuevos recursos terapéuticos de administración tópica y que tengan un menor riesgo de producir efectos adversos y de interactuar con otros medicamentos.

Los antimicóticos herbales son una alternativa terapéutica más económica, segura y ampliamente disponible para la onicomycosis. Se ha demostrado que los extractos de diversas especies vegetales tienen actividad antimicótica, incluyendo acciones contra dermatofitos, mohos no dermatofitos y levaduras (Biasi-Garbin et al., 2016). Se han realizado estudios tanto de cribado aleatorio (Quiroga et al., 2001; Lima et al., 2011) como basados en un enfoque etnofarmacológico (Zacchino et al., 1998;

Muschietti et al., 2005; Petenatti et al., 2008). Uno de los antifúngicos naturales más empleados en la actualidad frente a dermatofitos es *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) cuyo principio activo es el terpinen 4-ol (Mingorance Álvarez et al., 2024). Otros trabajos informan compuestos antifúngicos frente a dermatofitos (Figura 8) tipo flavonoides de *Heterothalamus alienus* (Pacciaroni et al., 2008), compuestos tipo cumarina prenilada de *Baccharis darwinii*, recolectada en la provincia de Chubut, tiofenos de *Tagetes mendocina* (Lima et al., 2009), xantonas de *Gentianella multicaulis* (Lima et al. 2012), fitolacosido B de *Phytolacca tetramera* Hauman (Hernández et al., 1998; Escalante et al., 2002, 2008), 2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona de *Polygonum ferrugineum* (López et al., 2011), 2',4'-dihidroxichalcona y 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona de *Zuccagnia punctata* (Svetaz et al., 2007; Agüero et al., 2010; Nuño et al., 2014; Moreno et al., 2018), el ácido 3'-metil nor-dihidroguaiarético de *Larrea nitida* (Agüero et al., 2011), entre otros.

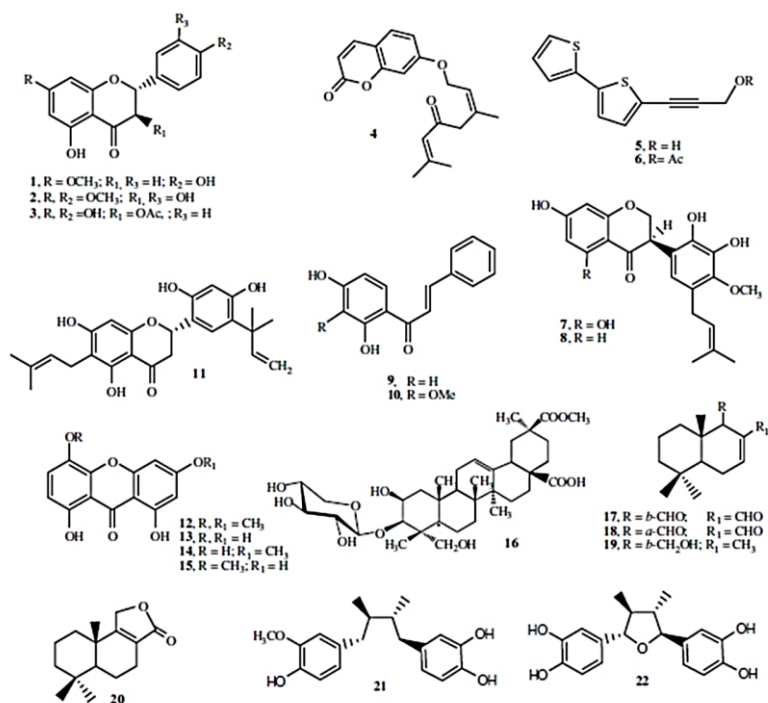


Figura 8: Compuestos antifúngicos aislados de plantas medicinales: 1. sakuranetina; 2. (2R,3R)-dihidroquercetina-7,4'-dimetil éter ; 3. 3-acetoxi-5,7,4'-trihidroxiflavanona; 4. 5'-oxoaurapteno; 5. 5-(4-hidroxi-1-butilil)-2,2'-bitienil; 6. 5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitiofeno; 7. y 8. 5'-prenilisoflavanonas; 9. 2',4'-dihidroxichalcona y 10. 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona; 11. pinocembrina; 12-15. xahantonas; 16. fitolacósido B; 17. poligodial; 18. isopoligodial ; 19. Drimenol; 20. confertifolin; 21. ácido 3'-metil nor-dihidroguaiarético; 22. meso-7S,(8S,70R,80R)-3,4,3',4'-tetrahidroxi-7,7'-epoxilignano.

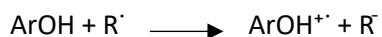
1.5.4. Procesos oxidativos en la onicomicosis

La onicomicosis es una infección crónica de las uñas causada principalmente por dermatofitos, levaduras y mohos no dermatofíticos. Si bien tradicionalmente se la ha abordado desde el punto de vista infeccioso, en los últimos años se ha propuesto que esta patología también involucra procesos de estrés oxidativo en el huésped (Metin et al., 2021; Erduran et al., 2023). Durante la infección, la interacción entre el hongo y el tejido ungueal desencadena una respuesta inflamatoria local, con liberación de especies reactivas de oxígeno (EROs) como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el anión peróxido (O_2^{2-}), el radical perhidroxilo ($HO_2^{\bullet}$) y el radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$) y compuestos no radicales, tales como peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el oxígeno singlete ($^1O_2$), el ozono (O_3) y el ácido hipocloroso (HClO). La producción excesiva de las EROs o la insuficiencia de los sistemas antioxidantes endógenos pueden alterar el equilibrio redox y provocar daño oxidativo en lípidos, proteínas y estructuras queratínicas de la uña (Metin et al., 2021). Diversos estudios han evidenciado alteraciones en biomarcadores oxidativos en pacientes con onicomicosis, como un desplazamiento de la homeostasis tiol/disulfuro hacia un estado más oxidado y un incremento en los niveles séricos de ceruloplasmina, lo que refuerza la hipótesis de que la infección fúngica induce un entorno prooxidante (Metin et al., 2021; Erduran et al., 2023). Además, los propios hongos patógenos expresan enzimas antioxidantes que les permiten adaptarse y resistir al estrés oxidativo generado por el sistema inmune del huésped (Martins et al., 2015; Petrucelli et al., 2024). En conjunto, estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo constituye un componente relevante en la fisiopatología de la onicomicosis y podría representar un blanco terapéutico complementario, especialmente en estrategias que integren compuestos con propiedades antioxidantes.

1.5.5. Compuestos fenólicos como antioxidantes naturales

Los compuestos polifenólicos son sustancias ampliamente distribuidas en la naturaleza, relacionadas con la supervivencia de las plantas y la perpetuación de la especie. Varios estudios asociaron la estructura química de los compuestos fenólicos con la actividad antioxidante, especialmente por el número y la posición de los grupos hidroxilos y la presencia de un anillo aromático (Leopoldini et al., 2011). La presencia del núcleo fenólico actúa reduciendo y quelando los iones férricos que catalizan la peroxidación lipídica y sequestran radicales libres, desactivando especies reactivas de oxígeno tales como oxígeno singlete, radical hidroxilo, anión superóxido (Zampini et al., 2008, 2012; Leopoldini et al., 2011; Quiñones et al., 2012; Roleira et al., 2015; Esfanjani y Jafari, 2017; Bernstein et al., 2018), cediendo

un protón o un electrón, interrumpiendo la propagación de la reacción en cadena. Los mecanismos de acción de inactivación de radicales libres se expresan a continuación, donde ArOH representa la molécula antioxidante y R[•] el radical libre:



Los intermediarios formados por la acción de los antioxidantes fenólicos (ArO[•] y ArOH^{•+}) son relativamente estables debido a la resonancia del anillo aromático presente en la estructura de estas sustancias (Leopoldini et al., 2011). Asimismo, los compuestos fenólicos pueden actuar como inhibidores de enzimas prooxidativas, tales como la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa y la xantina oxidasa, lo que contribuye a limitar la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroperóxidos orgánicos (López-Alarcón y Denicola, 2013).

Es importante destacar que algunos polifenoles pueden actuar como antioxidantes/ prooxidantes dependiendo de la concentración y de la disponibilidad de estos en el organismo, así la exposición a altos niveles de polifenoles puede originar especies reactivas de oxígeno, tales como oxígeno singlete que puede provocar daño en el material genético (López-Alarcon y Denicola, 2013; Fernandes et al., 2018).

Dentro de las especies vegetales con demostrada capacidad antimicótica y antioxidante se encuentra *Zuccagnia punctata* como se menciona en el punto 1.5.3.

1.6. *Zuccagnia punctata*

Zuccagnia punctata Cav. (Fabaceae, Caesalpiniaceae), conocida vulgarmente como “jarilla pispito”, “jarilla macho”, “jarilla poposa”, “pus pus” o “lata”, constituye una especie endémica de Argentina que integra un género monotípico. Etimológicamente, *Zuccagnia* está dedicada al físico y botánico italiano Attilio Zuccagni (1754-1807). Se trata de una planta típica de ambientes áridos, adaptada a condiciones xerofíticas y representativa de la Provincia Biogeográfica del Monte, donde forma parte de la vegetación característica de matorrales y estepas arbustivas propias de esta región (Cabrera y Willink 1973; Cabrera 1976; Zuloaga y Morrón 1999; Ulibarri 2005). Esta especie está ampliamente distribuida en el oeste de Argentina (Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza y provincia de San Luis) de 700 a 2700 m.s.n.m. (Figura 9) (Cabrera y Willink 1973; Cabrera 1976; Burkart et al. 1999; Zuloaga y Morrón 1999; Ulibarri 2005). *Z. punctata* ha sido incluida en la lista roja preliminar de plantas en peligro de extinción, en la categoría 3 (Norma RE-84-2010-SADS).

Descripción morfológica

Z. punctata es un arbusto aromático y glutinoso que alcanza entre 1 y 2,5 m de altura (Figura 9). Presenta hojas resinosas, pseudoparipinnadas, de 3 a 5 cm de longitud, con 5 a 13 pares de folíolos subopuestos, de morfología nanófila, ápice acuminado, base redondeada y margen entero (Lersten y Curtis, 1996; Mercado et al., 2013). Su período de floración se extiende de agosto a marzo, mientras que la fructificación ocurre de noviembre a abril (Ulibarri, 2005). Las flores, de color amarillo-anaranjadas (Figura 9), poseen un cáliz embudiforme con cinco sépalos, una corola compuesta por cinco pétalos libres y diez estambres igualmente libres (Burkart et al., 1999; Zuloaga y Morrone, 1999; Ulibarri, 2005). Los frutos son capsulares, indehiscentes, coriáceos, de color pardo-rojizo, con forma ovoide-aguda, oblicuos, comprimidos y estipitados (Figura 9) (Burkart et al., 1999; Zuloaga y Morrón, 1999; Ulibarri, 2005). Las semillas son de contorno ovoide, aplanadas y de tonalidad castaña. La especie desarrolla su período de fructificación entre los meses de noviembre y abril (Mercado et al., 2013).

Usos tradicionales

Las preparaciones tradicionales obtenidas a partir de las partes aéreas de *Z. punctata*, tanto en infusión y decocción como mediante maceración etanólica, con o sin la presencia de flores o frutos, han sido empleadas extensamente en la medicina popular argentina con fines antisépticos y rubefacientes, así como en el tratamiento de afecciones bacterianas y fúngicas, asma, artritis, reumatismo, procesos inflamatorios y neoplásicos (Ratera y Ratera, 1980; Toursarkissian, 1980; Del Vitto et al., 1997; Ortega et al., 2000; Carabajal et al., 2020a). Además, los tallos son aprovechados en la construcción de techos de viviendas rurales (Ulibarri, 2005; Carabajal et al., 2020a) y en la tinción artesanal de lana, confiriéndole tonalidades grisáceas o plumizas (Ratera y Ratera, 1980; Toursarkissian, 1980; Barboza et al., 2009). La resina foliar, por su parte, fue históricamente empleada en prácticas rituales de momificación y conservación de restos humanos (Diario Chilecito, 2019). Esta especie carece de antecedentes de toxicidad en su uso tradicional por lo que los productos derivados de ella podrían ser considerada como Medicamentos herbarios de uso tradicional definido de acuerdo a ANMAT como aquel medicamento que empleado en las condiciones de uso y posología tradicionales, demuestre poseer efectos farmacológicos verificables, que carece de efectos nocivos, teniendo en cuenta la experiencia adquirida durante los años de su utilización (ANMAT RES5818-2015). Más recientemente, *Z. punctata* ha sido reconocida como una especie vegetal de relevancia económica en Argentina por sus potencialidades

funcionales (Cantero et al., 2019). Álvarez et al. (2024) han descrito un método de micropropagación para *Z. punctata*.

Composición química y actividades biológicas

Se ha demostrado que los extractos etanólicos y metanólicos de las partes aéreas de *Z. punctata* contienen altas cantidades de compuestos fenólicos. Se identificaron chalconas como 2',4'-dihidroxi 3'-metoxichalcona (DHMC), 2',4',4'-trihidroxi-6'-metoxichalcona, 2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona (DHC), 2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona, hexósido de trihidroxidihidrochalcona; flavonas como 3,5,7-trihydroxiflavona (galangina), 3,5-dihidroxi-7-metoxiflavona (izalpinina), 3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona (ramnocitrina), 3-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona, 3,7-dihydroxiflavona (3,7-DHF). Además, se identificaron flavanonas como la 7-hidroxi-7-metoxiflavanona (7-HF), la 5,7-dihydroxiflavanona (pinocembrina), la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (pinostrobin), la 7-hidroxi-8-metoxiflavanona; derivados del ácido cafeico como el cafeato de 1-metil-3-(4'-hidroxifenil)-propilo y el cafeato de 1-metil-3-(3',4'-dihydroxifenil)-propilo; ácido quínico; ácido galoilquínico y derivados de catequina (Pederiva et al., 1975; Pederiva y Giordano, 1984; Ortega et al., 2000; Svetaz et al., 2004; Morán Vieyra et al., 2009; Agüero et al., 2010). La chalcona DHC fue el principal constituyente de los extractos de infusión, etanólico, metanólico y diclorometano (DCM) y podría considerarse un marcador químico de *Z. punctata* (Svetaz et al., 2004; Zampini et al., 2005; Nuño et al., 2014; Moreno et al., 2018; Carabajal et al., 2020a). El análisis histoquímico de hojas reveló una alta acumulación de chalconas en la superficie foliar. En consecuencia, se ha propuesto que las chalconas pudieran actuar como mecanismos de defensa contra la radiación UV para la protección de los tejidos fotosintéticos. Éstas, han recibido atención debido a sus interesantes propiedades biológicas, como sus actividades antioxidantes, citotóxicas, anticancerígenas, antimicrobianas, antiprotzoarias, antiulcerosas, antihistamínicas y antiinflamatorias, para el tratamiento del cáncer y trastornos cardiovasculares (Batovska y Todorova, 2010). Otros autores informaron que son potentes inhibidores de la α -glucosidasa, la α -amilasa y la lipasa, así como agentes cardiovasculares (Mahapatra et al., 2015; Mahapatra y Bharti, 2016; Cai et al., 2017; Bale et al., 2018). El extracto etanólico de las partes aéreas de *Z. punctata* presentó actividad contra bacterias Gram negativas multirresistentes a antibióticos aisladas de lesiones humanas, tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Zampini et al., 2005). Asimismo, se evidenció una marcada actividad antifúngica de los extractos orgánicos polifenólicos obtenidos de *Z. punctata* frente a cepas de hongos dermatofitos frecuentemente asociados a infecciones cutáneas, tales

como *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*. Dicho efecto se ha relacionado principalmente con la presencia de las chalconas DHC y DHMC como compuestos bioactivos responsables de la actividad observada (Svetaz et al., 2007; Svetaz et al., 2010; Agüero et al., 2010). Se informó, además, el efecto de *Z. punctata* frente a levaduras patógenas humanas (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Cryptococcus neoforms*) (Svetaz et al., 2007; Svetaz et al., 2010; Agüero et al., 2011; Moreno et al., 2018). La actividad antifúngica se atribuyó a DHC (Svetaz et al., 2007; Agüero et al., 2011; Nuño et al., 2014, 2015; Moreno et al., 2018).

Por otro lado, los extractos hidroalcohólicos de las partes aéreas de *Z. punctata* y de sus compuestos aislados, como 7-HF, DHC y 3,7-DHF, demostraron actividad antioxidante (Ávila et al., 2001; Morán Vieyra et al., 2009; Moreno et al., 2018). Las infusiones elaboradas a partir de *Z. punctata*, así como las combinaciones con *Larrea cuneifolia* y *L. divaricata*, evidenciaron una notable capacidad para neutralizar radicales hidroxilos, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y aniones superóxido, además de ejercer un efecto protector frente a la peroxidación lipídica (Carabajal et al., 2020a,b). El potencial antioxidante determinado para las infusiones de “jarilla” resultó comparable al del té negro (*Camellia sinensis*) y, en algunos casos, superior al observado en infusiones de menta (*Mentha piperita*) y melisa (*Melissa officinalis*) (Carabajal et al., 2020b).

Diversos estudios han demostrado que el extracto etanólico de sus partes aéreas, así como los flavonoides aislados de las mismas, presentan una marcada capacidad inhibitoria sobre enzimas clave del proceso inflamatorio, tales como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la lipooxigenasa (LOX) y la fosfolipasa A₂ (sPLA₂) (Alberto et al., 2007; Nuño et al., 2014). Estas enzimas son claves en la síntesis de prostanoïdes y eicosanoides a partir de ácidos grasos poliinsaturados, implicados en diversos trastornos inflamatorios y alérgicos. El DHC mostró una actividad similar a la de los antiinflamatorios sintéticos analizados (indometacina y nimesulide) (Nuño et al., 2014). Por otro lado, DHC aislada de *Z. punctata*, demostró efecto antihelmíntico y alteración de los procesos de incubación de huevos y larvas de *Caenorhabditis elegans* (D’Almeida et al., 2015).

Otros autores demostraron que el extracto de *Z. punctata* no presenta efecto genotóxico sobre células de hepatoma humano (HepG2) y protege al ADN contra el daño inducido por la acción directa del compuesto genotóxico 4-nitroquinolina (4-NQO), y que esta capacidad protectora podría estar relacionada a la presencia de 2',4'-dihidroxichalcona en el extracto (Zampini et al., 2008). Además, se investigó la influencia del extracto seco de *Z. punctata* y de los flavonoides aislados a partir del mismo sobre la reactividad vascular en aortas de conejos normocolesterolémicos y sometidos a dietas

hipercolesterolémicas, evidenciándose una mejora significativa en la disfunción endotelial. Los resultados indicaron que tanto el extracto seco como sus flavonoides ejercen un marcado efecto vasodilatador dependiente del endotelio, incrementan la respuesta a la acetilcolina y actúan como potentes inhibidores de la vasoconstricción inducida por la activación de los receptores de fenilefrina y angiotensina II bajo condiciones de hipercolesterolemia (Roco et al., 2017).

Asimismo, otros estudios en conejos hipercolesterolémicos revelaron que el extracto polifenólico administrado por vía oral mejoró el perfil lipídico plasmático, atenuó el estrés oxidativo y previno alteraciones funcionales endoteliales, reforzando el rol protector del extracto frente a mecanismos de oxidación sistémica y función vascular. Dichos resultados se correlacionan con los perfiles químicos previamente descritos para la especie, caracterizados por compuestos fenólicos con reconocida capacidad para inhibir peroxidación lipídica, bloquear activación enzimática pro-oxidante y regular la señalización celular dependiente de radicales libres (Roco et al., 2018). Los autores plantearon que la acción combinada de un perfil fitoquímico rico en flavonoides, junto con la capacidad del extracto para modular la respuesta oxidativa sistémica, explicaría el efecto protector observado. Estos resultados fortalecen la hipótesis de que los efectos atribuidos a *Z. punctata* no se limitan a actividades antimicrobianas o antiinflamatorias de tipo local, sino que además pueden modular procesos sistémicos complejos mediados por estrés oxidativo e inflamación persistente.

Adicionalmente, estudios *in vivo* por administración oral en modelos de animales de un fenotipo de obesidad conocida como “obesidad con peso normal” (Valoy et al., 2023 a) y en un modelo obeso con peso normal e hipocolesterolemia asociada (Valoy et al., 2023 b) proporcionan evidencia relevante para discutir el posible rol del extracto como agente terapéutico en patologías crónicas asociadas a desequilibrios metabólicos e inflamatorios. En conjunto, estos antecedentes permiten considerar que la eficiencia biológica del extracto podría estar asociada tanto a su acción antioxidante directa como a su capacidad para ejercer efectos moduladores en vías fisiopatológicas claves.

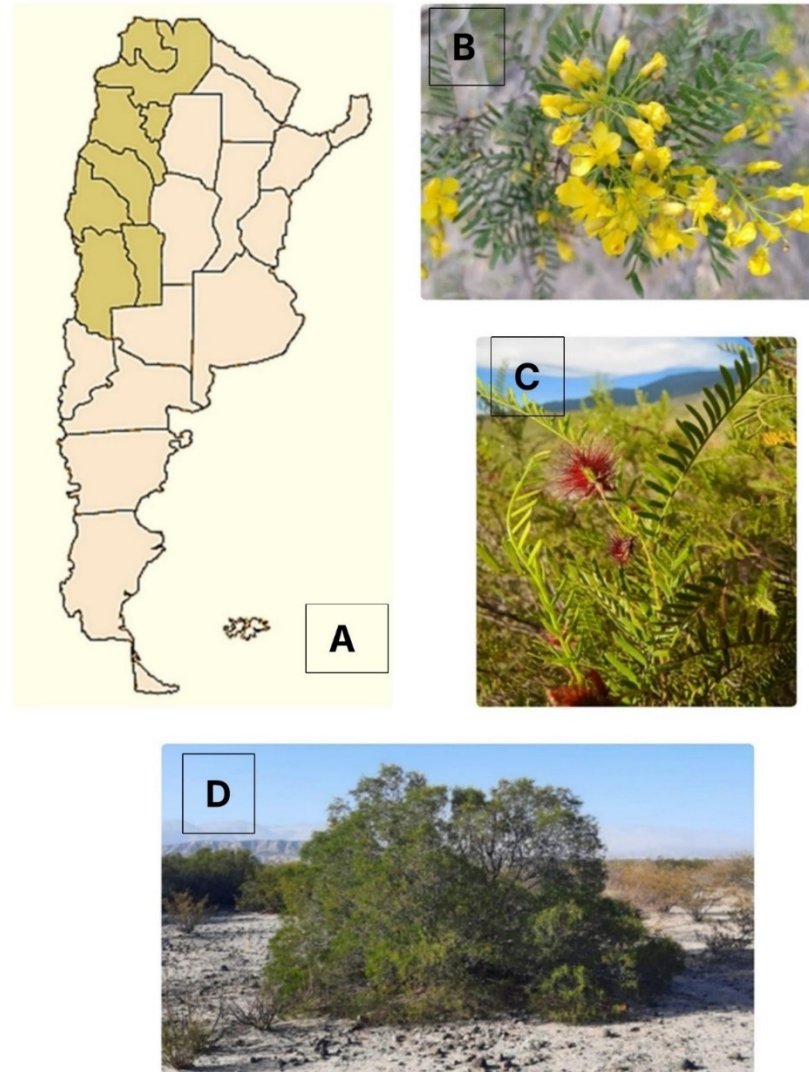


Figura 9: A. Región de distribución de *Zuccagnia punctata* en Argentina (color verde). Fotografía tomada durante la recolección del material vegetal en Amaicha del Valle, Tucumán: B. Rama portando las flores. C. Rama con frutos D. Planta entera

Antecedentes de condiciones de extracción de bioactivos de *Z. punctata*

En general, la eficiencia en la extracción de diferentes clases de compuestos fenólicos a partir de material vegetal tal como se explicó anteriormente depende tanto de las condiciones del proceso (metodología de extracción, temperatura, tiempo de extracción, y relación material vegetal/solvente) como del material vegetal (especie, órgano, grado de secado, grado de molienda, entre otros) y de las propiedades fisicoquímicas del solvente utilizado. En este sentido, la polaridad y la capacidad del solvente para establecer interacciones específicas con las matrices vegetales resultan factores determinantes en la eficiencia de extracción (Bitwell et al., 2023; Lee et al., 2024). Por ello, las condiciones óptimas no pueden generalizarse para todos los materiales vegetales, debido a la naturaleza diversa de los compuestos bioactivos presentes (Tabla 5).

Tabla .5 Aplicación de DES/NaDES en combinación con métodos de extracción asistida por ultrasonido (EAU) y microondas (EAM) en la recuperación de compuestos bioactivos de diversos materiales vegetales.

Material vegetal	Método de extracción/ condiciones	Solvente (NaDES) seleccionado	Tipo de compuesto químico extraído	Análisis instrumental	Referencia
Orujo de aceituna	EAU A: 75:1 B: 60 min C: 40°C	Ácido láctico: glucosa 1:5	Fenoles: tirosol, 3- hidroxitirosol, Ácidos fenólicos: transferúlico, cafeico Flavonoides: rutina, apigenina, luteolina	HPLC-DAD	De los Ángeles Fernández et al., 2018.
Orujo de aceituna virgen	EAM A: 80:1 B: 30 min C: 60 °C	ChCl: ácido cítrico 1:2	Secoiridoides: oleuropeína Ácido fenólico: cafeico Aldehído fenólico: vainillina Flavonoides: rutina, luteolina	HPLC-DAD	Chanioti y Tzia et al., 2018.
Hojas de morera (<i>Morus alba</i> L.)	EAU A: 50:1 B: 30 min C: 40°C	ChCl: ácido cítrico	Ácidos fenólicos: gálico, gentísico, clorogénico, catequico, vainílico, cafeico, siríngico, benzoico. Flavonoides: epicatequina, rutina, hesperina, astragalina, quercetina	HPLC-UV	Zhou et al., 2018.
Hojas de morera (<i>Morus alba</i> L.)	EAM A: 50:1	ChCl: glicerol 1:2 20% adición de agua	Ácidos fenólicos: Neoclorogénico,	HPLC-UV	Gao et al., 2020.

	B: 18 min C: 66 °C		clorogénico, criptoclorogénico, cafeico Flavonoides: rutina, isoquercetina, astragalina		
Hojas de <i>Moringa Oleífera</i> L.	EAU A: 50:1 B: 30 min C: 40°C	Bet: urea 1:2 50% adición de agua.	ácidos fenólicos 3,4-dihidroxibenzoico, Flavonoides: Naringenina chalcona, catequina (+)- dihydroquercetina. Isoflavonas: daidzeína, isoliquiritigeni na.	UPLC-Q-/MS	Peng et al., 2024.
Hojas de <i>Moringa oleífera</i> L.	EAU A: 5 :1 B: 15 min C: 40 °C	L-prolina:glicerol 2:5 37% adición de agua	Ácidos fenólicos gálicop- hidroxibenzoico, rosmarí nico. Flavonoides: (+)- catequina, vicianina II, orientina, rutina, kaempferol-3-O- rutinósido, isorhamnetina 3-O- glucósido, quercetina; apigenina, kaempferol, (-)-epigallocatequina	HPLC-ESI-Q- TOF-MS/MS	Wu et al., 2020.
Hojas de olivo (<i>Olea europaea</i>)	EAM A: 200: 1,5 B: 20 min C: 65°C	ChCl: urea 1:2 25% adición de agua	Hidroxil-oleuropeína, 2- metoxioleuropeína, oleuropeína, Flavonoides luteolinapig enina, luteolina rutinósi do, apigenina glucósido, rutina, luteolina glucósid o, apigenina rutinósido y diosmetina glu cósido	HPLC-DAD-ESI- TOF-MS	Alañón et al., 2020.
<i>Myrothamnus flabellifolia</i>	EAU A: 50:1 B: 90 min C: 50–55 °C	Sacarosa : ácido cítrico: agua 1:1:10	Antocianinas: cianidina- 3-acetil glucosamina, cianidina-3-p-cumaril glucósido, delphinidina-3- glucósido, delphinidina-3- p-cumarilglucósido, malvidina-3- acetilglucósido, malvidina-3-glucósido, malvidina-3-cumaril glucósido, pet-3- acetilglucósido, pet-3- cumaril glucósido	LC-QTOF- MS/MS	Bentley et al., 2020.

Planta de saúco (<i>Sambucus nigra</i>)	EAU A: 16.7: 1 B: 28 min	Ácido láctico: glicina 5:1 15% adición de agua	Ácidos fenólicos: neoclorogénico, clorógeno, di- cafeoilquínico, Flavonoides: rutina, isoquercitrina, isorhamnetina-3-O- rutinosido, quercetina	LC-DAD-MS HPLC-DAD	Kaltsa et al., 2020.
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	EAU A: 52.6:1 B: 120 min C: 40 °C	ChCl:1,2-propanodiol 1:2 10% adición de agua	Ácidos fenólicos: rosmarínico, ferúlico, Flavonoides: 7- metilrosmanol, rutina, naringina Alcaloides: cafeína.	HPLC-DAD	Bentley et al., 2020.
Condiciones de extracción: A- relación sólido: líquido (mg/ml), B- tiempo de extracción, C- temperatura de extracción. EAU: extracción asistida por sonda de ultrasonido. EAM: extracción asistida por microonda. ChCl: cloruro de colina. Bet: betaína					

Se han descrito previamente algunos métodos para la extracción de compuestos fenólicos totales (CFT) de las partes aéreas de *Z. punctata*, usando solventes acuosos u orgánicos como etanol, metanol, acetona, cloroformo, tolueno, diclorometano, entre otros (Zampini et al., 2005; Svetaz et al., 2007; Zampini et al., 2008, 2012; Agüero et al., 2010; Nuño et al., 2014, 2018; Butassi et al., 2015; Carabajal et al., 2017, 2020; Moreno et al., 2018; Gómez et al 2020). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito el uso de solventes no convencionales, como los solventes eutécticos profundos naturales. Asimismo, tampoco se ha descrito el uso de métodos de extracción no convencionales como microondas y ultrasonido, para extraer compuestos bioactivos de las partes aéreas de *Z. punctata*.

Como se señaló previamente, en las últimas décadas, el empleo de NaDES ha emergido como una alternativa sostenible y eficaz frente a los solventes orgánicos convencionales para la extracción de compuestos fenólicos. Este tipo de solventes ofrece ventajas tales como menor volatilidad, toxicidad reducida y buena capacidad para disolver moléculas de distinta polaridad (Skarpalezos y Detsi, 2019; ElAchkar et al., 2021; Zhang et al., 2021; Abranches y Coutinho, 2023; Mu et al., 2023; Ristivojević et al., 2024). Además, la combinación de NaDES con técnicas de extracción asistidas por ultrasonido (EAU) o microondas (EAM) han demostrado mejoras significativas tanto en el rendimiento como en la selectividad de extracción de compuestos fenólicos (Cvjetko Bubalo et al., 2015; Mansur et al., 2019; Shang et al., 2019; Airouyuwa, et al., 2022, 2023; Fu, et al., 2025; Joey, et al., 2025). En particular, estudios recientes han mostrado que NaDESs formulados con combinaciones de ácidos orgánicos, azúcares o compuestos nitrogenados permiten extraer compuestos fenólicos de elevada diversidad estructural bajo condiciones más suaves que los protocolos tradicionales (Cvjetko Bubalo et al., 2015;

Cai et al., 2019; He et al., 2020; Ruesgas et al., 2020; Airouyuwa et al., 2022; Pereira et al., 2025). No obstante, persisten desafíos operativos para su escalado industrial, tales como la elevada viscosidad de algunos NaDES, la recuperación del solvente y el impacto del contenido de agua en la eficiencia de extracción (Ruesgas-Ramón et al., 2017; Pires et al., 2024; Suthar, 2025).

HIPOTESIS: *Zuccagnia punctata* Cav, especie medicinal endémica de Argentina puede ser usada para el desarrollo de productos fitoterápicos antimicóticos y/o antioxidantes utilizando solventes verdes. Los resultados obtenidos permitirán promover su uso sustentable.

El **OBJETIVO GENERAL** de este trabajo de Tesis Doctoral es la transformación y agregado de valor de *Zuccagnia punctata*, una planta endémica del NOA a través de la optimización de la extracción de bioactivos antimicóticos utilizando solventes verdes para el desarrollo de un producto de uso tópico de interés para el tratamiento de onicomycosis

OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OEs):

OE 1. Realizar extracciones de principios activos de *Zuccagnia punctata* en solventes verdes (NaDES) y otros solventes con métodos convencionales y no convencionales y efectuar la caracterización química y funcional de las mismas a los efectos de seleccionar el o los métodos más apropiados

OE 2. Formular, desarrollar, caracterizar y evaluar la estabilidad de al menos un producto fitoterápico de uso tópico destinado al tratamiento de micosis, utilizando como activos los extractos de *Z. punctata* previamente seleccionados



2.MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Se recolectaron partes aéreas de *Zuccagnia punctata* en febrero de 2021, 2022 y 2023 en el noroeste argentino, en Ampimpa (26°35'33.3" S 65°51'25.0" W; 2329 msnm), Amaicha del Valle, Tucumán. Los ejemplares fueron depositados en el Herbario de la Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina (LIL; Thiers, 2022): Ampimpa (LIL 618078). La identificación del material vegetal estuvo a cargo de la botánica Dra. Ana Soledad Cuello. Las muestras se secaron hasta peso constante en una estufa de aire forzado a 40 °C y luego se molieron en un molino Helix (Numak, F100 Power 1/2 HP-0,75 Kw, Brusque, Brasil). El polvo se mantuvo en bolsas selladas al vacío a 24 °C.

2.2. Preparación de NaDES

Los NaDES (Tabla 1) se prepararon mezclando los componentes en las proporciones molares apropiadas, de la siguiente manera: CAS, LGH, FGS y CU se prepararon de acuerdo con Dai et al. (2013a) y Kamradt Savi et al. (2018) (Tabla 1). CAS y LGH se mantuvieron en un baño ultrasónico a 40 °C durante 120 min. FGS y CU se llevaron al agitador magnético durante 20 min por 1 h. El procedimiento se realizó a 40 °C y 80 °C para FGS y CU, respectivamente. Los reactivos se adquirieron en Cicarelli, Santa Fe, Argentina (etanol, sacarosa), Anedra, Bs As, Argentina (glucosa, ácido cítrico, urea), Sigma-Aldrich, Beijing, China (cloruro de colina 98,9% de pureza y ácido DL-láctico 91,4% de pureza). En la Tabla 1 se presentan las relaciones molares de los constituyentes de NaDES, pH y viscosidad.

Tabla 1. Disolventes eutécticos profundos naturales (NaDES) utilizados para la extracción.

Código NaDES	Componentes	Relación molar	pH	Viscosidad Pa.s
CU	Cloruro de colina : urea	1:2	6	20,95
LGH	Ácido láctico : glucose	5:1	2	37
CAS	Ácido cítrico: sacarosa	1:1	3	140
FGS	Fructosa: glucosa: sacarosa	1:1:1	6	720

2.3. Extracciones convencionales

Se extrajo material vegetal previamente convertido a polvo (1 g) de diferentes años entre 2021 y 2023 en 20 mL de etanol, aceite vegetal de girasol o NaDESs (FGS, CU, LGH, CAS) a 40 °C durante 30 min en un baño ultrasónico (Lavador Ultrasónico Arcano Modelo PS-10A, Shandong, China), Tabla 2. Los extractos acuosos se prepararon con 1 g de polvo en 20 mL de agua destilada a 100 °C durante 10 min. Luego, los extractos se filtraron al vacío. La fracción filtrada de los extractos acuosos se congeló a -80 °C y posteriormente se liofilizó (liofilizador, RIFICOR, modelo L-M10-A-E50-CRT, Buenos Aires, Argentina). Los extractos etanólicos se secaron en un evaporador rotatorio y se liofilizaron. Los extractos acuosos y etanólicos secos se mantuvieron a -20 °C hasta su uso. Los extractos secos se resuspendieron en etanol y agua en el momento de su uso. Las preparaciones en aceite y NaDES se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

2.4. Extracciones no convencionales

2.4.1. Extracción asistida por sonda ultrasónica (EAU)

Las mezclas de extracción, 1 g de material vegetal molido de diferentes años entre 2021 y 2023 con 20 mL de disolvente (agua, etanol, aceite y NaDES), se colocaron en la sonda ultrasónica (UP200St 200 W, 26 kHz, Hielscher Ultrasonics. GmbH. Teltow, Alemania) y se extrajeron en tres ciclos de 16 s encendido y 1 min apagado cada uno, a una temperatura entre 24 °C y 55 °C, con una amplitud del 40 % y una potencia máxima de 60 W (Tabla 2). Posteriormente, se filtró al vacío. Las extracciones se realizaron por triplicado.

2.4.2. Extracción asistida por microondas (EAM)

Las mezclas de extracción, 1 g de material vegetal molido de diferentes años entre 2021 y 2023 con 20 mL de cada solvente se pusieron en contacto en un microondas digital (BGH B120db920I, Buenos Aires, Argentina). Se realizaron tres ciclos de 16 s de encendido y 1 min de apagado a una temperatura de 60 °C y una potencia del 60 %, y posteriormente se filtró al vacío (Tabla 2). Las extracciones se realizaron por triplicado.

Tabla 2. Métodos de extracción de compuestos de partes aéreas de *Z. punctata*.

Método de Extracción		MV:S	Solvente	Tiempo de extracción	T°	Potencia	Amplitud
Extracción convencional	EA	1:20	Acuoso a 100 °C	10 min	-	-	-
	EE	1:20	Etanol 60°, aceite y NaDESS.	30 min en baño ultrasónico	40 °C	-	-
Extracciones no-convencionales	EAU	1:20	Etanol 60°, acuoso, aceite y NaDESS.	3 ciclos 16 s prendido y 1min apagado	24 °C 55° C	60 W	40%
	EAM	1:20	Etanol 60°, acuoso, aceite y NaDESS.	3 ciclos 16 s prendido y 1 min apagado.	60 °C	60%	-

EAM: extracción asistida por microondas; EAU: extracción asistida por ultrasonidos; EE: extracción etanólica; EA: extracción con agua; T°: temperatura; MV: material vegetal; S: solvente.

2.5. Determinación de la composición química

Los métodos de cuantificación de compuestos fenólicos, flavonoides y chalconas se validaron según las directrices de la ICH (ICH, 2006) y son similares a los métodos informados para el desarrollo y validación de métodos de espectrofotómetro UV-Visible para medicamentos herbales (Parmar y Pundarikakshudu, 2019; Deseva et al 2020). Los parámetros analizados para la validación de los métodos fueron especificidad, linealidad, recuperación promedio o exactitud; límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ); y precisión (repetibilidad). Los compuestos de referencia y los parámetros analizados se incluyen en la Tabla 3.

Tabla 3. Validación del método analítico

Métodos Analíticos	Compuestos de referencia	Especificidad	Linealidad	LOQ	LOQ	P	RM
Compuestos				µg /mL	µg /mL	(n= 10,% RSD)	%
Compuestos fenólicos (método: Folin Cioacalteau)	Ácido gálico	específico	$y = 0,0504x$ ($R^2 = 0,9994$)	0,61	1,84	2,24	$97,20 \pm 1,38$
Flavonoides método: Woisky y Salatino)	Quercetina	específico	$y = 0,027x$ ($R^2 = 0,9995$)	0,79	2,39	1,45	$98,30 \pm 1,27$
Chalcona (cuantificación HPLC-DAD)	DHC	específico	$y = 5 \times 10^{-6} x$ ($R^2 = 0,997$)	0,021	0,050	0,31	$98,02 \pm 1,05$
	DHMC	específico	$y = 1 \times 10^{-7} x$ ($R^2 = 0,9991$)	0,014	0,041	0,41	$98,32 \pm 1,00$

RM: recuperación media o precisión; LOD y LQD: límites de detección y cuantificación; R²: coeficiente de correlación; RSD: desviación estándar relativa; P: precisión; 2',4'- dihidroxichalcona (DHC); 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (DHMC).

2.5.1. Determinación del contenido total de polifenoles y flavonoides

El contenido total de compuestos fenólicos se determinó utilizando el reactivo de Folin– Ciocalteau (Singleton et al., 1965). Este método se basa en las propiedades reductoras de los compuestos fenólicos, los cuales son capaces de reducir el polianión molibdotungstosfórico en medio alcalino para formar el complejo molibdotungstosfato (azul), el cual se determina espectrofotométricamente. La cantidad del complejo molibdotungstosfato formado es proporcional a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la mezcla. El color azul desarrollado se leyó a 765 nm en un espectrofotómetro UV/visible (Jasco v-630, Thermo Fisher Scientific, Tokio, Japón).

Los flavonoides totales se estimaron utilizando el método de Woisky y Salatino con el reactivo AlCl₃ (Woisky y Salatino 1998). Esta técnica se basa en la formación de un complejo coloreado entre el ion aluminio (Al³⁺) y los grupos carbonilo (C4) e hidroxilos (C3 y/o C5) de los flavonoides.

Se emplearon 20 µL de las diluciones de cada uno de los extractos obtenidos de acuerdo con lo descrito en 2.3 y 2.4. Los controles de solventes (agua, etanol y NaDEss) se realizaron en cada determinación para establecer posibles interferencias. Las determinaciones se realizaron por triplicado en todos los extractos y solventes y los resultados se expresaron como µg de equivalente de ácido gálico (EAG) por mililitro (µg EAG/mL) y equivalentes de quercetina (EQ) por mililitro (µg EQ/mL) para polifenoles y flavonoides, respectivamente. El reactivo de Folin–Ciocalteu, AlCl₃ y los compuestos de referencia (ácido gálico y quercetina) se adquirieron en Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU. El rendimiento de extracción en cada solvente se determinó como las cantidades de componentes químicos por mL de extracto.

2.5.2. HPLC-DAD

Se utilizaron diferentes diluciones de cada uno de los extractos de acuerdo con el contenido de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos de *Z. punctata* extraídos con aceite vegetal se recuperaron con etanol y se utilizaron para cuantificar las chalconas. El método cromatográfico para determinar chalconas fue validado y los parámetros analizados se incluyen en la Tabla 3. Se utilizó un equipo de HPLC-DAD Marca Waters 1525 con un sistema de bomba binaria Waters 1525, una válvula de inyección manual (Rheodyne Inc., Cotati, CA, EE. UU.) con loop de 20 µL, un compartimento de termostato de columna y un detector de arreglo de diodos Waters 2998. El análisis se realizó a una temperatura de 40 °C, utilizando una columna XBridge™ C18 de 155 × 4,6 mm (5 µm) con un caudal de 0,8 mL/min (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). El sistema de solventes utilizado para la separación de los componentes químicos de los extractos estaba compuesto por el solvente A (ácido acético al 0,1 % en agua) y el solvente B (ácido acético al 0,1 % en metanol) (condiciones: 10–57 % de B de 0 a 45 min y mantenido al 100 % de B de 45 a 60 min). El caudal se ajustó a 0,5 mL/min. La recopilación de datos se llevó a cabo con el software Empower™ 2. La identificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo comparando los tiempos de retención y los datos espectrales (220–600 nm) de cada pico con los de los estándares 2',4' - dihidroxichalcona (DHC) y 2',4' - dihidroxi-3-metoxichalcona (DHMC) adquiridos en Indofine SRL. La cuantificación de ambas chalconas se basó en curvas de calibración externas de los estándares disponibles. Se construyeron gráficos comparando el área y la concentración en el rango de 1 a 500 ppm.

2.5.3. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Un conjunto de placas de silica gel F254 (0,2 mm) se sembraron con 10 µg de compuestos fenólicos correspondientes a cada uno de los extractos de *Z. punctata* en solventes convencionales y en los diferentes NaDES. Las placas fueron desarrolladas con dos sistemas de corrida tolueno: acetona: cloroformo (4,5:3,5:2,5, v:v:v) y Acetato de etilo: Ácido Acético: Ácido Fórmico: Agua (10:1,1:1,1:2,7;v:v:v:v). Posteriormente fueron visualizadas bajo luz ultravioleta (254 y 365 nm, lámpara UVLamp Modelo UVGL-58 Mineralight) y las placas se revelaron con el reactivo Natural Products (NP - solución de éster aminoetílico del ácido difenilbórico al 1 % en metanol) (Wagner et al., 1984). El duplicado correspondiente se utilizó en el ensayo autográfico para determinar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos frente a una solución del radical catión ABTS según Zampini et al. (2010)

2.6. Determinación de actividades biológicas

2.6.1. Actividad depuradora de radicales libres ABTS

El radical catión ABTS (ABTS•+) es un radical estable, de color azul/verde que absorbe a 734 nm y al ser reducido por una especie radicalaria o por una molécula antioxidante se decolora. El grado de decoloración es proporcional a la actividad antioxidante de la muestra. El ABTS•+ se genera haciendo reaccionar una solución acuosa de ABTS (7mM) con persulfato de potasio (2,45 mM), se incubaba a temperatura ambiente (23°C) en oscuridad durante 16 horas. La solución de ABTS•+ es diluida con etanol 96° hasta obtener una Absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm (Re et al., 1999). Se mezcló solución ABTS•+ recientemente preparada a partir de ABTS comercial (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) con diferentes cantidades de las soluciones extractiva obtenidas de *Z. punctata*. Se realizaron controles de solventes (agua, etanol, NaDESs) en cada determinación para detectar algunas posibles interferencias. La absorbancia se registró a 734 nm a los 6 min. Los resultados se expresan como valores de concentración depuradora del 50% de los radicales libres, CD50 que se define como la concentración de compuestos fenólicos necesaria para eliminar el 50% de los radicales libres ABTS y se expresa como microgramos de compuestos fenólicos en equivalentes de ácido gálico por mililitro (µg EAG/mL). Se utilizó quercetina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) como compuesto de referencia.

2.6.2. Determinación de la actividad antifúngica

Microorganismo y medio

Las cepas fúngicas se obtuvieron de una colección institucional. *Trichophyton mentagrophytes* (Tm15) (n = 1) y *Trichophyton rubrum* (Tr3) (n = 1) (INBIOFIV-Tm15 y Tr3) se cultivaron en agar Sabouraud sólido con cloranfenicol (SA-Ch). La composición del medio fue la siguiente: agar Sabouraud: peptona de carne 1 %, glucosa 4 %, agar 1,5 %, cloranfenicol 0,005 %, pH 5,4-5,6.

Las cepas de *Candida* se obtuvieron del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (INEI-ANLIS) 'Dr. Carlos G. Malbrán', Buenos Aires, Argentina, 2015. Las cepas utilizadas fueron *Candida albicans* (144783; 134333; 2089), *C. glabrata* (031646; 042030; 031982), *C. tropicalis* (1841), *S. cerevisiae* (134528; 134544; 124263), *C. parapsilosis* (134410) y *C. krusei* (134409).

Inóculos

Inóculos de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*:

Los inóculos de Tm15 y Tr3 se prepararon a partir de un cultivo de 7 a 15 días de crecimiento en agar Sabouraud a 28°C. Para la recolección de los conidios, se raspó la colonia con una pipeta Pasteur y, para facilitar la dispersión, se añadió solución fisiológica estéril conteniendo Tween 20 (0,05 %). Las suspensiones se ajustaron a 0,5 de la escala de McFarland y se contabilizó en una cámara de Neubauer ($2,5 \times 10^{-1}$ UFC /mL) (Zacchino et al., 2007; Rex et al., 2008).

Inóculos de hongos levaduriformes:

Todos los organismos levaduriformes se mantuvieron en infusión de cerebro-corazón (medio BHI) que contiene 30% (v/v) de glicerol a -20°C. Antes del ensayo, las suspensiones de levaduras se siembran en agar Sabouraud y se cultivan aeróbicamente a 35°C durante 24 h. De estos cultivos se toman una o dos colonias con ansa estéril y se prepara una suspensión en 2 mL de solución fisiológica, ajustando el inóculo a la turbidez del estándar equivalente a 0,5 de la escala de Mc Farland (DO= 0,08 a 530 nm), correspondiente aproximadamente a $1-5 \times 10^6$ levaduras/mL (CLSI, 2008).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima

La evaluación de la potencia antifúngica de los extractos se realizó mediante la determinación de los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) por macrodilución seriada en medio sólido (Zacchino

et al., 2007). La determinación de las CIM se realizó en un volumen de 5 mL de medio Sabouraud agar. Se prepararon diluciones seriadas de todos los extractos en cada solvente, es decir, agua destilada, etanol y NaDESs en un rango de concentración de 500 a 1,87 µg EAG/ mL. En cada placa se sembró el inóculo con una concentración final de $2,5 \times 10^4$ UFC/mL.

Se realizaron controles de esterilidad del medio de cultivo (sin inóculo), control de crecimiento fúngico (sin extracto) y controles de crecimiento del inóculo en cada solvente (inóculo más solvente). También se determinó el efecto del pH del solvente sobre el crecimiento microbiano ajustando el pH del medio de cultivo entre 2 y 6 de acuerdo con el NaDES usado como solvente (Tabla 1).

Para analizar el efecto de los azúcares presentes en los NaDES, se añadieron al medio de cultivo diferentes soluciones comerciales de fructosa, glucosa y sacarosa, para obtener la misma concentración final de azúcar que la obtenida cuando se realizan los controles de los solventes NaDES. Además, se utilizó un antifúngico comercial ketoconazol (8 a 64 µg/mL) como control positivo.

Todas las placas de ensayos de hongos miceliales se incubaron a 30 °C durante 7 días mientras que los ensayos frente a hongos levaduriformes se incubaron a 35°C durante 24 horas.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se consideró como la mínima concentración de extracto en equivalente de compuestos fenólicos donde no hubo crecimiento visible después del periodo de incubación.

2.7. Preparación de la formulación tópica antifúngica (FTA)

Los extractos se prepararon según lo descrito en la sección 2.3. Las FTA de extractos de *Z. punctata* se prepararon utilizando glicerol: propilenglicol (1:2; v:v) como vehículo en todas las formulaciones, según la Tabla 4. La mezcla de vehículos se añadió a 25 mL de cada extracto para obtener FTA de extracto de *Z. punctata* (Zp) basado en NaDES LGH (FTA de Zp-LGH), FTA de extracto de *Z. punctata* basado en NaDES CU (Zp-CU) y FTA de extracto de *Z. punctata* basado en NaDES LGH con el agregado de 11% de urea (FTA de Zp-LGH + 11 % de urea). También se preparó un control negativo de cada formulación, que contenía solo los vehículos y el solvente NaDES LGH, NaDES LGH-urea y NaDES CU. Las formulaciones se envasaron en recipientes de vidrio con tapa a rosca y se almacenaron a 25 ± 2 °C y 60 ± 5 % de humedad, sin exposición a la luz durante 1 año. También se almacenaron durante 3 meses a 40 °C y 75 ± 5 % de humedad (Farmacopea Argentina, 2003)

Tabla 4: Preparación de la formulación tópica antifúngica (FTA) de extractos de *Z. punctata* en NaDES

Formulación Base	Formulación 1		Formulación 2		Formulación 3	
	LGH control	FTA ZpLGH	LGH+urea	FTA-ZpLGH+11% urea	CU control	FTA-Zp CU
mL						
Glicerol	25	25	25	25	25	25
Propilenglicol	50	50	50	50	50	50
Agua	25	-	-	-	-	-
LGH	-	25	-	-	-	-
Zp-LGH	-	-	25	-	-	-
LGH + urea	-	-	-	25	-	-
Zp-LGH +urea	-	-	-	-	25	-
CU	-	-	-	-	25	-
Zp-CU	-	-	-	-	-	25

FTA: formulación tópica antifúngica; LGH: NaDES LGH; CU: NaDES CU. ZpLGH: extracto de Zp en LGH; ZpLGH + 11 % de urea: extracto de Zp en LGH más urea; Zp CU: extracto de Zp en CU. Zp: *Zuccagnia punctata*

2.8. Estudios de estabilidad de las FTA

Se realizaron estudios de estabilidad a largo plazo durante 12 meses manteniendo las FTA a 25 ± 2 °C y 60 ± 5 % de humedad. Los análisis de estabilidad se realizaron cada dos meses durante 12 meses. También se realizaron estudios de estabilidad acelerada a 40 °C y 75 ± 5 % de humedad durante 3 meses, de acuerdo con lo que describe la Farmacopea Argentina (Farmacopea Argentina, 2003).

2.8.1. Estabilidad química

La estabilidad química se determinó mediante la cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, según la descripto en la sección 2.5.1 de caracterización química. Los resultados se

expresaron como μg de equivalentes de ácido gálico por 100 mL de formulación. Se cuantificaron las chalconas (DHC y DHMC) mediante HPLC-DAD, según lo descrito en la sección 2.5.2.

2.8.2. Estabilidad organoléptica y física

2.8.2.1. Parámetros cromáticos:

Los parámetros cromáticos de las formulaciones tópicas se midieron con un medidor de croma NR110 (3NH TECHNOLOGY Co., Ltd., Zengcheng, China) utilizando el sistema CIELab durante un año de almacenamiento de las formulaciones en las condiciones descritas en 2.8. El espacio de color se seleccionó para obtener los resultados expresados en las coordenadas de cromaticidad L^* , a^* y b^* para el iluminante seleccionado. La coordenada L^* representa la luminosidad (contribución del negro o blanco que varía entre 0 y 100), a^* representa la contribución del verde o rojo (negativa o positiva) y b^* representa la contribución del azul o amarillo (negativa o positiva). C^* es el croma o saturación, y H es el tono (o ángulo de tono, que indica la variación de color en el plano formado por las coordenadas a^* y b^*). Estos parámetros se determinaron considerando: $C^* = (a^2 + b^2)^{1/2}$, $H^\circ = \arctan(b/a)$, donde 0° = rojo-violeta, 90° = amarillo, 180° = verde azulado y 270° = azul y el índice CIRG = $180 - h / (L^* + C^*)$.

2.8.2.2. Centrifugación:

Esta prueba se realizó pesando 1 mL de cada FTA. Cada formulación fue centrifugada a 3500 rpm durante 30 min empleando la centrífuga de eppendorf (Bioamerican Science, modelo 724D) y se evaluó la presencia de fases de separación.

2.8.2.3. Medición de pH:

Se pesaron 2 mL de cada FTA se le midió el pH con un medidor de pH (Ohaus, modelo ST2200-F) a temperatura ambiente.

2.8.3. Estabilidad microbiológica

Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de microorganismos aerobios viables, coliformes, hongos y levaduras en cada FTA almacenada a temperatura ambiente durante un año cada dos meses mediante el uso de Müeller Hinton agar; agar-peptona, caseína-glucosa-extracto de levadura y lauril sulfato, medios de Hongo y levaduras; Mac Conkey; Plate-Count agar; Sabouraud agar

(Laboratorios Britania SA, Bs As, Argentina). Para ello se tomaron alícuotas de cada formulación y se realizaron diluciones seriadas las que se sembraron en cada uno de los medios de cultivos descriptos previamente y se incubaron a 35°C durante 7 días realizando observaciones diarias y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

2.8.4. Estabilidad biológica

2.8.4.1. Actividad depuradora de radical catión ABTS

La capacidad antioxidante se determinó mediante el método ABTS•+ según la sección 2.6.1. La solución ABTS•+ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) se mezcló con diferentes cantidades de Zp -LGH, Zp -LGH +urea, Zp -CU y las formulaciones tópicas antimicóticas (FTA) obtenidas con cada extracto. Se realizaron controles de solvente (NaDESS) en cada determinación para detectar posibles interferencias.

2.8.4.2. Determinación de la actividad antifúngica

Determinación de la concentración inhibitoria mínima

La evaluación de la potencia antifúngica de los extractos de *Z. punctata* y FTA se realizó mediante la determinación de valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) por macrodilución en medio sólido, como describe la sección 2.6.2. La determinación de las CIM se realizó en un volumen de 5 mL de medio Sabouraud agar frente a *Trichophyton mentagrophytes* (Tm15) (n = 1) y *Trichophyton rubrum* (Tr3) y de 10 mL de medio para las cepas de levaduras.

2.9. Estudios de liberación in vitro

La liberación de los principios activos se realizó mediante una celda de difusión de Franz de 2,26 cm² de área de difusión y membrana de acetato de celulosa (Sigma Aldrich, D9777-100FT, Bach 3110, membrana de celulosa para tubos de diálisis, ancho plano promedio de 25 mm 1,0 pulg., Mv 10233) con un tamaño de poro de 0,45 µm (Farmacopea Argentina, 2003). Las muestras de la formulación tópica antimicótica (600 µL) se colocaron sobre la membrana en la cámara donante. La cámara receptora que se llenó con 22,5 mL de solución receptora, la cual se agitó mediante una barra magnética y se mantuvo a 37 °C con un baño de agua con una camisa receptora que rodea la celda (Figura 10). El medio receptor consistió en una solución de buffer fosfato de sodio 10 mM (pH=7,4) con la adición del 20% de etanol

96°. En diferentes períodos de tiempo (entre 15 min y 24 h), se tomaron alícuotas de la solución del contenedor y se reemplazaron con el volumen de la solución receptora.

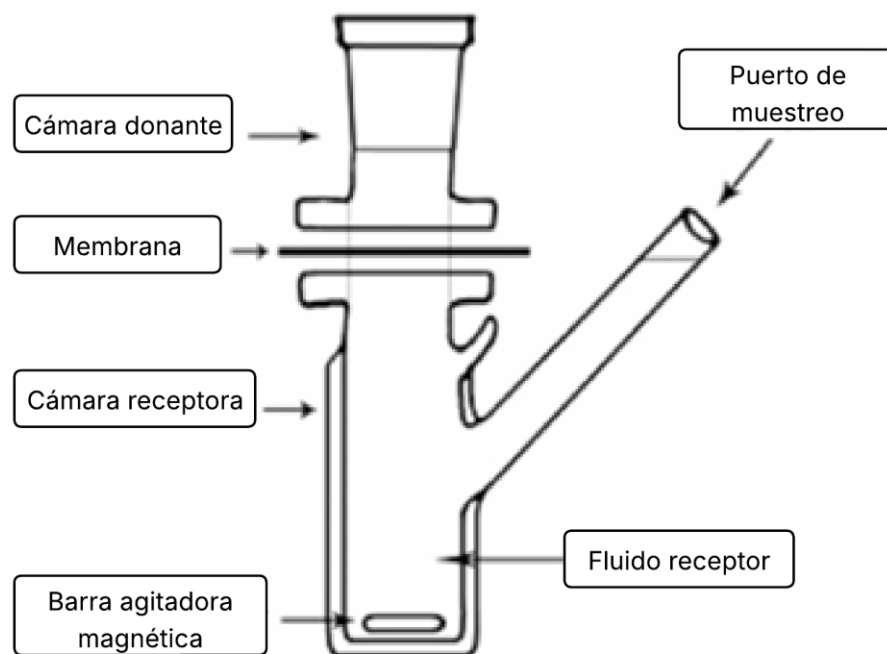


Figura 10: Celda de difusión de Franz.

Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos liberados

Se determinó en cada tiempo el contenido de compuestos fenólicos totales permeados a la solución receptora en la celda de Franz de acuerdo con la metodología descrita en 2.5.1. Se graficó la cantidad de polifenoles liberados en función del tiempo.

Cromatografía en capa fina y ensayo autográfico:

Un conjunto de placas de sílica gel F254 (0.2 mm) se sembraron por duplicado con 10 µg de compuestos fenólicos permeados a través de la celda de Franz. Las placas fueron desarrolladas con tolueno: acetona: cloroformo (4,5:3,5:2,5; v:v:v) y visualizado bajo luz ultravioleta (254 y 365 nm, lámpara UVLamp Modelo UVGL-58 Mineralight). Un set de placas se reveló con el reactivo Natural Products (NP - solución de éster aminoetílico del ácido difenilbórico al 1 % en metanol) (Wagner et al.,

1984). El duplicado correspondiente se utilizó en el ensayo autográfico para determinar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos permeados por la Celda de Franz frente a una solución de ABTS de acuerdo con la metodología descrita por Zampini et al. (2010)

2.10. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se aplicó la prueba de Tukey, con un nivel de significancia $p > 0,05$, utilizando el paquete estadístico InfoStat V1.1 (Di Rienzo et al., 2015). Se desarrolló un mapa de calor con dendrograma utilizando la distancia euclidiana y el algoritmo de agrupamiento de Ward con el conjunto de datos estandarizados utilizando el software R 3.0.2 (R Studio Team, 2020).

2.11. Eficiencia Energética Relativa

La eficiencia energética de cada método de extracción se estimó considerando la energía eléctrica consumida durante el proceso de obtención de los bioactivos. El consumo de energía (E) se calculó según la Ecuación siguiente:

$$\text{Ecuación 1:} \quad E(Wh) = P(W) \times t(h)$$

donde P es la potencia nominal del equipo utilizado (en vatios); t es el tiempo efectivo de extracción (en horas).

Los valores de P se obtienen de las especificaciones del equipo proporcionadas por el fabricante o se miden con un medidor de consumo eléctrico, y los valores t se derivaron del diseño experimental.

La eficiencia energética relativa se calculó según la Ecuación 2, expresada como la cantidad de energía consumida por miligramo de equivalentes de ácido gálico (mg EAG) de compuesto fenólico extraído.

$$\text{Ecuación 2:} \quad \text{Eficiencia energética (W.h/mgEAG)} = E(Wh) / CFT(mgEAG)$$

Este parámetro permitió una comparación objetiva entre los métodos de extracción usando NaDES LGH y CU considerando el consumo energético requerido por miligramo de compuestos fenólicos totales (CFT) obtenidos.

2.12. Huella de Carbono Total y Relativa

La huella de carbono total asociada a cada método de extracción se estimó considerando la energía eléctrica consumida durante el proceso y el factor de emisión de dióxido de carbono para la matriz energética regional. El consumo energético (E) se calculó según la Ecuación (3):

$$E = P \times T$$

P es la potencia nominal del equipo utilizado (en kilovatios, kW); T es el tiempo efectivo de extracción (en horas),

La huella de carbono total (HC) se calculó multiplicando el consumo de energía por el factor de emisión de dióxido de carbono (F), según la Ecuación (4):

$$HC = E \times F$$

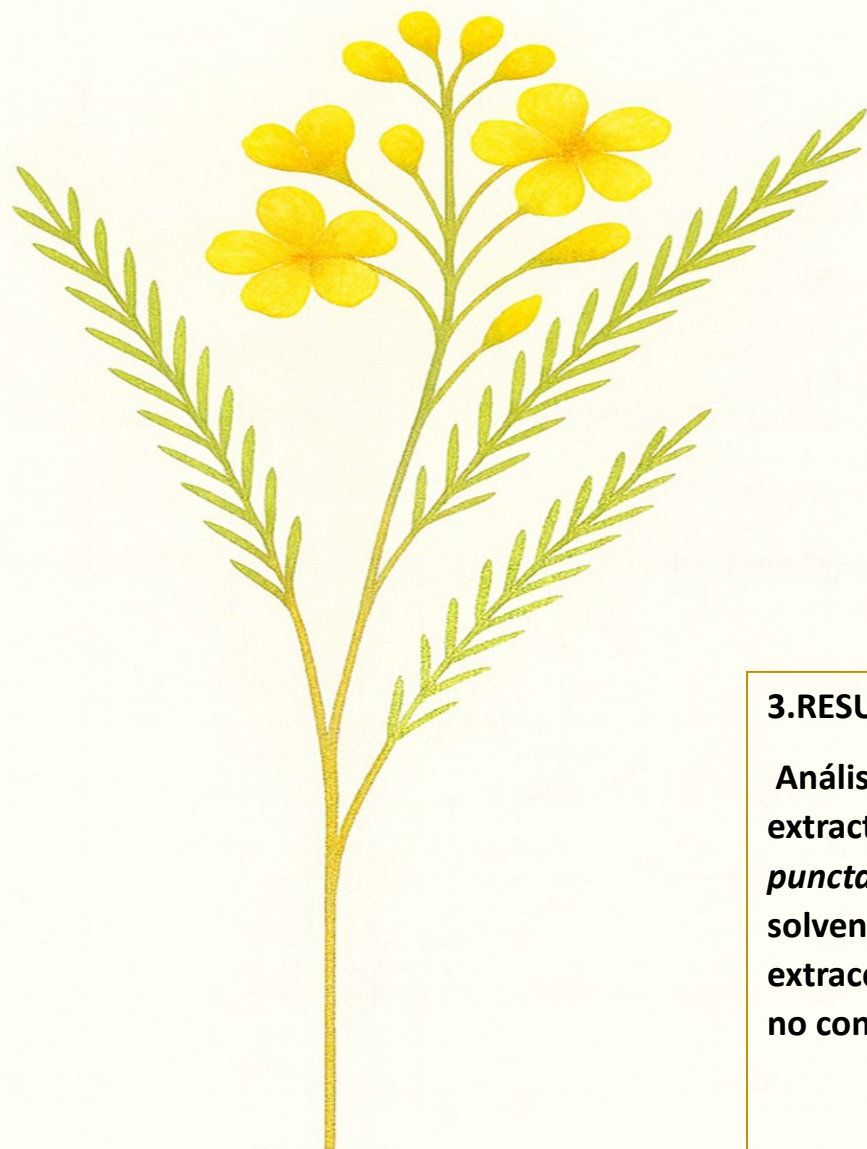
donde

F es el factor de emisión de dióxido de carbono para la matriz energética regional (kg CO₂/kWh). Para comparar la eficiencia ambiental de los métodos de extracción en términos de producción de compuestos funcionales, se calculó la huella de carbono relativa (HCR), expresada como la cantidad de emisiones equivalentes de dióxido de carbono por miligramo de CFT. Este cálculo se realizó mediante la Ecuación (5).

$$HCR = HC / CFT$$

Donde CFT representa el contenido total de compuestos polifenólicos extraído (mg).

Este parámetro permitió una evaluación objetiva de la sostenibilidad de los métodos utilizados, considerando la huella ambiental por unidad de compuesto funcional obtenido.



3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químico-funcional de extractos de *Zuccagnia punctata* obtenidos con solventes y métodos de extracción convencionales y no convencionales

En este Trabajo de Tesis Doctoral, se utilizaron cuatro NaDES como solventes verdes para la obtención de extractos enriquecidos con compuestos fenólicos a partir del polvo de partes aéreas de *Z. punctata*. Se usaron solventes eutécticos profundos naturales basados en combinación de ácidos orgánicos como el ácido láctico con azúcares como glucosa (LGH) o el ácido cítrico con sacarosa (CAS) o NaDES basados en compuestos nitrogenados como cloruro de colina combinado con urea (CU) o basados en azúcares tales como fructosa, glucosa y sacarosa (FGS) (Figura 1).

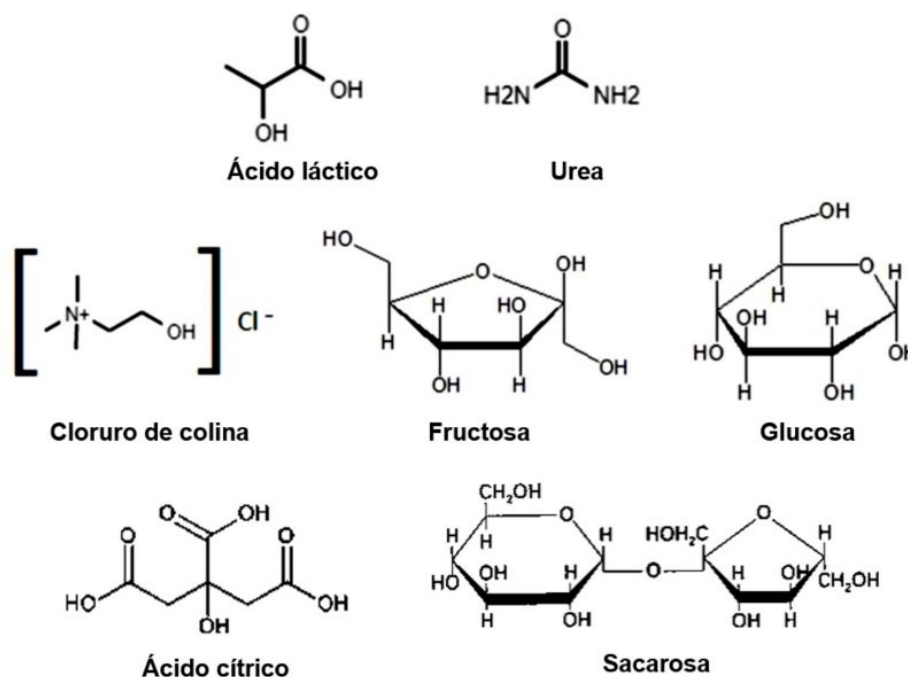


Figura 1: Estructura química de los componentes empleados para preparar los NaDES: LGH (ácido láctico-glucosa), CAS (ácido cítrico-sacarosa), CU (cloruro de colina-urea) y FGS (fructosa-glucosa-sacarosa)

Los NaDES seleccionados tienen diferentes pH y viscosidades. Recientemente, otros autores demostraron que estos NaDES representan una alternativa sostenible para la extracción de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante y antibacteriana, y podrían, por lo tanto, reemplazar los solventes tradicionales en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (Leal et al., 2023a, 2023b, 2025; Conta et al., 2025).

3.1. Determinación cuantitativa de fitoquímicos

Rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos y flavonoides utilizando solventes convencionales y no convencionales, con y sin EAU o EAM

Para garantizar la estabilidad química del material vegetal, se colectaron partes aéreas de *Z. punctata* en el año 2021, 2022 y 2023 y se almacenaron molidas y envasadas al vacío. Se realizó el análisis químico cada año. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides utilizando material vegetal colectado desde el año 2021 a 2023 utilizando las mismas condiciones de extracción y la misma metodología de cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT). Los resultados de CFT y FT obtenidos se muestran en las Tablas 2, 3 y 4. Estos resultados permiten demostrar la estabilidad química de estos compuestos en el material vegetal.

Tabla 2: Rendimiento de extracción de compuestos fenólicos y flavonoides a partir de material vegetal recolectado en 2021

Solventes	MEC	EAU	EAM	MEC	EAU	EAM
	CFT (μg EAG/mL)			FT (μg EQ/mL)		
Acuoso	1779,21 $\pm$ 7,00 ^{aB}	15970,00 $\pm$ 10,72 ^{aB}	1268,00 $\pm$ 10,67 ^{aA}	80,80 $\pm$ 5,12 ^{aA}	91,10 $\pm$ 1,02 ^{aA}	71,18 $\pm$ 0,87 ^A
Etanol 60°	6282,00 $\pm$ 10,00 ^{cB}	6492,05 $\pm$ 8,98 ^{cB}	5175,50 $\pm$ 4,09 ^{cA}	535,95 $\pm$ 12,82 ^{dA}	667,30 $\pm$ 2,75 ^{dA}	630,60 $\pm$ 3,09 ^c
Aceite	1644,30 $\pm$ 11,67 ^{aA}	1343,65 $\pm$ 3,88 ^{aA}	1725,10 $\pm$ 1,92 ^{aA}	820,00 $\pm$ 9,63 ^{fA}	832,90 $\pm$ 4,66 ^{eA}	813,18 $\pm$ 2,45 ^{fA}
LGH	6720,12 $\pm$ 5,98 ^{cdB}	6366,50 $\pm$ 5,00 ^{cdB}	5393,59 $\pm$ 2,45 ^{cdA}	291,50 $\pm$ 4,90 ^{cA}	295,30 $\pm$ 6,00 ^{bA}	281,00 $\pm$ 0,92 ^{cA}
CAS	5073,00 $\pm$ 4,98 ^{bB}	5594,67 $\pm$ 5,66 ^{bB}	3611,2 $\pm$ 10,32 ^{bA}	58,50 $\pm$ 4,80 ^{aA}	88,80 $\pm$ 1,62 ^{aA}	68,20 $\pm$ 0,27 ^{aA}
CU	7156,00 $\pm$ 6,72 ^{dB}	8420,00 $\pm$ 4,72 ^{dC}	6260,00 $\pm$ 7,76 ^{dA}	655,83 $\pm$ 10,08 ^{eA}	810,94 $\pm$ 2,90 ^{eB}	512,64 $\pm$ 1,32 ^{dA}
FGS	5083,70 $\pm$ 5,00 ^{bCA}	6362,80 $\pm$ 8,98 ^{bcB}	4260,40 $\pm$ 8,21 ^{bCA}	169,50 $\pm$ 5,87 ^{bA}	394,00 $\pm$ 2,03 ^{cB}	150,71 $\pm$ 1,94 ^{bA}

MEC: método de extracción convencional; EAU: extracción asistida por ultrasonido; EAM: extracción asistida por microondas. NaDESs LGH (ácido láctico: glucosa), CAS (sacarosa: ácido cítrico), CU (cloruro de colina: urea) y FGS (fructosa: glucosa: sacarosa). Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa (las letras mayúsculas y minúsculas indican diferencias entre los métodos de extracción y los disolventes de extracción, respectivamente, según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)). Los análisis se realizaron para compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT) de forma independiente.

Tabla 3: Rendimiento de extracción de compuestos fenólicos y flavonoides a partir de material vegetal recolectado en 2022.

Solventes	MEC	EAU	EAM	MEC	EAU	EAM
	CFT ($\mu\text{g EAG/mL}$)			FT ($\mu\text{g EQ/mL}$)		
Acuoso	1744,79 $\pm$ 9,00 ^{aB}	1567,40 $\pm$ 6,97 ^{aB}	1249,00 $\pm$ 9,96 ^{aA}	50,87 $\pm$ 9,84 ^{aA}	79,10 $\pm$ 2,55 ^{aA}	67,40 $\pm$ 0,34 ^{aA}
Etanol 60°	6258,00 $\pm$ 6,43 ^{cB}	6450,20 $\pm$ 11,87 ^{cB}	5144,92 $\pm$ 6,76 ^{cA}	567,99 $\pm$ 2,00 ^{dA}	653,75 $\pm$ 1,78 ^{dA}	618,30 $\pm$ 2,70 ^c
Aceite	1606,70 $\pm$ 8,77 ^{aA}	1318,70 $\pm$ 9,73 ^{aA}	1708,50 $\pm$ 3,73 ^{aA}	793,62 $\pm$ 3,87 ^{fA}	816,70 $\pm$ 5,04 ^{eA}	805,51 $\pm$ 1,54 ^{fA}
LGH	6700,88 $\pm$ 9,65 ^{cdB}	6335,00 $\pm$ 10,31 ^{cd}	5369,00 $\pm$ 6,57 ^{cdA}	253,90 $\pm$ 10,56 ^{cA}	283,50 $\pm$ 1,36 ^{bA}	277,50 $\pm$ 2,00 ^A
CAS	5029,20 $\pm$ 10,65 ^{bB}	5567,00 $\pm$ 7,23 ^{bB}	3587,7 $\pm$ 1,98 ^{bA}	46,9 $\pm$ 2,80 ^{aA}	76,77 $\pm$ 4,44 ^{aA}	66,80 $\pm$ 0,11 ^{aA}
CU	7125,00 $\pm$ 7,13 ^{dB}	8362,20 $\pm$ 3,34 ^{dC}	6238,00 $\pm$ 10,06 ^{dA}	618,19 $\pm$ 3,23 ^{eA}	794,47 $\pm$ 6,38 ^{eB}	504,14 $\pm$ 2,20 ^{dA}
FGS	5057,30 $\pm$ 8,09 ^{bcA}	6320,00 $\pm$ 9,00 ^{bcB}	4238,92 $\pm$ 7,82 ^{bcA}	154,50 $\pm$ 1,45 ^{bA}	388,28 $\pm$ 1,76 ^{cB}	145,20 $\pm$ 0,85 ^{bA}

MEC: método de extracción convencional; EAU: extracción asistida por ultrasonidos; EAM: extracción asistida por microondas. NaDESs LGH (ácido láctico: glucosa), CAS (sacarosa: ácido cítrico), CU (cloruro de colina: urea) y FGS (fructosa: glucosa: sacarosa). Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa (las letras mayúsculas y minúsculas indican diferencias entre los métodos de extracción y los disolventes de extracción, respectivamente, según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)). Los análisis se realizaron para compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT), de forma independiente.

Tabla 4: Rendimiento de extracción de compuestos fenólicos y flavonoides a partir de material vegetal recolectado en 2023.

Solventes	MEC	EAU	EAM	EMC	EAU	EAM
	CFT ($\mu\text{g EAG/mL}$)			FT ($\mu\text{g EQ/mL}$)		
Acuoso	1762 $\pm$ 7,21 ^{aB}	1582 $\pm$ 4,16 ^{aB}	1258 $\pm$ 2,08 ^{aA}	65,80 $\pm$ 1,00 ^{aA}	85,10 $\pm$ 1,00 ^{aA}	69,18 $\pm$ 2,51 ^{aA}
Etanol 60°	6270 $\pm$ 10,56 ^{cB}	6470 $\pm$ 5,85 ^{cB}	5160 $\pm$ 11,37 ^{cA}	551,80 $\pm$ 5,29 ^{dA}	660,50 $\pm$ 6,24 ^{dA}	624,00 $\pm$ 0,57 ^c
Aceite	1624 $\pm$ 6,80 ^{aA}	1331 $\pm$ 4,93 ^{aA}	1716 $\pm$ 5,50 ^{aA}	806,70 $\pm$ 3,60 ^{fA}	824,70 $\pm$ 2,00 ^{eA}	809,40 $\pm$ 2,88 ^{fA}
LGH	6710 $\pm$ 1,52 ^{cdB}	6350 $\pm$ 3,11 ^{cdB}	5380 $\pm$ 5,13 ^{cdA}	271,00 $\pm$ 4,35 ^{cA}	289,5 $\pm$ 3,00 ^{bA}	280,00 $\pm$ 3,51 ^{cA}
CAS	5050 $\pm$ 0,57 ^{bB}	5580 $\pm$ 4,00 ^{bB}	3600 $\pm$ 10,53 ^{bA}	52,70 $\pm$ 1,52 ^{aA}	82,80 $\pm$ 5,13 ^{aA}	67,50 $\pm$ 0,57 ^{aA}
CU	7140 $\pm$ 9,00 ^{dB}	8390 $\pm$ 5,68 ^{dC}	6250 $\pm$ 0,041 ^{dA}	637,00 $\pm$ 15,63 ^{eA}	802,50 $\pm$ 1,53 ^{eB}	508,50 $\pm$ 9,84 ^{dA}
FGS	5070 $\pm$ 5,68 ^{bcA}	6340 $\pm$ 10,58 ^{bcB}	4250 $\pm$ 4,04 ^{bcA}	162,00 $\pm$ 4,50 ^{bA}	391,00 $\pm$ 2,31 ^{cB}	148,00 $\pm$ 2,51 ^{bA}

MEC: método de extracción convencional; EAU: extracción asistida por ultrasonido; EAM: extracción asistida por microondas, Etanol 60°; NaDESs LGH (ácido láctico: glucosa), CAS (sacarosa: ácido cítrico), CU (cloruro de colina: urea) y FGS (fructosa: glucosa: sacarosa). Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa (las letras mayúsculas y minúsculas indican diferencias entre los métodos de extracción y los disolventes de extracción, respectivamente, según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)). Los análisis se realizaron para compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides (FT) de forma independiente.

Como puede observarse en la Tabla 5, el rendimiento de compuestos fenólicos totales obtenidos por extracción de polvo de partes aéreas de *Z. punctata* sin asistencia de ultrasonido ni microondas osciló entre 1624 y 7140 µg EAG/mL de extracto (rendimiento de 0,16 a 0,71%) (Tabla 5). Es evidente que el NaDES consistente en cloruro de colina y urea como donante de enlaces hidrógeno no solo fue el mejor solvente entre los NaDES ensayados (0,84%), seguido de LGH, sino también el solvente verde con una capacidad de extracción similar con respecto al etanol y mejor que el aceite vegetal y agua destilada. Diversos trabajos han mostrado la mayor eficiencia en la extracción de compuestos fenólicos de diferentes materiales vegetales utilizando NaDES basados en cloruro de colina, en comparación con otras mezclas de NaDES y solventes orgánicos (Khezeli et al., 2016; Kamrad et al., 2018; Delso et al., 2019; Obluchinskaya et al., 2019; Lazovic et al., 2022; Popovic et al., 2022). El alto rendimiento de estos NaDES se debería a la fuerte interacción molecular entre el cloruro de colina y los compuestos fenólicos, por la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno, lo que da lugar a una red de interacción múltiple (Delso et al., 2019). Resultados similares fueron informados por Mansinhos et al., 2021 para la extracción de compuestos fenólicos de *Lavandula pedunculata* en NaDES CU encontrando además mayor rendimiento cuando la extracción fue asistida con ultrasonido.

CAS y FGS fueron los NaDES con menor potencia de extracción de compuestos fenólicos a partir de polvo de *Z. punctata*. Esto podría deberse a la alta viscosidad de estos solventes (140 y 720 Pa.s, respectivamente, Tabla 1 de Materiales y Métodos). Otros autores han demostrado previamente que un factor de gran influencia en el rendimiento de la extracción es la viscosidad de estos solventes, lo que dificulta la transferencia de masa de la matriz sólida a la solución (Kamrad et al., 2018; Faud et al., 2021). En nuestro estudio, el ultrasonido y las microondas no mejoran, en general, la eficiencia de extracción de polifenoles de *Z. punctata*. Martínez Chamás et al., 2023 informaron resultados similares para la extracción de compuestos fenólicos de *Fabiana* sp., otra especie nativa del noroeste argentino, mediante maceración y extracción asistida por ultrasonido. Los solventes, agua y aceite vegetal, mostraron la menor eficiencia de extracción de compuestos fenólicos de *Z. punctata*. El orden de rendimiento de extracción de flavonoides utilizando extracción asistida por ultrasonido y microondas con diferentes solventes fue el siguiente: aceite > CU > etanol > LGH > FGS > CAS = agua. El CU mostró una mayor capacidad de extracción de flavonoides que el etanol a 60° y menor que el aceite (Tabla 5). La extracción asistida por ultrasonido utilizando aceite o CU como solvente fue el método de extracción más prometedor para flavonoides. Los solventes que mostraron la menor eficiencia de extracción de flavonoides fueron agua y CAS. Otro estudio comparó la eficiencia en el rendimiento de extracción de compuestos polifenoles y flavonoides de extractos de hojas de olivo empleando once NaDES de

diferentes clases: NADES basados en azúcar, NADES basados en cloruro de colina-azúcar, NADES basados en ácido y NADES basados en polialcohol, logrando el mayor rendimiento de extracción de polifenoles y flavonoides con el solvente cloruro de colina-fructosa-agua (CFW) (5:2:5), con $187,31 \pm 10,3$ mg equivalente de ácido gálico/g de peso seco y $12,75 \pm 0,6$ mg equivalente de apigenina/g de peso seco, respectivamente (Ünlü, 2021). Este es el primer estudio de extracción de compuestos fenólicos de *Z. punctata* que se centra en el uso de solventes verdes, EAM y EAU, en comparación con los métodos tradicionales.

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT) en extractos de *Z. punctata* obtenidos con diferentes solventes y métodos de extracción convencionales y no convencionales a partir de material vegetal colectado entre 2021 y 2023. La Tabla 5 se elaboró con los datos de las Tablas 2, 3 y 4.

Solventes	MEC	EAU	EAM	MEC	EAU	EAM
	CFT ($\mu\text{g EAG/ml}$)			FT ($\mu\text{g EQ/ml}$)		
Acuoso	$1762 \pm 17,21^{aB}$	$1582 \pm 14,60^{aB}$	$1258 \pm 11,00^{aA}$	$65,80 \pm 15,00^{aA}$	$85,10 \pm 6,00^{aA}$	$69,18 \pm 2,00^{aA}$
Etanol 60°	$6270 \pm 12,00^{cB}$	$6470 \pm 19,80^{cB}$	$5160 \pm 15,08^{cA}$	$551,80 \pm 16,09^{dA}$	$660,50 \pm 6,80^{dA}$	$624,00 \pm 5,70^{eA}$
Aceite	$1624 \pm 18,30^{aA}$	$1331 \pm 12,30^{aA}$	$1716 \pm 7,50^{aA}$	$806,70 \pm 12,45^{fA}$	$824,70 \pm 8,00^{eA}$	$809,40 \pm 3,89^{fA}$
LGH	$6710 \pm 10,12^{cB}$	$6350 \pm 15,00^{cB}$	$5380 \pm 11,30^{cA}$	$271,00 \pm 18,00^{cA}$	$289,5 \pm 6,00^{bA}$	$280,00 \pm 2,50^{cA}$
CAS	$5050 \pm 20,80^{bB}$	$5580 \pm 13,00^{bB}$	$3600 \pm 12,03^{bA}$	$52,70 \pm 5,80^{aA}$	$82,80 \pm 6,03^{aA}$	$67,50 \pm 0,70^{aA}$
CU	$7140 \pm 15,00^{dB}$	$8390 \pm 27,80^{dC}$	$6250 \pm 12,00^{dA}$	$637,00 \pm 18,83^{eA}$	$802,50 \pm 8,03^{eA}$	$508,50 \pm 4,14^{dA}$
FGS	$5070 \pm 12,70^{bB}$	$6340 \pm 20,00^{cC}$	$4250 \pm 11,08^{bA}$	$162,00 \pm 7,50^{bA}$	$391,00 \pm 3,01^{cB}$	$148,00 \pm 2,81^{bA}$

MEC: método de extracción convencional; EAU: extracción asistida por ultrasonidos; EAM: extracción asistida por microondas; NaDESs LGH (ácido láctico: glucosa, relación molar 5:1), CAS (sacarosa: ácido cítrico, relación molar 1:1), CU (cloruro de colina: urea, relación molar 1:2) y FGS (fructosa: glucosa: sacarosa, relación molar 1:1:1). Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa (las letras mayúsculas y minúsculas corresponden a las diferencias entre los métodos de extracción y los disolventes de extracción, respectivamente, según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)). Los análisis se realizaron para compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT) de forma independiente.

3.2. Chalconas extraídas de partes aéreas de *Z. punctata* con solventes verdes y solventes convencionales

La 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (DHMC) y la 2',4'-dihidroxichalcona (DHC) son los principales constituyentes de los extractos acuosos, etanólicos, metanólicos, diclorometánico y podrían considerarse como marcadores químicos de los extractos de las partes aéreas de *Z. punctata* (Svetaz et al., 2004; Zampini et al., 2005; Nuño et al., 2014, 2018; Moreno et al., 2018; Carabajal et al., 2020;). La DHC mostró capacidad antibacteriana con valores de CIM entre 0,10 y 100 µg/mL y entre 50 y 500 µg/mL contra diferentes bacterias Gram-positivas y Gram negativas, respectivamente (Zampini et al., 2005, 2012; Nuño et al., 2018). También se atribuyeron actividades antifúngicas y antiinflamatorias a la DHC aislada de *Z. punctata* (Svetaz et al., 2007; Agüero et al., 2010; Nuño et al., 2014; Moreno et al., 2018). Para la cuantificación de chalconas, se empleó un método HPLC-DAD validado, como se describe en la sección de materiales y métodos.

Se analizaron los perfiles HPLC-DAD de todos los extractos obtenidos utilizando diferentes métodos de extracción y solventes (Tabla 6, Figura 2). Se observaron perfiles HPLC-DAD similares para los extractos en CU y LGH, ambos NaDES, así como en etanol y en el extracto de aceite (Figuras 1A, B, E, F). Los mejores solventes para extraer chalconas sin ultrasonido ni microondas fueron el etanol, seguido del aceite vegetal y los dos NaDES, LGH y CU (Tabla 6). La capacidad de extracción de DHC y DHMC con etanol mejoró con la ayuda de ultrasonido en aproximadamente 1,64 veces. Choommongkol et al. (2022) descubrieron que la EAM mejora la extracción de 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona de frutos de *Syzygium nervosum*, obteniendo mayores rendimientos que con la extracción por maceración con metanol o reflujo térmico convencional. Sin embargo, en extractos de *Z. punctata* obtenidos con LGH como solvente, el rendimiento de chalcona se cuadruplica con la ayuda de ultrasonidos y microondas, probablemente debido a su baja viscosidad y a una mejor transferencia de masa durante la extracción. El calentamiento de LGH mediante EAM a 50 °C y EAU a 60 °C probablemente también promueve un aumento significativo en la recuperación de chalconas en comparación con el etanol. Obluchinskaya et al., 2021 obtuvieron un resultado similar con varios compuestos hidrófilos y lipófilos extraídos de *F. vesiculosus* con NaDES utilizando EAU.

El rendimiento de extracción de chalconas con CU mediante MEC es similar al obtenido con LGH, pero no mejora con la ayuda de ultrasonido ni microondas. Otros autores han reportado el mismo comportamiento para CU en la extracción de CFT de orujo de cereza ácida (Popovic et al., 2022). Se demostró una baja extractabilidad de chalconas preniladas (isosalipurpósido y tomorósido A) de *Helichrysum arenarium* utilizando NaDES con cloruro de colina como disolvente, en comparación con la maceración en MeOH al 80% (Ivanovic et al., 2020). La extracción de chalconas del polvo de *Z. punctata* con FGS y CAS fue menor que con otros NaDES y no mejoró al usar microondas ni ultrasonido,

probablemente debido a su alta viscosidad (720 y 140 Pa.s, respectivamente). Además, la disminución de la viscosidad podría ser beneficiosa para mejorar el efecto de cavitación de las ondas ultrasónicas y reducir la pérdida de estas en el proceso de propagación. El menor rendimiento de extracción de chalconas se obtuvo con agua destilada y FGS. Los perfiles HPLC-DAD para los extractos acuosos y los extractos en FGS mostraron un mayor número de picos correspondientes a componentes más hidrofílicos que las chalconas (Figura 2 C, D).

Tabla 6. Contenido de chalconas en extractos de *Z. punctata* obtenidos con diferentes solventes y métodos de extracción convencionales y no convencionales.

Solventes	Método de extracción					
	MEC	EAM	EAU	MEC	EAM	EAU
	µg DHC/mL			µg DHMC/mL		
Acuoso	0,10 ± 0,02 ^{aA}	0,44 ± 0,05 ^{aA}	0,34 ± 0,02 ^{aA}	0,10 ± 0,02 ^{aA}	0,43 ± 0,01 ^{aA}	0,64 ± 0,08 ^{aA}
Etanol 60 ^º	513,61 ± 20,13 ^{fA}	425,90 ± 10,43 ^{fA}	844,30 ± 29,00 ^{gB}	551,51 ± 5,98 ^{fA}	527,80 ± 3,76 ^{fA}	883,00 ± 12,25 ^{gB}
Aceite	259,30 ± 4,98 ^{eA}	216,20 ± 7,76 ^{eA}	263,00 ± 2,12 ^{eA}	246,00 ± 0,8 ^{eA}	315,00 ± 0,95 ^{eA}	314,00 ± 6,54 ^{eA}
LGH	100,70 ± 5,56 ^{cA}	407,90 ± 13,51 ^{fB}	446,90 ± 9,87 ^{fB}	127,80 ± 3,32 ^{dA}	492,10 ± 8,16 ^{fB}	475,40 ± 12,76 ^{fB}
CAS	21,40 ± 0,54 ^{cA}	28,00 ± 0,66 ^{cA}	30,00 ± 3,92 ^{cA}	22,65 ± 2,87 ^{cA}	30,90 ± 4,51 ^{cA}	36,00 ± 5,21 ^{cA}
CU	101,16 ± 9,00 ^{dA}	69,10 ± 7,33 ^{dA}	112,89 ± 14,09 ^{dA}	108,03 ± 3,42 ^{dB}	65,31 ± 3,70 ^{dA}	119,48 ± 8,76 ^{dB}
FGS	5,14 ± 1,76 ^{bA}	6.60 ± 3,00 ^{bA}	3,74 ± 2,34 ^{bA}	8,27 ± 1,17 ^{bA}	8.47 ± 5,23 ^{bA}	6,54 ± 2,00 ^{bA}

2',4'-dihidroxichalcona (DHC); 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (DHMC); MEC: extracción convencional; EAU: extracción asistida por ultrasonidos; EAM: extracción asistida por microondas, NaDESs: LGH (ácido láctico: glucosa), CAS (sacarosa: ácido cítrico), CU (cloruro de colina: urea) y FGS (fructosa: glucosa: sacarosa). Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa (las letras mayúsculas y minúsculas corresponden a las diferencias entre los métodos de extracción y los disolventes de extracción, respectivamente, según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)).

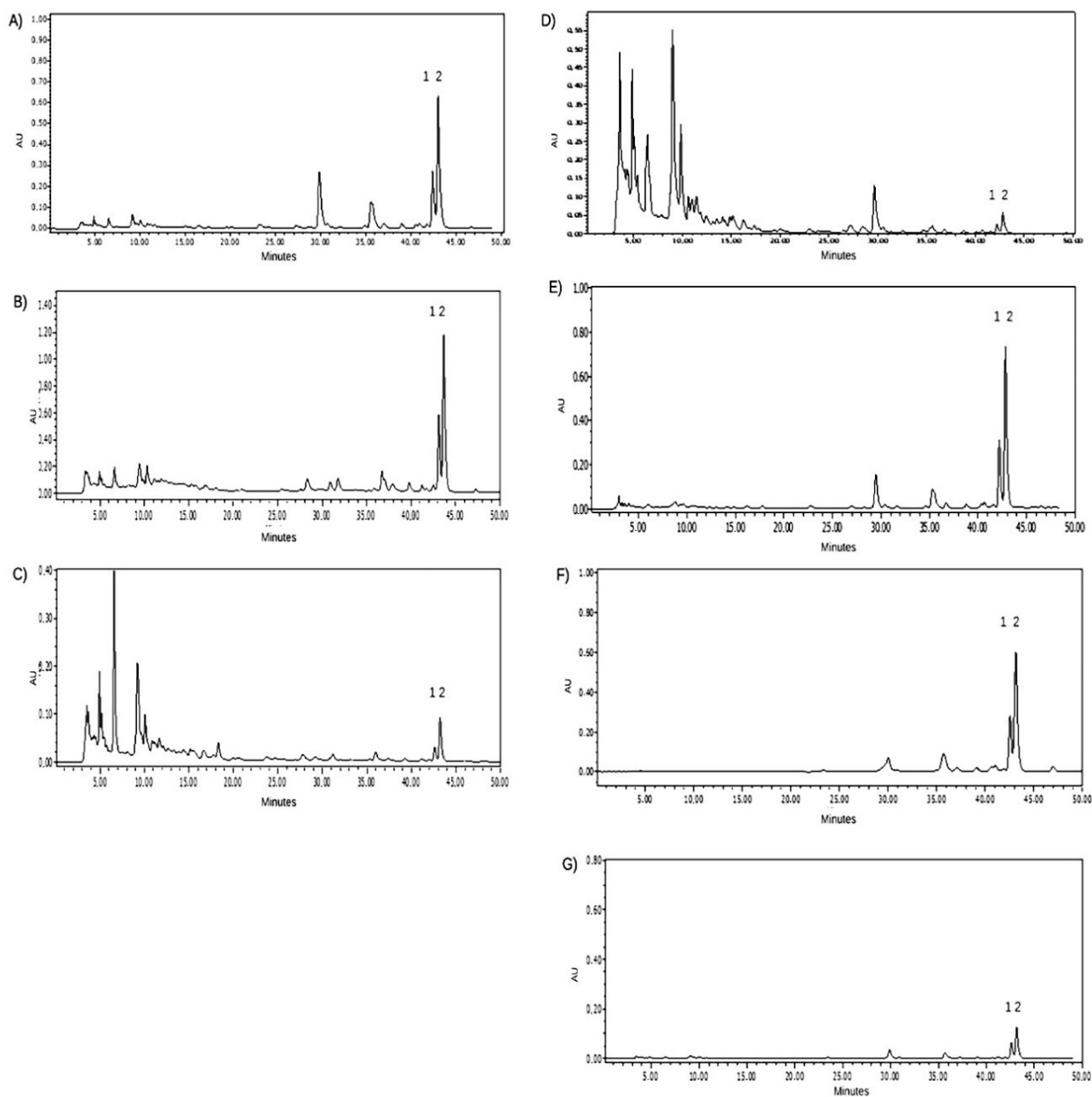
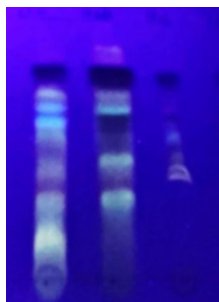


Figura 2. Perfiles de HPLC-DAD de extractos de *Z. punctata* obtenidos por método convencional (MEC) sin extracción asistida por microondas (EAM) ni extracción asistida por ultrasonidos (EAU) utilizando diferentes solventes, adquiridos a 330 nm. (A) LGH (dilución 1/2), (B) CU, (C) FGS, (D) agua destilada, (E) Etanol 60° (dilución 1/5), (F) Aceite vegetal (dilución 1/7), (G) CAS. Pico 1: 2',4'-dihidroxi-chalcona (DHC); Pico 2: 2',4'-dihidroxi-3'-metoxicalcona (DHMC).

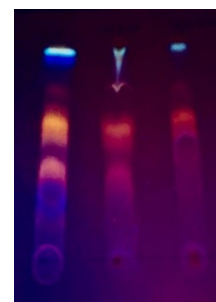
3.3. Cromatografía en capa fina

Los perfiles cromatográficos en placas de Silica Gel F 254 de los extractos de *Zuccagnia punctata* obtenidos con diferentes solventes (acuoso, etanólico, aceite y los diferentes NaDES) (Figura 3 y 4), revelaron la presencia de diferentes tipos de compuestos fenólicos, compuestos flavonoides (bandas verde-anaranjadas), chalconas (bandas negras) y ácidos fenólicos y/o cumarinas (bandas azules). No se detectó la presencia de alcaloides.



A B C

Figura 3: Cromatografía en capa fina de los extractos de *Z. punctata* **A.** Etanólico **B.** Aceite y **C.** Glucosa/ ácido láctico. Placa revelada con NP y visualizada a la luz ultravioleta de 365nm. Fase móvil: Tolueno: Acetona: Cloroformo



A B C

Figura 4: Cromatografía en capa fina de los extractos de *Z. punctata* **A.** Acuoso **B.** Glucosa/ácido láctico y **C.** Sacarosa/ ácido cítrico. Placa revelada con NP y visualizada a la luz ultravioleta de 365nm. Fase móvil: Acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua

3.4. Actividad antioxidante

Previamente, se había demostrado la capacidad antioxidante frente al catión radical ABTS para infusiones o tés (extracto acuoso) elaborados con partes aéreas de *Z. punctata* (Carabajal et al., 2017). Estas infusiones también mostraron capacidad de eliminación de radicales hidroxilos y anión superóxido, así como de H_2O_2 y protección contra la peroxidación lipídica (Carabajal et al., 2020). Otros autores han informado que los extractos orgánicos de *Z. punctata* enriquecidos en compuestos fenólicos totales son capaces de eliminar radicales libres (Ávila et al., 2001; Svetaz et al., 2004; Morán Vieyra et al., 2009; Moreno et al., 2018). Sin embargo, los solventes orgánicos contaminan el medio ambiente, dejando residuos tóxicos. Por esta razón, es necesario buscar solventes alternativos tales como NaDESs amigables con el medio ambiente, así como métodos para la extracción eficiente de antioxidantes vegetales que puedan ser usados en cosméticos, alimentos, farmacia e incluso agronegocios. La actividad antioxidante de extractos de *Z. punctata* obtenidos con NaDESs y solventes convencionales tales como agua, aceite y etanol fueron comparados por primera vez. La actividad antioxidante más alta fue demostrada para

extractos obtenidos con el NaDES LGH CD50 = 1 µg EAG/mL seguido por extractos obtenidos en CU CD50 = 1.4 µg EAG/mL (Tabla 7). Los extractos obtenidos con solventes convencionales (etanol y agua) les siguieron a los NaDES en orden de potencia con valores semejantes a CU. Otros autores evaluaron la actividad antioxidante de diferentes extractos de *Lavandula pedunculata* (Chaytor) basados en NaDES y los compararon con extractos obtenidos con solventes convencionales. La mayor capacidad de eliminación de radicales libres (ABTS •+) se obtuvo en los extractos cloruro de colina: urea (1:2). La capacidad de eliminación de radicales ABTS observada con este disolvente (72,13 ± 0,97 mg TE /g ps) fue aproximadamente el doble que la obtenida con MeOH (34,67 ± 0,90 mg TE /g ps) y EtOH 80 (46,31 ± 0,85 mg TE /g ps) (Mansinhos et al., 2021).

Tabla 7. Actividad antioxidante de extractos de *Z. punctata* obtenidos con solventes convencionales y no convencionales.

Solventes	Método de extracción		
	MEC	EAU	EAM
	CD50 (µgEAG/mL)		
Acuoso	1,45 ± 0,03 ^{bA}	1,80 ± 0,02 ^{bA}	1,51 ± 0,02 ^{bA}
Etanol 60°	1,50 ± 0,07 ^{bA}	1,83 ± 0,07 ^{bA}	1,60 ± 0,13 ^{bA}
Aceite	2,22 ± 1,11 ^{cB}	1,64 ± 0,10 ^{bA}	2,35 ± 0,15 ^{cB}
LGH	1,00 ± 0,06 ^{aA}	0,90 ± 0,10 ^{aA}	1,20 ± 0,14 ^{aA}
CAS	2,37 ± 0,96 ^{dB}	2,30 ± 0,01 ^{dA}	3,25 ± 1,03 ^{dB}
CU	1,43 ± 0,05 ^{bB}	1,08 ± 0,16 ^{aA}	1,11 ± 0,07 ^{aA}
FGS	1,46 ± 0,11 ^{bA}	1,42 ± 0,11 ^{bA}	1,53 ± 0,02 ^{bA}

CD₅₀: Concentración de extractos necesaria para eliminar el 50% de ABTS; EAG: equivalente de ácido gálico. NaDESs: LGH (ácido láctico: glucosa), CAS (sacarosa: ácido cítrico), CU (cloruro de colina: urea) y FGS (fructosa: glucosa: sacarosa). EAM: extracción asistida por microondas; EAU: extracción asistida por ultrasonidos; MEC: extracción convencional. Los valores se expresan como media, desviación estándar por triplicado. Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa (las letras mayúsculas y minúsculas corresponden a las diferencias entre los métodos de extracción y los disolventes de extracción, respectivamente, según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)).

3.5. Correlación entre compuestos fenólicos totales, flavonoides, contenido de chalcona y actividad antioxidante

Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para evaluar la relación entre la capacidad antioxidante (ABTS), el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y chalconas (CL) de los extractos de *Z. punctata* (Tabla 8). El contenido de FT mostró una correlación positiva con la actividad antioxidante de ABTS ($r = 0,96$). Además, el ensayo ABTS muestra una correlación significativa entre el contenido de CFT y CL, con valores de R de 0,43 y 0,63, respectivamente. El contenido de chalconas muestra una correlación positiva con el contenido de FT ($r = 0,47$).

Tabla 8. Coeficientes de correlación de Pearson de capacidad antioxidante (ABTS) y el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y chalconas (CL) de los extractos de *Z.*

punctata

	CFT	FT	ABTS	Contenido de chalconas
CFT	1,00	0,35	4,8E-04	0,13
FT	0,12	1,00	0,96	9,3E-05
ABTS	0,43	-0,01	1,00	0,63
Chalconas	0,19	0,47	-0,06	1,00

3.6. Mapa de calor y dendrograma

Se elaboró un mapa de calor con un dendrograma. Este estudio utiliza una técnica de visualización de datos que mide la magnitud de un fenómeno de color en dos dimensiones. La variación de color se puede expresar por tono o intensidad, agrupando filas y columnas similares. Se divide en tres grupos: el primero está compuesto por CAS-EAM, Agua destilada-EAU, Agua destilada-MEC, Agua destilada-EAM, FGS-MEC, FGS-EAM, CAS-MEC, CAS-EAU; el segundo está compuesto por LGH-EAU, LGH-EAM, LGH-MEC, FGS-EAU, CU-EAM, CU-EAU, ET-EAM, ET-MEC, CU-MEC; y el tercero está compuesto por ET-EAU, OIL-EAU, OIL-MEC y OIL-EAM (Figura 5). El primer grupo se caracteriza por su baja concentración de flavonoides y chalconas, y una capacidad antioxidante media. El segundo grupo presenta una alta concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, una baja concentración de chalconas y una alta capacidad antioxidante. El tercer grupo presenta una baja concentración de compuestos fenólicos y una concentración muy alta de flavonoides, un contenido medio/alto de chalconas totales, así como una capacidad antioxidante media. El grupo 2 mostró el mayor rendimiento en moléculas con capacidad antioxidante. El método de extracción no influyó en la diferenciación de grupos, pero lo contrario sucedió con la variación de los solventes de extracción.

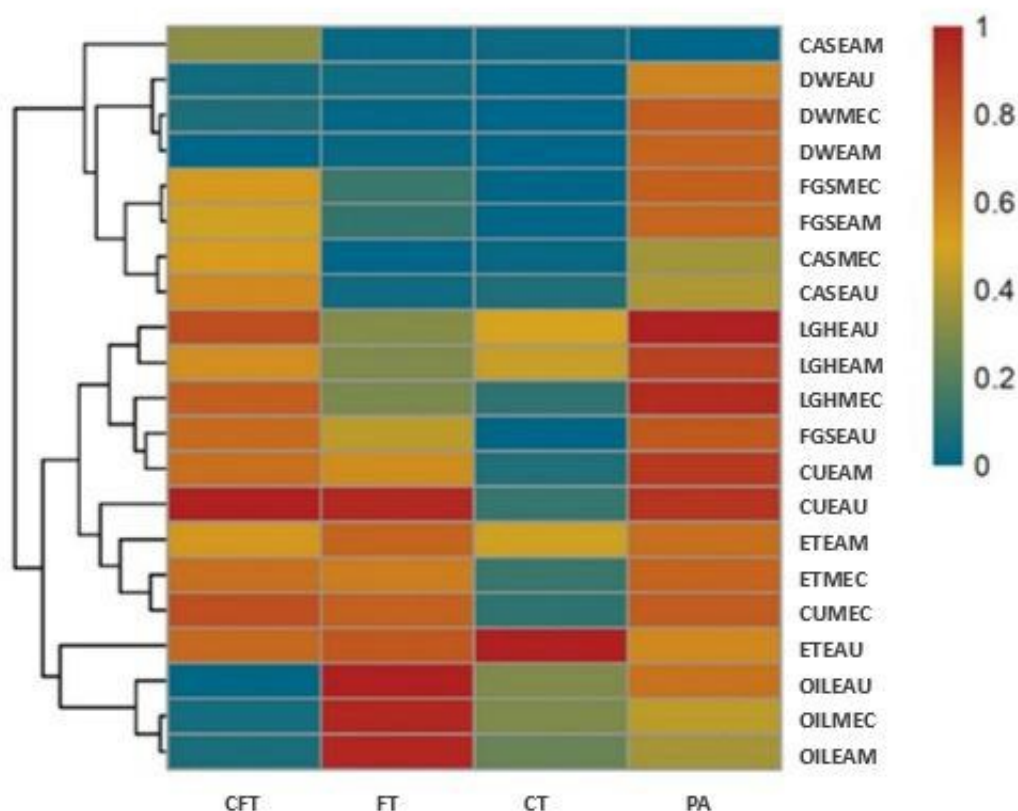


Figura 5. Mapa de calor y dendrograma del contenido fenólico total (CFT), flavonoides totales (FT), chalconas totales (CL) y poder antioxidante (PA) de extractos obtenidos con métodos convencionales y no convencionales. EAM: extracción asistida por microondas; EAU: extracción asistida por ultrasonidos; MEC: Método de extracción convencional; DW: agua destilada; ET: etanol; NaDESs: LGH (ácido láctico: glucosa), CAS (sacarosa: ácido cítrico), CU (cloruro de colina: urea) y FGS (fructosa: glucosa: sacarosa).

3.7. Actividad antifúngica

3.7.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a hongos dermatofitos.

Las infecciones fúngicas cutáneas son causadas principalmente por hongos filamentosos queratinófilos (dermatofitos), que utilizan la queratina como nutrientes en las infecciones de la piel, el cabello y las uñas (Massiha et al., 2015). Las especies de dermatofitos como *Trichophyton* representan hasta el 70% de las dermatofitosis en todo el mundo. Aunque hay antifúngicos convencionales disponibles, incluidos azoles, alilaminas y derivados de morfina, varios efectos secundarios contribuyen al fracaso de la terapia (Bouchara et al., 2021). Por ello, los productos naturales podrían representar una terapia alternativa para la dermatofitosis (Massiha et al., 2015; Carrizo et al., 2020; Bouchara et al., 2021). En trabajos previos, se demostró el efecto de los extractos metanólicos y clorofórmicos de Z.

punctata sobre levaduras como *C. albicans* aisladas de infecciones de piel y vaginales y sobre hongos dermatofitos aislados de infecciones de la piel (*Microsporium gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*) (Agüero et al., 2010; Nuño et al., 2014; Moreno et al., 2018).

En este trabajo de Tesis Doctoral se evaluó la actividad de cada extracto de *Z. punctata* obtenido con solventes verdes en comparación con sus correspondientes controles de solventes en *T. mentagrophytes* (Figura 6). El NaDES CAS mostró un efecto inhibitor sobre el crecimiento fúngico debido al efecto osmótico de la sacarosa, uno de sus constituyentes. Otros autores habían informado previamente el mismo comportamiento (Luard, 1982; Cui et al., 2010). Sin embargo, los compuestos extraídos con CAS no mostraron actividad sobre el crecimiento fúngico. Los extractos de *Z. punctata* obtenidos mediante el método convencional con aceite, etanol, LGH y CU como disolvente mostraron una alta capacidad inhibitora del crecimiento de *T. mentagrophytes*, con los valores de CIM más bajos (Tabla 9).

Zp LGH y Zp CU mostraron una elevada potencia antifúngica la que resultó similar en extractos obtenidos por métodos convencionales y no convencionales y superior a la de otros solventes verdes. Como se explicó previamente, estos extractos están enriquecidos con chalconas y flavonoides totales.

En cuanto a la potencia de los extractos etanólicos, podemos ver que los valores de CIM del extracto obtenido mediante MEC y extracción asistida por microondas y ultrasonido disminuyeron (62,50; 31,17; 15 µEAG/mL, respectivamente) indicando un aumento de potencia para las extracciones asistidas por microondas y ultrasonido (Tabla 3). Sin embargo, cuando se expresan los valores de CIM en concentración de DHC puede apreciarse que los valores de CIM de los extractos etanólicos obtenidos con asistencia de microondas y ultrasonido son semejantes a los obtenidos para extractos en LGH y CU con métodos de maceración convencionales. Estudios previos indican que los extractos etanólicos contienen otras chalconas además de DHC y DHMC, así como flavonas, flavanonas y derivados del ácido cafeico (Moreno et al., 2018; Isla et al., 2021).

Los extractos obtenidos con FGS y los extractos acuosos no mostraron efecto antifúngico, probablemente debido al bajo nivel de chalconas y flavonoides totales. Cabe destacar que el valor de CIM obtenido para la chalcona aislada de *Z. punctata* (6,4 µg/mL) fue similar al valor de CIM del antifúngico comercial, ketoconazol.

Tabla 9. Actividad antifúngica de extractos de *Zuccagnia punctata* obtenidos por método convencional y no convencional utilizando diferentes solventes sobre el hongo *T. mentagrophytes*.

Valores CIM						
Solventes	MEC		EAM		EAU	
	µg EAG/mL	µg DHC/mL	µg EAG/mL	µg DHC/mL	µg EAG/mL	µg DHC/mL
DW	I	I	I	I	I	I
Etanol 60°	62,5	19,34	31,17	6,05	15	6,33
Aceite vegetal	7,5	6,23	7,5	6,23	7,5	6,23
LGH	62,5	8,71	31,17	9,95	31,17	10,26
CU	125	8,84	125	8,84	125	8,84
FGS	I	I	I	I	I	I
CAS	I	I	I	I	I	I
Compuestos antifúngicos de referencia						
DHC	6,4					
Ketoconazol	8					

I: inactivo. EAM: extracción asistida por microondas; EAU: extracción asistida por ultrasonidos; MEC: Método de extracción convencional; DW: agua destilada; LGH (ácido láctico: glucosa), CAS (sacarosa: ácido cítrico), CU (cloruro de colina: urea) y FGS (fructosa: glucosa: sacarosa). DHC: 2',4'-dihidroxi-chalcona, EAG: equivalente de ácido gálico

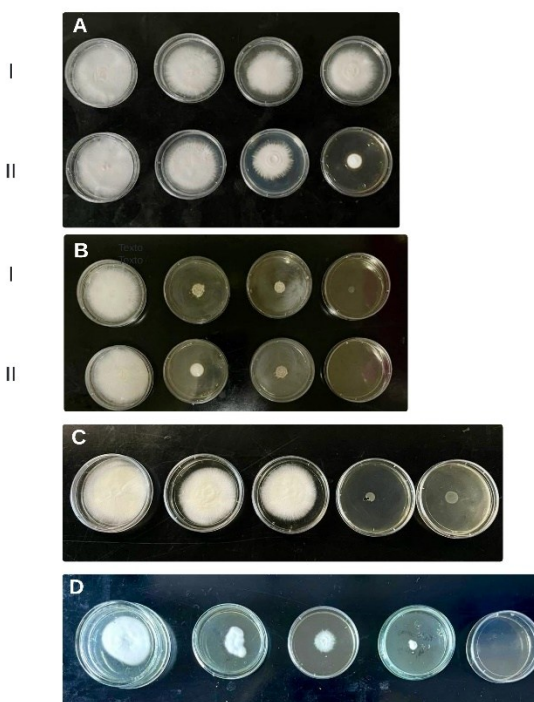


Figura 6. Método de macrodilución en agar de extractos de *Z. punctata* contra *T. mentagrophytes*. (A) I: Control de solvente CU; II: Extracto obtenido con CU: control de cepa, 31,25 µg EAG/mL, 62,50 µg EAG/mL, 125 µg EAG/mL (CIM 125 µg EAG/mL). (B) I: Control de solvente CAS II: Extracto obtenido con CAS: inactivo (El solvente CAS fue activo); (C) 2', 4'-dihidroxichalcona (DHC): control de cepa, 1,6 µg DHC/mL; 3,2 µg DHC/mL, 6,4 µg DHC/mL; 12,8 µg DHC/mL (CIM 6,4 µg DHC/mL). (D) ketoconazol: control de cepa, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL (CIM 8 µg/mL). EAG: equivalente de ácido gálico

3.7.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a levaduras.

La onicomicosis es la enfermedad infecciosa ungueal más común y causa aproximadamente el 50 % de las consultas por trastornos ungueales. Se ha descrito como una enfermedad relacionada con el género y la edad, siendo más prevalente en varones y aumentando con la edad en ambos sexos (Heikkla y Stubb, 1995). En la mayoría de los casos, esta infección es causada por dermatofitos antropofílicos, en particular por *Trichophyton rubrum*, seguido de *Trichophyton mentagrophytes*. Los mohos no dermatofitos, como *Scopulariopsis brevicaulis* y *Aspergillus* spp., pueden estar involucrados en la onicomicosis como patógenos primarios o como agentes contaminantes y patógenos secundarios (Nouripour-Sisakht et al 2015). Las levaduras, como *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*, representan la tercera causa de infección fúngica de las uñas, y ocurren solo cuando están presentes factores predisponentes,

principalmente inmunosupresión y diabetes (Jayatilake et al 2009). La especie de mayor prevalencia asociada a procesos patológicos es *Candida albicans*. Sin embargo, otras especies del género, como *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, y *Candida tropicalis*, han sido igualmente documentadas como agentes etiológicos en infecciones que afectan tanto a humanos como a animales (Sardi et al., 2013). Por ello se evaluó la actividad antifúngica de los extractos LGH y CU, frente a cinco cepas de diferentes especies de *Candida* y tres cepas *Saccharomyces cerevisiae* ya que presentan mayor potencia antioxidante y actividad frente a hongos dermatofitos. El extracto de Zp -LGH fue activo para todas las cepas ensayadas, Zp-CU fue activo solo sobre *C. glabrata* (Tabla 10). Se encontraron valores de CIM para Zp-LGH entre 125 y 500 µg EAG/mL. Aligiannis et al. (2001) propusieron una clasificación de la potencia antifúngica para antifúngicos herbales basada en los resultados de la CIM: inhibidores fuertes, (CIM ≤ 500 µg/mL); moderado (CIM de 600-1500 µg/mL); y débiles (CIM > 1600 µg/mL). En base a este criterio, podríamos considerar al extracto Zp- LGH un inhibidor fuerte frente a todas las cepas de levaduras ensayadas y a Zp- CU inhibidor fuerte frente a *C. glabrata* 031982. Los valores de CIM contra *C. glabrata* y *C. tropicalis* obtenidos para los extractos LGH y CU de *Z. punctata* fueron menores que los reportados para los extractos en diclorometano de la misma especie (Nuño et al., 2014).

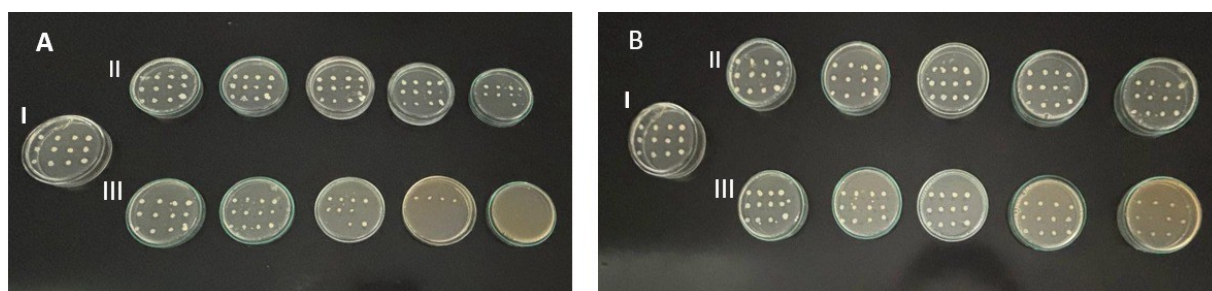


Figura 6. Método de macrodilución en agar de extractos de *Z. punctata* frente a 12 cepas de levaduras. (A) I: Control de cepas. II: Control de solvente LGH; III: Extracto obtenido con LGH: 31,25 µg GAE/mL, 62,50 µg EAG/mL, 125 µg EAG/mL, 250 µg EAG/ml, 500 µg GAE/ml. (B) I: Control de cepas. II: Control de solvente CU. III: Extracto obtenido con CU: 31,25 µg EAG/mL, 62,50 µg EAG/mL, 125 µg EAG/mL, 250 µg EAG/ml, 500 µg EAG/ml.

Tabla 10. Actividad antifúngica de los extractos de Zp- CU y Zp- LGH frente a levaduras.

Cepas	Número de colección	CIM (µg EAG/ml)	
		Extracto Zp- LGH	Extracto Zp- CU
<i>Candida albicans</i>	144783	500	
<i>Candida albicans</i>	134333	500	NA
<i>Candida glabrata</i>	042030	250	NA
<i>Candida glabrata</i>	031646	250	500
<i>Candida tropicalis</i>	1841	250	NA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	124263	125	NA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	134544	125	NA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	124263	125	NA

NA: No activo

3.8. Toxicidad

Los componentes más utilizados para la formación de NaDES son cloruro de colina, ácidos orgánicos, y azúcares que en general son reactivos económicos, biodegradables y no tóxicos, usados como aditivos nutricionales humanos y animales. El cloruro de colina está incluido en el Código Alimentario Argentino (CAA) en el Capítulo XVII en fórmulas para lactantes y niños de corta edad ya que la colina es un nutriente clave en estas fórmulas y en alimento de animales. El CAA también regula la glucosa (utilizada en la elaboración de los NaDES) y sus derivados en varios artículos, definiendo sus características y estableciendo requisitos para su uso en distintos alimentos, incluyendo especificaciones técnicas, siendo mencionada en capítulos sobre jarabes, miel y alimentos dietéticos para asegurar la calidad y seguridad alimentaria. En el CAA, el ácido láctico y sus sales están permitidos como aditivos para estabilizar, preservar y saborizar alimentos. Por otro lado, estos compuestos son utilizados en formulas farmacéuticas. Así, el cloruro de colina se utiliza como compuesto activo o coadyuvante, el ácido láctico se emplea como acidulante, en soluciones parenterales y en formulaciones magistrales, la glucosa en diversos productos farmacéuticos y cosméticos y la urea en cremas queratinolíticas. La Farmacopea Argentina establece los estándares para la pureza y calidad de estos productos. La toxicidad de algunos NaDES basados en cloruro de colina, glucosa, urea y ácido láctico han sido previamente analizados en modelos in vitro utilizando peces y líneas celulares humanas, demostrando que no son tóxicos ni

fitotóxicos frente a semillas de diferentes especies vegetales y son biodegradables en diversos modelos (Radošević et al., 2015; Wen et al., 2015). Los ensayos de toxicidad aguda frente a *Artemia salina* realizados en este trabajo de Tesis doctoral revelan ausencia de toxicidad aguda en el rango de concentraciones en las que los extractos de *Z. punctata* obtenidos con NaDES LGH y CU son bioactivos como antifúngicos y antioxidantes (hasta 250 µg/mL). Estos hallazgos indican que los NaDES utilizados y los extractos obtenidos tienen un perfil ecológico y buenas perspectivas para un uso más amplio en el ámbito de las tecnologías ecológicas. Por ello, para profundizar en el conocimiento de la sustentabilidad de las tecnologías utilizadas se decidió evaluar la eficiencia energética y la huella de carbono.

3.9. Eficiencia Energética y Huella de Carbono

Actualmente, asistimos a una transformación global hacia fuentes de energía renovables y a un abandono del uso de combustibles como el carbón, el petróleo y el gas natural. Este proceso tiene varias dimensiones. Es necesario limitar las emisiones de dióxido de carbono para frenar el cambio climático, proteger el medio ambiente y mantener las condiciones de vida de la población mundial. Además, el aumento observado en los precios de las materias primas y la energía impulsa aún más el uso de fuentes alternativas como el sol y el viento. Reducir el consumo energético de los métodos de extracción y análisis químico ha sido uno de los principales postulados de la química analítica verde, debatido durante muchos años. En la situación actual de crisis económica, cobra mayor importancia que antes. De allí el interés de convertir la energía utilizada en la huella de carbono real, expresada por la masa de dióxido de carbono emitida a la atmósfera por cada miligramo de compuesto fenólico extraído a partir de partes aéreas de *Z. punctata* para dimensionar la sustentabilidad del proceso seleccionado para la producción de extractos.

Se determinó el consumo energético y la huella de carbono relativa de los procesos de extracción de polifenoles de partes aéreas de *Z. punctata* por maceración, ultrasonido y microondas utilizando solventes verdes (LGH y CU) ya que estos extractos resultaron los más activos como antioxidante y antifúngico (Tabla 11). Para el cálculo de la huella de Carbono se consideró el factor de emisión correspondiente a la matriz energética argentina de 0,387 kg de CO₂/kWh. Como puede apreciarse los datos obtenidos de huella de carbono por gramo de compuesto fenólico producido es bajo y semejante en todos los métodos utilizados (11 a 15 Kg de CO₂/g de compuestos fenólicos expresado en equivalente de ácido galico). Otros autores encontraron valores de 15 kg CO₂/g de extracto aromático de romero obtenido por fluido supercrítico y 8 kg CO₂/g de extracto de romero obtenido por hidrodestilación (Moura et al., 2022). Carlqvist et al., 2022 compararon métodos de extracción de polifenoles de corteza

de abeto y encontraron valores de 0,2; 19 y 6 Kg de CO₂/g de compuestos fenólicos cuando se realizan extracciones con agua caliente, ultrasonido y fluido supercrítico. Los resultados presentados en esta Tesis resaltan claramente la ventaja ambiental del método usado en términos de eficiencia energética e impacto climático por unidad de compuesto fenólico funcional obtenido.

Los pilares del protocolo de trabajo desarrollado para la extracción de polifenoles de *Z. punctata* son las tecnologías nuevas e innovadoras y los solventes verdes utilizados, así como la eficiencia energética lograda.

Tabla 11: Eficiencia energética y huella de carbono calculada para los diferentes métodos de extracción para la obtención de compuestos fenólicos totales (CFT) a partir de partes aéreas de *Z. punctata* Cav.

	MEC		EAU		EAM	
	LGH	CU	LGH	CU	LGH	CU
Eficiencia energética KWh	0,204	0,204	0,300	0,300	0,205	0,205
Huella de carbono relativa Kg CO₂/g EAG	12	11	18	14	15	13

EAM: extracción asistida por microondas; EAU: extracción asistida por ultrasonidos; MEC: Método de extracción convencional; LGH (ácido láctico: glucosa), CU (cloruro de colina: urea), g EAG: gramo equivalente de ácido gálico (Compuestos fenólicos totales)

En base a los resultados obtenidos proponemos una nueva metodología respetuosa con el medio ambiente que utiliza NaDES como solvente para la extracción de compuestos fenólicos de las partes aéreas de *Z. punctata*. Los extractos obtenidos utilizando NaDESs LGH y CU presentan una actividad antifúngica frente a dermatofitos y antioxidante similar o superior a la del extracto etanólico o de aceite vegetal mientras que sobre hongos levaduriformes se destaca la potencia de los extractos de *Z. punctata* en NaDES LGH. La extracción con NaDES se ha combinado con dos procedimientos: EAU y EAM, para mejorar el rendimiento de la extracción. Los extractos obtenidos con solventes verdes de partes aéreas de *Z. punctata* podrían ser una alternativa para el tratamiento de micosis producidas por hongos dermatofitos y levaduriformes del género *Candida*. Estos hallazgos resaltan la importancia del uso de solventes ecológicos como los NaDES para obtener compuestos bioactivos de plantas con posibles aplicaciones en la industria cosmética y farmacéutica.



4. RESULTADOS Y DISCUSION:

**Desarrollo de formulaciones
tópicas antimicóticas de
extractos de *Zuccagnia
punctata* en solventes
eutécticos profundos naturales
(NaDES). Estudio de
estabilidad**

De acuerdo con lo descrito en esta Tesis Doctoral, los NaDES LGH y CU permitieron una adecuada recuperación de compuestos fenólicos totales y chalconas. El contenido total de compuestos fenólicos en los extractos de *Z. punctata*-LGH y *Z. punctata*-CU obtenido por métodos convencionales fue de 7833 µg EAG/mL y 7280 µg EAG/mL, respectivamente. Ambos extractos contenían chalconas bioactivas, 100 µg/mL de DHC y 110 µg/mL de DHMC. Con ellos se realizaron 3 formulaciones de acuerdo con la descripción realizada en Materiales y Métodos. La mezcla de vehículos (glicerol y propilenglicol) se añadió a cada extracto para obtener las formulaciones tópicas antimicóticas (FTAs) de extracto de *Z. punctata* basado en NaDES LGH (FTA de Zp-LGH), FTA de extracto de *Z. punctata* basado en NaDES CU (Zp-CU) y FTA de extracto de *Z. punctata* basado en NaDES LGH con el agregado de 11% de urea (FTA de Zp-LGH + 11 % de urea). También se prepararon controles negativos, que contenían solo los vehículos y el solvente NaDES LGH, NaDES CU y NaDES LGH con el agregado de 11% de urea.

Los agentes suavizantes, como la urea y el ácido láctico, presentes en NaDES CU y LGH, respectivamente, podrían mejorar la penetración de los ingredientes bioactivos de *Z. punctata*. Se ha demostrado que la urea tiene un efecto disolvente de las uñas (Emtestam et al., 2012) mientras que el ácido láctico tiene propiedades exfoliantes e hidratantes (Emtestam et al., 2012).

Los vehículos utilizados, glicerol y propilenglicol, son considerados solventes ecológicos y de uso frecuente en el diseño de NaDES (Díaz-Álvarez y Cadierno, 2013; Koigerova et al., 2023). El propilenglicol también podría tener un efecto humectante y queratinolítico en la uña (Emtestam et al., 2012). Este efecto sinérgico entre los solventes eutécticos, los vehículos humectantes y los agentes suavizantes podría contribuir significativamente a la actividad antifúngica observada frente a dermatofitos y levaduras.

Las formulaciones de *Z. punctata* basadas en NaDES y adicionadas con glicerol y propilenglicol se mantuvieron durante 12 meses a temperatura ambiente (27 °C) y se determinó la estabilidad sensorial, química, física, biológica y microbiológica cada dos meses. También se realizaron estudios de estabilidad acelerada durante 3 meses.

La incorporación de los extractos de *Z. punctata* en formulaciones con glicerol y propilenglicol resultó adecuada desde el punto de vista fisicoquímico y microbiológico. La estabilidad observada durante 12 meses sugiere una buena compatibilidad entre los componentes, posiblemente debido a la naturaleza hidrofílica de los NaDES y a la capacidad de los vehículos para mantener la humedad y evitar la precipitación de los compuestos activos. Este comportamiento coincide con lo descrito para otras formulaciones naturales basadas en solventes eutécticos, donde la estabilidad y la biodisponibilidad de

los activos se vieron favorecidas por la estructura supramolecular del sistema (Jeliński et al., 2019; Zhou et al., 2024; Pawar y Borkar, 2025; Sangiorgi et al., 2025).

4.1. Caracterización sensorial de la formulación tópica antifúngica con *Z. punctata* en NaDES

Las formulaciones presentaron una consistencia líquida, un color ámbar claro y un aroma agradable. El color ámbar claro del extracto de LGH se mantuvo en la FTA—ZpLGH con y sin el agregado de urea durante 12 meses. El color ámbar del FTA- ZpCU se intensificó con el tiempo, primero a ámbar oscuro a los 4 meses (T4) y llegando a un color amarronado a los 12 meses. Los valores del parámetro L^* indican una luminosidad media en todos las FTA-Zp LGH con y sin urea ($L^* \leq 33,03$), mientras que la FTA ZpCU mostró la luminosidad más baja (entre 37,56 y 27,90). Los valores del parámetro a^* (de verde a rojo) fueron positivos (valores a^* entre 0,48 y 3,27), lo que indica una preponderancia del rojo sobre el verde. Los valores del parámetro b^* (de azul a amarillo) fueron positivos (valores b^* entre 1,38 y 6,78), lo que sugiere la primacía del amarillo sobre el azul (Tabla 1).

La intensificación del color observada en la FTA—ZpCU a lo largo del tiempo coincide con lo informado en otras formulaciones tópicas elaboradas a base de extractos vegetales, donde se ha descrito un oscurecimiento progresivo asociado a reacciones de oxidación de los compuestos fenólicos presentes (Cao et al., 2021). De manera consistente, Pinto et al. (2021) observó una disminución de la luminosidad y un incremento significativo en los valores de a^* y b^* tras 30 días de almacenamiento en una formulación que contenía extracto de cáscaras de *Castanea sativa*.

Por su parte, la estabilidad cromática de las formulaciones con extracto LGH podría atribuirse a la presencia de ácido láctico en el NaDES LGH que brinda a la formulación un pH más bajo que el de la formulación con CU favoreciendo su conservación mediante una interacción más favorable entre los componentes del NaDES y los excipientes de la formulación.

Tabla 1: Parámetros CIELAB del color de las formulaciones antifúngicas.

Formulación	L*	a*	b*
ATF-ZpLGH T ₀	38,33±0,39	0,53±0,42	2,41±0,08
ATF-ZpLGH T ₂	38,15±0,02	0,96±0,06	3,51±0,65
ATF-ZpLGH T ₄	38,12±0,97	0,98±0,09	3,34±0,03
ATF-ZpLGH T ₁₂	33,28±0,76	2,94±0,87	4,86±1,09
ATF-ZpLGH T' ₀	37,16±0,14	1,36±0,11	4,03±0,31
ATF-ZpLGH T' ₂	36,96±0,19	0,91±0,20	3,37±0,56
ATF-ZpLGH+11% urea T ₀	38,95±0,87	0,48±0,85	2,60±0,05
ATF-ZpLGH+11% urea T ₂	38,43±2,08	0,65±0,32	2,64±0,21
ATF-ZpLGH+11% urea T ₄	37,99±0,77	0,77±1,10	2,73±0,66
ATF-ZpLGH+11% urea T ₁₂	33,03±1,33	3,27±0,05	6,78±0,53
ATF-ZpLGH+11% urea T' ₀	36,79±0,98	1,16±0,03	4,80±0,08
ATF-ZpLGH+11% urea T' ₂	35,55±1,11	1,00±0,65	4,05±0,32
ATF-ZpCU T ₀	37,56±0,87	1,82±0,38	4,52±0,03
ATF-ZpCU T ₂	37,49±0,29	1,96±0,10	3,42±0,87
ATF-ZpCU T ₄	37,41±0,23	1,18±0,07	3,12±0,87
ATF-ZpCU T ₁₂	27,90±0,56	1,67±0,32	1,38±0,98
ATF-ZpCU T' ₀	32,30±0,45	2,09±0,08	2,86±0,05
ATF-ZpCU T' ₂	34,36±0,35	2,22±0,04	2,07±0,16

Zp: *Z. punctata*; FTA: formulación tópica antifúngica; ZpLGH: extracto de Zp en LGH; ZpLGH + 11 % de urea: extracto de Zp en LGH más urea; Zp CU: extracto de Zp en CU; T₀: tiempo inicial de almacenamiento; T₁₂: 1 año de almacenamiento.

4.2. Estudios de estabilidad

4.2.1. Estabilidad fisicoquímica

Se analizó el contenido de polifenoles y flavonoides cada dos meses durante los 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente del producto desarrollado. Se observó una ligera disminución del contenido de compuestos fenólicos totales en la FTA Zp-LGH (4,21%), mientras que para la FTA Zp-LGH-urea fue de alrededor del 8,50% durante el año de almacenamiento a temperatura ambiente (Tabla 2). Sin embargo, para la FTA Zp-CU, se mantuvo constante. No se observaron diferencias significativas en el contenido de flavonoides en ninguna de las formulaciones luego de 12 meses de almacenamiento a 25 °C. El mismo comportamiento se observó en las pruebas de estabilidad acelerada.

Estos resultados indican que las formulaciones a base de extractos de *Z. punctata* son estables desde el punto de vista químico a lo largo del tiempo, lo cual respalda su potencial aplicación en productos tópicos de origen natural.

Tabla 2: Estabilidad química de formulaciones tópicas antifúngicas (FTA). Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT) en las FTA de extractos de *Z. punctata* obtenidos con solventes verdes

	FTA Zp-LGH		FTA Zp-LGH urea		FTA Zp-CU	
Formulaciones	CFT (µg EAG/mL)	FT (µg EQ/mL)	CFT (µg EAG/mL)	FT (µg EQ/mL)	CFT (µg EAG/mL)	FT (µg EQ/mL)
Tiempo de almacenamiento a 25°C						
T ₀	1946±1,45 ^{Aab}	72 ±2,82 ^{Ab}	1924±6,95 ^{Aab}	72±2,14 ^{Ab}	1312±8,48 ^{Aa}	152±2,15 ^{Ac}
T ₁₂	1864±5,78 ^{Aab}	76±1,87 ^{Ab}	1760±8,01 ^{Aab}	70±4,32 ^{Ab}	1316±10,43 ^{Aa}	148±11 ^{Ac}
Estabilidad acelerada a 40° C						
T ₀	1826±11,31 ^{Aab}	76±2,18 ^{Ab}	1908±6,10 ^{Aab}	76±5,65 ^{Ab}	1312±4,99 ^{Aa}	136±4,24 ^{Ac}
T ₆	1788±9,65 ^{Aab}	66±2,82 ^{Ab}	1705±4,97 ^{Aab}	57±2,87 ^{Ab}	1306±4,99 ^{Aa}	114±3,11 ^{Ac}

Letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa (las letras mayúsculas y minúsculas son para diferencias entre solventes de extracción y tiempo de almacenamiento, respectivamente, según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). Los análisis se realizaron para compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides (F), de forma independiente. Zp: *Z. punctata*; FTA: formulación total antifúngica; ZpLGH: extracto de Zp en LGH; ZpLGH + 11% urea: extracto de Zp en LGH más urea; Zp CU: extracto de Zp en CU; T0: tiempo inicial de almacenamiento; T12:< 1 año de almacenamiento.

4.2.2. Estabilidad biológica de las formulaciones tópicas antifúngicas

Efecto antifúngico

En trabajos previos se demostró el efecto de los extractos metanólicos y clorofórmicos de *Z. punctata* sobre hongos dermatofitos aislados de infecciones cutáneas (*Microsporum gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*) así como especies de *Candida* (Svetaz et al., 2007; Agüero et al., 2010; Nuño et al., 2014; Butassi et al., 2015; Moreno et al., 2018). La actividad se atribuyó a las chalconas (DHC y DHMC), considerados metabolitos marcadores de extractos de *Z. punctata*. Cabe destacar que los valores de CIM obtenidos para la chalcona aislada de *Z. punctata* (6,4 µg/mL) fueron similares a los valores de CIM del antifúngico comercial ketoconazol. En este Trabajo de Tesis Doctoral se evaluó la actividad de cada formulación obtenida a partir de extracto de *Z. punctata* en solventes verdes (LGH y CU) en comparación con sus correspondientes controles sobre *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* (Tabla 3).

Las formulaciones obtenidas con Zp-LGH con y sin el agregado de urea fueron las más activas para ambas cepas de hongos dermatofitos y su actividad se mantuvo para las formulaciones almacenadas durante un año a temperatura ambiente. La adición de urea a la FTA-Zp LGH no mejoró su actividad antifúngica in vitro.

La formulación con extracto Zp-CU fue menos activa mostrando valores de CIM más altos que los de las formulaciones con Zp-LGH, en concordancia con lo observado previamente para el extracto de *Z. punctata* en NaDES CU que resultó menos activo que el extracto de *Z. punctata* en NaDES LGH (Tabla 3).

Se analizó además el efecto de las formulaciones frente a ocho cepas de hongos levaduriformes (Tabla 4). Todas las formulaciones tópicas de ZpLGH resultaron activas sobre todas las cepas ensayadas con valor de CIM entre 62,5 a 125 µg GAE/mL resultando más activas que sus correspondientes extractos de ZpLGH. Resultados similares fueron informados por Espino et al. (2019), quienes observaron que los extractos de especies de *Larrea*, otra especie de jarilla, obtenidos mediante NaDES basados en ácido láctico y glucosa (LGH), añadidos directamente como ingredientes activos en una formulación tópica para la candidiasis dérmica, mostraron una marcada actividad antifúngica frente a especies de *Candida*. Según publicaciones previas, los NADES a base de ácidos orgánicos poseen mayor actividad antimicrobiana debido a su mayor acidez, la cual daña la membrana y las proteínas celulares (Stratford et al., 2009; Juneidi et al., 2016).

Tabla 3: Actividad antifúngica de FTA-Zp LGH, FTA-Zp LGH+11% urea y FTA-Zp CU frente a *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.

CIM (µg EAG/mL)											
Cepas	ZpLGH	FTA-ZpLGH			FTA-ZpLGH+urea			Zp-CU	FTA-ZpCU		
		T ₀	T' ₂	T ₁₂	T ₀	T' ₂	T ₁₂		T ₀	T' ₂	T ₁₂
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	62,5	31,5	31,5	31,5	31,5	31,5	62,5	125	250	250	62,5
<i>Trichophyton rubrum</i>	62,5	31,5	31,5	31,5	31,5	62,5	62,5	125	125	125	62,5

Zp: *Z. punctata*; FTA: formulación tópica antifúngica; ZpLGH: extracto de Zp en LGH; ZpLGH + 11 % de urea: extracto de Zp en LGH más urea; Zp CU: extracto de Zp en CU; T₀: tiempo inicial de almacenamiento; T₁₂: 1 año de almacenamiento.

Asimismo, las formulaciones tópicas de ZpCU fueron más activas que los extractos de *Z. punctata* en NaDES CU resultando eficaz no solo frente a *Candida glabrata* (031646) sino también frente a *Candida tropicalis* (1841) y *Saccharomyces cerevisiae* (134544, 124263; 124263). La actividad de la FTA-ZpCU fue menor que la de FTA-ZpLGH. Cabe destacar que las formulaciones basadas en NaDES CU y LGH mantienen la actividad antifúngica luego de su almacenamiento a temperatura ambiente durante 12 meses.

La sensibilidad diferencial observada entre especies de *Candida* concuerda con estudios previos donde extractos polifenólicos de *Z. punctata* ricos en chalconas y flavonas obtenidas con solventes orgánicos demostraron mayor actividad frente a *C. glabrata* y *C. tropicalis* (Sato et al., 1994; Quiroga et al., 2001; Svetaz et al., 2007, 2010; Agüero et al., 2011; Nuño et al., 2014; Salazar-Aranda et al., 2015; Moreno et al., 2018).

Tabla 4: Actividad antifúngica de Zp CU y Zp LGH y formulación tópica obtenida con ellos frente a cepas de levaduras.

CIM (µg GAE/mL)								
Cepas	Zp LGH	Zp CU	FTA-ZpLGH T ₂	FTA-ZpLGH+11% urea T ₂	FTA-Zp CU T ₂	FTA-ZpLGH T ₁₂	FTA-ZpLGH+11% urea T ₁₂	FTA-Zp CU T ₁₂
Cepa 1	500	-	125	125	-	125	250	-
Cepa 2	500	-	125	125	-	125	250	-
Cepa 3	250	-	125	125	-	500	-	-
Cepa 4	250	500	125	125	125	250	-	125
Cepa 5	250	-	125	125	125	250	125	125
Cepa 6	125	-	125	125	125	125	125	125
Cepa 7	125	-	62,5	62,5	125	125	250	125
Cepa 8	125	-	62,5	62,5	125	125	250	125

Cepa 1: *Candida albicans* (144783); Cepa 2: *Candida albicans* (134333); Cepa 3: *Candida glabrata* (042030); Cepa 4: *Candida glabrata* (031646); Cepa 5: *Candida tropicalis* (1841); Cepa 6: *Saccharomyces cerevisiae* (134544); Cepa 7: *Saccharomyces cerevisiae* (124263); Cepa 8: *Saccharomyces cerevisiae* (124263). Zp: *Z. punctata*; FTA: formulación tópica antifúngica; ZpLGH: extracto de Zp en LGH; ZpLGH + 11 % de urea: extracto de Zp en LGH más urea; Zp CU: extracto de Zp en CU; T₀: tiempo inicial de almacenamiento; T₁₂: 1 año de almacenamiento.

Actividad antioxidante

Las infecciones fúngicas, como la onicomicosis, no solo implican una invasión fúngica, sino también una situación de estrés oxidativo que genera una respuesta inflamatoria como mecanismo de lesión (Bale et al., 2018). Este hecho favorece la persistencia del hongo y contribuye al daño estructural de la uña. Los antioxidantes reducen el daño oxidativo, potencian la acción antifúngica y promueven la

recuperación de la placa ungueal, lo que constituye una estrategia terapéutica complementaria de valor clínico (Pârvu et al., 2019).

Por ello, se analizó la potencia antioxidante de las formulaciones de *Z. punctata* y se comparó con la de los extractos de Zp LGH y Zp CU. Las formulaciones resultaron menos activas que los extractos correspondientes y mostraron una disminución de la capacidad antioxidante de aproximadamente el 50 % para FTA Zp-LGH con y sin el agregado de urea, y del 68 % para FTA Zp-CU, después de 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, en comparación con las formulaciones en el tiempo cero (Tabla 5). La estabilidad de la actividad antioxidante en formulaciones a base de extractos polifenólicos depende de composición química, del tipo de polifenoles y de las condiciones de almacenamiento. Otros autores mostraron efectos similares en formulaciones elaboradas con otros extractos vegetales (Carmagnani et al., 2023). De allí la importancia de realizar estos estudios cuantitativos a los efectos de definir el tiempo de conservación del producto.

Tabla 5: Actividad antioxidante de los extractos de Zp CU y Zp LGH y formulación tópica antifúngica obtenida con ellos.

Zp LGH	FTA Zp-LGH		FTA Zp-LGH urea		Zp CU	FTA Zp-CU	
CD ₅₀ (µg EAG/mL)							
	T ₀	T ₁₂	T ₀	T ₁₂		T ₀	T ₁₂
1,00	2,85	5,70	2,00	4,65	1,43	1,75	6,30

Zp: *Z. punctata*; FTA: formulación tópica antifúngica; ZpLGH: extracto de Zp en LGH; ZpLGH + urea: extracto de Zp en LGH más urea; Zp CU: extracto de Zp en CU; T₀: tiempo inicial de almacenamiento; T₁₂: 1 año de almacenamiento. CD₅₀: Concentración depuradora 50

4.2.3. Estabilidad microbiológica

No se observó el desarrollo de microorganismos aerobios viables, enterobacterias, hongos y levaduras en las formulaciones durante 12 meses de almacenamiento a 25 °C ni durante seis meses a 45 °C. Los resultados revelan la estabilidad microbiológica de las formulaciones obtenidas de acuerdo con lo establecido en la Farmacopea Argentina para productos medicinales de plantas.

4.3. Liberación *in vitro* de compuestos bioactivos de las formulaciones

Dado que las formulaciones de ZpLGH resultaron las más activas se las seleccionó para realizar los estudios de liberación. Los estudios de liberación *in vitro* de compuestos bioactivos mostraron que los compuestos fenólicos se liberaron gradualmente de FTA-ZpLGH en torno al 20 % durante las primeras 6 h de prueba. Posteriormente, la liberación de compuestos fenólicos se estabilizó durante 6 h (Figura 1). De las 12 a 24 horas, la liberación de bioactivos aumentó al 50 %.

Mediante cromatografía en capa fina se identificó la presencia de las chalconas liberadas en la solución receptora (Figura 2). Ensayos autográficos permitieron demostrar que las chalconas liberadas son las responsables de la actividad antifúngica y antioxidante. Por esta razón, estos compuestos podrían ser, en parte, responsables de la actividad biológica de la formulación fitofarmacéutica de *Z. punctata*.

Los resultados justifican el desarrollo de formulaciones tópicas con Zp-LGH.

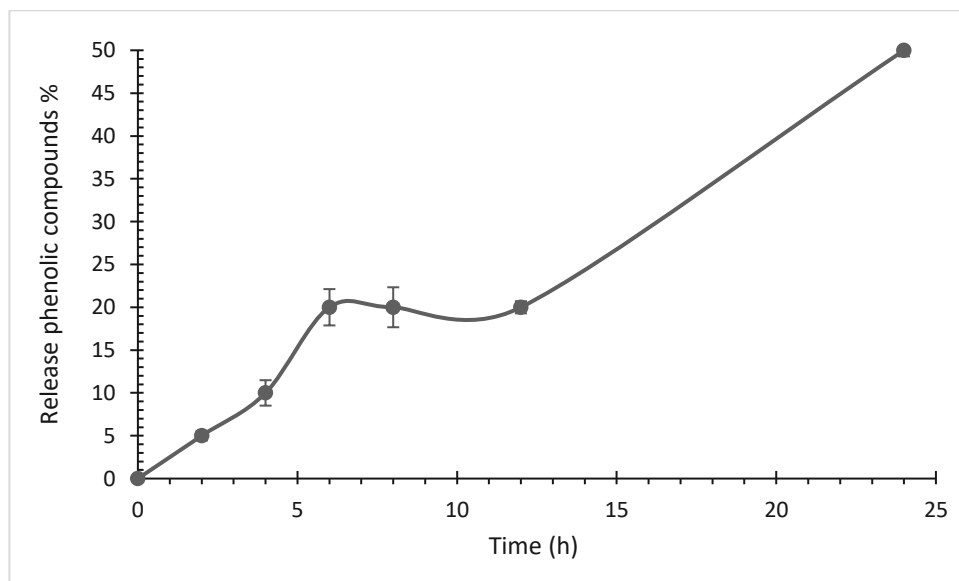


Figura 1: Ensayo de liberación de compuestos fenólicos de la formulación tópica antifúngica conteniendo extracto de *Z. punctata* en NaDES LGH (FTA-ZpLGH) en celda de difusión de Franz.

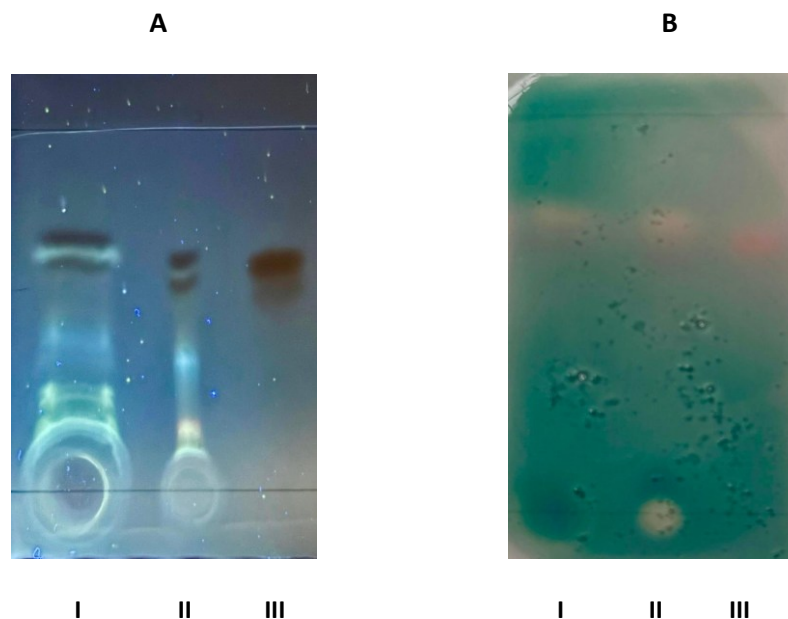


Figura 2: Cromatografía en capa fina y autografía frente a radical catión ABTS de la I) Formulación tópica antimicótica de extracto de *Zuccagnia punctata* obtenido con NaDES LGH (FTA Zp LGH), II) del material permeado en la celda de difusión de Franz a las 6 horas, III) DHC comercial A) Cromatografía revelada con Natural product. B) Ensayo autógrafo en ABTS^{•+}.

La formulación fitofarmacéutica tópica antifúngica de extracto de *Z. punctata* en solvente LGH podría utilizarse para tratar la onicomicosis causada por *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Candida* sp., lo que abre nuevas oportunidades para el uso de productos naturales en terapias multidiana. Su desarrollo y aplicación se alinea con los principios de la química verde y el bioprocesamiento sostenible.



5. DISCUSIÓN GENERAL

El presente trabajo de tesis doctoral abordó la valorización integral de *Zuccagnia punctata* Cav., una especie medicinal endémica del Monte argentino, a través de su estudio fitoquímico, la optimización de procesos de extracción sustentable y el desarrollo de formulaciones tópicas antifúngicas con potencial aplicación fitoterapéutica. La elección de esta especie se fundamentó en su amplio uso en la medicina tradicional regional, así como en antecedentes que documentan su elevada concentración de chalconas y otros compuestos fenólicos con reconocida actividad biológica. Extractos orgánicos de partes aéreas de *Z. punctata* presentaron actividad contra bacterias Gram-negativa multirresistentes a antibióticos aisladas de lesiones humanas, actividad antifúngica frente a cepas de hongos dermatófitos, frente a levaduras patógenas humanas, actividad antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral (Ávila et al., 2001; Zampini et al., 2005; Svetaz et al., 2007, 2010; Agüero et al., 2010; Morán Vieyra et al., 2009; Svetaz et al., 2010; Moreno et al., 2018; Carabajal et al., 2020a, b). Mas recientemente se plantea el posible rol del extracto como agente terapéutico en patologías crónicas asociadas a desequilibrios metabólicos e inflamatorios (Roco et al., 2018, Valoy et al., 2023 a, 2023b).

En este contexto, se propuso el empleo de solventes eutécticos profundos naturales (NaDES) como alternativa ecológica a los solventes orgánicos convencionales, en concordancia con los principios de la Química Verde (Anastas y Warner, 2000; Galuszka et al., 2012). Los resultados obtenidos confirman que las combinaciones ácido láctico:glucosa (LGH) y cloruro de colina:urea (CU) exhibieron excelente capacidad extractiva y estabilidad fisicoquímica, coincidiendo con los reportes de Dai et al. (2013) y Paiva et al. (2014), quienes destacaron la versatilidad de los NaDES para la recuperación de compuestos fenólicos.

La caracterización química de los extractos con NaDES reveló un perfil dominado por chalconas y flavonoides, con altos contenidos de dihidroxichalconas y dihidroximetoxichalconas.

Desde un punto de vista tecnológico y metodológico, la integración de los NaDES con técnicas de extracción asistidas por ultrasonido y microondas permitió reducir significativamente los tiempos de procesamiento, sin comprometer la calidad del extracto. Este resultado concuerda con estudios recientes que evidencian la sinergia entre NaDES y métodos no convencionales para la extracción de polifenoles (Zhuang et al., 2017; Negi et al., 2024). La reproducibilidad y estabilidad de los extractos obtenidos refuerzan la aplicabilidad de esta estrategia para la producción a escala piloto o industrial de ingredientes bioactivos.

En este trabajo se observó que el rendimiento de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante del extracto LGH, son comparables a las obtenidas con el extracto etanólico, lo que indica

que los NaDES permiten alcanzar eficiencias extractivas equivalentes a las de los solventes tradicionales, pero con menor impacto ambiental como lo indican el análisis efectuado de consumo energético y huella de carbono por mg de CFT. Estos resultados respaldan la hipótesis de que los NaDES son medios extractivos verdes y seguros para la recuperación de metabolitos fenólicos bioactivos (Dai et al., 2013; Paiva et al., 2014; Radošević et al., 2015).

Esta similitud en la eficiencia puede atribuirse a la capacidad de los NaDES para establecer redes de enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos, lo que favorece su solubilización y estabilidad en el medio extractivo (Liu et al., 2018; Dai et al., 2015).

Desde el punto de vista biológico, los extractos de *Z. punctata* obtenidos con NaDES demostraron una potente actividad antifúngica frente a levaduras y dermatofitos clínicamente relevantes, incluyendo *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *Trichophyton mentagrophytes*. Estos resultados concuerdan con los estudios de Derita et al. (2008) y Zampini et al. (2009), quienes atribuyeron la actividad antifúngica de los extractos metanólicos de *Z. punctata* a la presencia de chalconas, especialmente 2',4'-dihidroxichalcona. En este trabajo, sin embargo, la utilización de NaDES como medio extractivo permitió obtener extractos con una potencia antifúngica superior, evidenciando un efecto sinérgico entre los compuestos fenólicos extraídos y el medio eutéctico empleado. De hecho, la formulación LGH (por su contenido en ácido láctico y glucosa) confirió además propiedades antimicrobianas y queratinolíticas, potenciando la acción antifúngica en formulaciones tópicas.

El desarrollo de las formulaciones tópicas antifúngicas experimentales constituyó un paso innovador dentro de este estudio. Los preparados elaborados con extractos NaDES mostraron excelente estabilidad fisicoquímica, adecuada homogeneidad y buena aceptabilidad sensorial, en línea con lo reportado por Vasylyev et al. (2022) en formulaciones cosméticas naturales enriquecidas con extractos fenólicos obtenidos por NaDES. En particular, la presencia de ácido láctico y urea en las formulaciones LGH y CU, respectivamente, contribuyen a mantener la hidratación y la permeabilidad de la piel y/o lámina ungueal, facilitando la penetración de los principios activos, propiedad esencial para el tratamiento tópico de la onicomycosis (Mertin y Lippold, 1997; Elewski et al., 2015). Asimismo, la ausencia de solventes orgánicos tóxicos confiere a estas formulaciones un perfil de seguridad superior y mayor compatibilidad dermatológica, atributos altamente valorados en el diseño de productos fitoterapéuticos.

El estudio de liberación in vitro con celdas de Franz permitió evaluar el comportamiento del extracto de *Zuccagnia punctata* incorporado en la formulación tópica elaborada con el sistema NaDES ácido

lático:glucosa (LGH). Los resultados evidenciaron una liberación gradual y sostenida de los compuestos fenólicos totales.

En síntesis, los resultados obtenidos permiten concluir que los NaDES constituyen una herramienta extractiva eficiente y ecológicamente compatible para la obtención de compuestos bioactivos de *Zuccagnia punctata*, capaces de mantener la estabilidad y funcionalidad de los metabolitos extraídos. Las formulaciones tópicas antifúngicas desarrolladas representan un prototipo innovador de productos fitoterapéuticos, con potencial aplicación clínica en el tratamiento de onicomicosis y otras micosis superficiales.

El conjunto de evidencias experimentales reunidas en este trabajo sienta las bases para futuros estudios enfocados en la evaluación toxicológica y farmacocinética in vivo, así como en la optimización de procesos de escalado y control de calidad, con el propósito de avanzar hacia la transferencia tecnológica y el registro de fitomedicamentos basados en *Z. punctata* y solventes verdes

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, A.P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K. (2004). Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 126(29) 9142-9147.
- Abbott, A.P., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K., Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications* (1) 70-71.
- Abbott, A. P., Harris, R. C., Ryder, K. S., D'Agostino, C., Gladden, L. F., & Mantle, M. D. (2011). Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. *Green Chemistry*, 13(1), 82-90.
- Abranches, D. O., & Coutinho, J. A. (2023). Everything you wanted to know about deep eutectic solvents but were afraid to be told. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 14(1), 141-163.
- Abu-Irmaileh, B.E., & Afifi, F.U. (2003). Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2-3) 193-197.
- Adhikari, S., Nath, P., Deb, V. K., Das, N., Banerjee, A., Pathak, S., & Duttaroy, A. K. (2025). Pharmacological potential of natural chalcones: a recent studies and future perspective. *Frontiers in Pharmacology*, 16, 1570385.
- Agüero, M.B., Svetaz, L., Sánchez, M., Luna, L., Lima, B., López, M.L., Zacchino, S., Palermo, J., Wunderlin, D., Feresin, G.E., Tapia, A. (2011). Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1970-1978.
- Agüero, M.B., Gonzalez, M., Lima, B., Svetaz, L., Sánchez, M., Zacchino, S, Tapia A. (2010). Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 194-201.
- Airouyuwa, J.O., Mostafa, H., Riaz, A., Maqsood, S. (2022). Utilization of natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction as green extraction technique for the recovery of bioactive compounds from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds: An investigation into optimization of process parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 91, 106233.
- Airouyuwa, J.O., Mostafa, H., Riaz, A., Stathopoulos, C., Maqsood, S. (2023). Natural deep eutectic solvents and microwave-assisted green extraction for efficient recovery of bioactive compounds from by-products of date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) processing: Modeling, optimization, and phenolic characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 16(4), 824-843.

- Al Aboody, M. S., & Mickymaray, S. (2020). Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics*, 9(2), 45.
- Alañón, M. E., Ivanović, M., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. (2020). Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1685-1701.
- Alberto, M.R., Nieva Moreno, M.I., Zampini, I.C., Isla, M.I. (2007). Anti-inflammatory activity of structurally related natural flavonoids. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6, 308-309.
- Aliyiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4168-4170.
- Allevato, M. A. J. (2010). Diseases mimicking onychomycosis. *Clinics in dermatology*, 28(2), 164-177.
- Alonso, J. (2015). Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud.
- Álvarez, M. A., Pedraza Kobak, C., Enrico, R. J., Danert, F., Zampini, I. C., & ISLA, M. I. (2024). Micropropagación de *Zuccagnia punctata*, planta medicinal argentina mediante tecnología “in vitro” para impulsar su conservación y producción sostenible de compuestos bioactivos.
- Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, T., Al-Wahaibi, Y. M., & Hashim, M. A. (2012). Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties. *Thermochimica Acta*, 541, 70-75.
- Amarowicz, R., y Pegg, R.B. (2024). Condensed tannins—Their content in plant foods, changes during processing, antioxidant and biological activities. *Advances in Food and Nutrition Research*, 110, 327-398.
- Anastas, P. T. (1999). Green Chemistry and the role of analytical methodology development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), 167–175.
- Anastas, P.T. y Warner, J.C. (2000). *Green Chemistry: theory and practice*, Oxford university press Oxford.
- Aroso, I. M., Paiva, A., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2017). Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine—Physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 241, 654-661.

- Avila, V., Bertolotti, S.G., Criado, S., Pappano, N., Debattista, N., García, N.A. (2001) Antioxidant properties of natural flavonoids: Quenching and generation of singlet molecular oxygen. *Journal of Food Science and Technology*, 36, 25-33.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Bale, A.T., Khan, K.M., Salar, U., Chigurupati, S., Fasina, T., Ali, F., Perveen, S. (2018) Chalcones and bis-chalcones: as potential α -amylase inhibitors; synthesis, in vitro screening, and molecular modeling studies. *Bioorganic Chemistry*, 79, 179–189.
- Barboza, G.E., Cantero, J.J., Nuñez, C., Pacciaroni, A., Ariza Espinar, L. (2009). Medicinal plants: a general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 32, 7–365.
- Barry, T.N., & McNabb, W.C. (1999). The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British journal of nutrition*, 81(4), 263-272.
- Batovska, D.I. & Todorova, I.T. (2010). Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Current Clinical Pharmacology*, 5, 1–29.
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., ... & Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82-102.
- Bentley, J.; Olsen, E.K.; Moore, J.P.; Farrant, J.M. (2020). The phenolic profile extracted from the desiccation-tolerant medicinal shrub *Myrothamnus flabellifolia* using Natural Deep Eutectic Solvents varies according to the solvation conditions. *Phytochemistry*, 173, 112323.
- Bernstein, N., Akram, M., Daniyal, M., Koltai, H., Fridlender, M., Gorelick, J. (2018). Antiinflammatory Potential of Medicinal Plants: A Source for Therapeutic Secondary Metabolites. In *Advances in Agronomy*, 150, 131-183.
- Biasi-Garbin, R.P., Demitto, F. O., Amaral, R.C., Ferreira, M.R., Soares, L.A., Svidzinski, T.I., (2016). Potencial antifúngico de especies vegetales de la caatinga brasileña contra dermatofitos. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58:18.
- Bitwell, C., Indra, S.S., Luke, C., Kakoma, M.K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585.
- Bosiljkov, T., Dujmić, F., Bubalo, M. C., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatic, E., Rodojcic Redovnikovic, I., Jokić, S. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green

- approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 195-203.
- Bouchara, J.P.; Nenoff, P.; Gupta, A.K.; Chaturvedi, V. (Eds.). (2021). *Dermatofitos y dermatofitosis*; Springer International Publishing: Berlín/Heidelberg, Alemania
- Braguini, W.L., Alves, B.B., Pires, N.V. (2019). Toxicity assessment of *Lavandula officinalis* extracts in *Brine Shrimp (Artemia salina)*. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(6), 411-420.
- Brown, S. J. (2009). Efficacy of fluconazole for the treatment of onychomycosis. *Annals of Pharmacotherapy*, 43(10), 1684-1691.
- Bubalo, M.C., Ćurko, N., Tomašević, M., Ganić, K. K., Redovniković, I.R. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200, 159-166.
- Burkart, R., Bárbaro, N.O., Sánchez, R.O., Gómez, D.A. (1999) *Eco-regiones de la Argentina*. Ed. Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, Argentina, 42 pp
- Butassi, E., Svetaz, L.A., Ivancovich, J.J., Feresin, G.E., Tapia, A., Zacchino, S.A. (2015). Synergistic mutual potentiation of antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav. and *Larrea nitida* Cav. extracts in clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Phytomedicine*. 22: 666-578.
- Cabrera, A.L. (1976) *Regiones Fitogeográficas Argentinas*. In: Kugler WF (ed) *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, Segunda edición*. Ed. ACME, Buenos Aires, Argentina, 85 pp.
- Cabrera, A.L. & Willink, A. (1973) *Biogeografía de América Latina*. Ed. O. E. A. Serie de Biología, Washington, DC, Argentina, 120 pp..
- Cai, C., Li, F., Liu, L., & Tan, Z. (2019). Deep eutectic solvents used as the green media for the efficient extraction of caffeine from Chinese dark tea. *Separation and Purification Technology*, 227, 115723.
- Cai, C.Y., Rao, L., Rao, Y., Guo, J.X., Xiao, Z.Z., Cao, J.Y., Wang, B. (2017). Analogues of xanthone-chalcones and bis-chalcones as α -glucosidase inhibitors and anti-diabetes candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 130, 51–59.
- Cantero, J.C., Nuñez, C.O., Bernardello, G., Amuchástegui, A., Mulko, J., Brandolin, P., Palchetti, M.V., Iparraguirre, J., Virginil, N., Ariza Espinar, L. (2019) *Las plantas de importancia económica en Argentina*. 1st Ed, UniRío Editora, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina, 937 pp. <https://botanicaargentina.org.ar/wp-content/uploads/2019/06/978-987-688-332-0-baja-resoluci%C3%B3n.pdf>. (Last access, December 2019)
- Cao, H., Saroglu, O., Karadag, A., Diaconeasa, Z., Zoccatelli, G., Conte-Junior, C.A., Gonzales-Aguilar G.A., Ou, J., Bai, W., Zamarioli, C.M., De Freitas, L.A.P., Shpigelman, A., Campelo, P.H.,

- Capanoglu, E., Lik Hii, C., Jafari, S.M., Qi, Y., Liao, P., Wang, L.Z., Bourke, P., Simal-Gandara, J., Xiao, J. (2021). Available technologies on improving the stability of polyphenols in food processing. *Food Frontiers*, 2(2), 109-139.
- Cao, S., Liang, J., Chen, M., Xu, C., Wang, X., Qiu, L., Zhao, X. & Hu, W. (2025). Comparative analysis of extraction technologies for plant extracts and absolutes. *Frontiers in Chemistry*, 13, 1536590.
- Carabajal, M.P.A., Isla, M.I., Borsarelli, C.D., Zampini, I.C. (2020b) Influence of in vitro gastro-duodenal digestion on the antioxidant activity of single and mixed three “Jarilla” species infusions. *Journal of Herbal Medicine* 19, 100296.
- Carabajal, M.P.A., Isla, M.I., Zampini, I.C. (2017). Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of herbal teas from native plants used in traditional medicine in Argentina, South African. *Journal of Botany*, 110 258-265.
- Carabajal, M. P. A., Perea, M. C., Isla, M. I., & Zampini, I. C. (2020). The use of jarilla native plants in a Diaguita-Calchaquí indigenous community from northwestern Argentina: An ethnobotanical, phytochemical and biological approach. *Journal of ethnopharmacology*, 247, 112258.
- Carlqvist, K., Wallberg, O., Lidén, G., & Börjesson, P. (2022). Life cycle assessment for identification of critical aspects in emerging technologies for the extraction of phenolic compounds from spruce bark. *Journal of Cleaner Production*, 333, 130093.
- Carmagnani, H.J., Mansano, G. B., Balista, P.A., Gonzaga, R.V., Sobreira, F., Dario, M.F. (2023). Antioxidant activity and physicochemical stability of phytocosmetic formulations containing *Phyllanthus niruri* extract. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 25, 10-16.
- Carmona-Gutierrez, D., Zimmermann, A., Kroemer, G., & Madeo, F. (2025). The geroprotective potential of chalcones. *Nature Communications*, 16(1), 9152.
- Carrizo, S. L., Zampini, I. C., Sayago, J. E., Simirgiotis, M. J., Bórquez, J., Cuello, A. S., & Isla, M. I. (2020). Antifungal activity of phytotherapeutic preparation of *Baccharis* species from argentine Puna against clinically relevant fungi. *Journal of Ethnopharmacology*, 251, 112553.
- Chanioti, S. y Tzia, C. (2018). Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 48, 228–239.
- Chariandy, C.M., Seaforth, C.E., Phelps, R.H., Pollard, G.V., Khambay, B.P.S. (1999). Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3) 265-270.

- Chev -Kools, E., Choi, Y. H., Roullier, C., Ruprich-Robert, G., Grougnet, R., Chapeland-Leclerc, F., Hollmann, F. (2025). Natural deep eutectic solvents (NaDES): green solvents for pharmaceutical applications and beyond. *Green Chemistry*, 27, 8360-8385
- 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(4), 1701-1705
- Choommongkol, V., Punturee, K., Klumphu, P., Rattanaburi, P., Meepowpan, P., Suttiarporn, P. (2022) Extracción asistida por microondas del flavonoide anticancer geno 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3',5'-dimetil chalcona (DMC), rico en extracto de frutos de *Syzygium nervosum*. *Molecules*, 27, 1397.
- Christenhusz, M.J. y Byng, J.W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3) 201-217.
- Ciriminna, R., Li Petri, G., Angellotti, G., Fontananova, E., Meneguzzo, F., Luque, R., & Pagliaro, M. (2025). Tannin: An Insight into its Cosmeceutical Properties and Uses. *Global Challenges*, 2500115.
- Clifford, M.N. (2000) Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80,1033–1043.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts (CLSI M27-A3). Wayne, PA: CLSI; 2008
- Conta, A., Simirgiotis, M. J., Martínez Chamás, J., Isla, M. I., & Zampini, I. C. (2025). Extraction of Bioactive Compounds from *Larrea cuneifolia* Cav. Using Natural Deep Eutectic Solvents: A Contribution to the Plant Green Extract Validation of Its Pharmacological Potential. *Plants*, 14(7), 1016.
- Cosme, F., Aires, A., Pinto, T., Oliveira, I., Vilela, A., & Gonçalves, B. (2025). A comprehensive review of bioactive tannins in foods and beverages: functional properties, health benefits, and sensory qualities. *Molecules*, 30(4), 800.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: an overview. *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*, 1, 1-25.
- Cui, X. H., Murthy, H. N., Wu, C. H., & Paek, K. Y. (2010). Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(1), 7-14.

- Cunha, W.R., Silva, M.L.A., Veneziani, R.C.S., Ambrósio, S.R., Bastos, J.K. (2012). Lignans: Chemical and biological properties. *Phytochemicals-A global perspective of their role in nutrition and health*, 213-234.
- Bubalo, M. C., Ćurko, N., Tomašević, M., Ganić, K. K., & Redovniković, I. R. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food chemistry*, 200, 159-166.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidovic, S.; Radojčić Redovniković, I. Jokic, S. (2015). Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90, 1631–1639.
- D'Almeida, R. E., Alberto, M. R., Morgan, P., Sedensky, M., & Isla, M. I. (2015). Effect of structurally related flavonoids from *Zuccagnia punctata* Cav. on *Caenorhabditis elegans*. *Acta Parasitologica*, 60(1), 164-172.
- D'Almeida, R.E., Isla, M.I., Vildoza, E.L., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., Alberto, M.R. (2013). Inhibition of arachidonic acid metabolism by the Andean crude drug *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera. *Journal of Ethnopharmacology*, 150, 1080-1086.
- Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2016). Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography, A*, 1434, 50-56.
- Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68.
- Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013a). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68.
- Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, J.G., Verpoorte, Y.H. (2013b). Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents. *Journal of Natural Products*, 76(11) 2162-2173.
- Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2015). Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chemistry*, 187, 14–19.
- 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(13), 6272-6278.
- Dai, Y., Witkamp, J.G., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2015). Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chemistry*, 187 14-19.

- Dai, Y.; Van Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R.; Choi, Y.H. (2013) Disolventes eutécticos profundos naturales como nuevos medios potenciales para la tecnología verde. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68.
- Dai, Y.; Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013) Solventes eutécticos profundos naturales como nuevo medio de extracción para metabolitos fenólicos en *Carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry*, 85, 6272–6278.
- Dasgupta, D.G.D.S. (2023). A comprehensive review of conventional and non-conventional solvent extraction techniques. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 12(3), 202-211.
- De la Guardia, M., & Garrigues, S. (Eds.). (2012). Handbook of green analytical chemistry (Vol. 794). Chichester: John Wiley & Sons. Guía ICH. Validación de procedimientos analíticos: Texto y metodología. T2 (R2) 2006, 1,5.
- De los Ángeles Fernández, M., Espino, M., Gómez, F.J.V., Silva, M.F. (2018). New tailored eco-solvent-mediated approaches for the extraction of phenolic compounds from agri-food industry byproducts. *Food Chemistry*. 239 , 671–678.
- De Silva, S.F.; Alcorn, J. (2019). Flaxseed lignans as important dietary polyphenols for cancer prevention and treatment. Chemistry, pharmacokinetics, and molecular targets. *Pharmaceuticals*.s 2019, 12, 68.
- Degen, A. A., Becker, K., Makkar, H. P., Borowy, N. (1995). *Acacia saligna* as a fodder tree for desert livestock and the interaction of its tannins with fibre fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68(1), 65–71.
- Del Vitto, L.A., Petenatti, E.M., Petenatti, M.E. (1997). Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) Primera parte: Plantas Nativas. Herbal resources of San Luis (Argentina). First part: native plants. *Multequina*, 6,49–66.
- Delso, I., Lafuente, C., Muñoz-Embid, J., Artal, M. (2019). Estudio de RMN de disolventes eutécticos profundos basados en cloruro de colina. *Journal of Molecular Liquids*, 290, 111236.
- Derita, M. G., Zacchino, S. A., Romano, E. (2008). Antifungal activity of natural chalcones and synthetic derivatives against dermatophytes. *Mycoses*, 51(1), 70–74.
- Deseva, I., Koleva, E., & Mihaylova, D. (2020). HPLC determination of twelve polyphenols: application in wine analysis. *Journal of Hygienic Engineering & Design*, 32., 120–126.
- Dewick, P.M. (2002). Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach. 3rd eds. John Wiley y& Sons Ltd.

- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2015). InfoStat Versión 2015; Grupo InfoStat, FCA; Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Di, Y., Jones, J., Mansell, K., Whiting, S., Fowler, S., Thorpe, L., ... & Alcorn, J. (2017). Influence of flaxseed lignan supplementation to older adults on biochemical and functional outcome measures of inflammation. *Journal of the American College of Nutrition*, 36(8), 646-653.
- Diario Chilecito. (2019). Disponible en <http://www.diariochilecito.com.ar/articulo/4796.html>. (Accedido en Octubre 2025).
- Díaz-Álvarez, A. E. & Cadierno, V. (2013). Glycerol: a promising green solvent and reducing agent for metal-catalyzed transfer hydrogenation reactions and nanoparticles formation. *Applied Sciences*, 3(1), 55–69.
- Dobre, A., Georgescu, L. A., Dobre, G. (2013). Biological activities of Romanian propolis extracts. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(1), 8034–8042.
- Draganescu, D., Ibanescu, C., Tamba, B.I., Andritoiu, C.V., Dodi, G., Popa, M.I. (2015). Flaxseed lignan wound healing formulation: Characterization and in vivo therapeutic evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 614–623.
- ElAchkar, T., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S. (2021). Basics and properties of deep eutectic solvents: A review. *Environmental Chemical Letters*, 19, 3397–3408.
- Elewski, B. E. (1998). Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 415-429.
- Elewski, B. E., & Charif, M. A. (1997). Prevalence of onychomycosis in patients attending a dermatology clinic in northeastern Ohio for other conditions. *Archives of dermatology*, 133(9), 1172-1173.
- Elewski, B.E., Rich, P., Pollak, R., Pariser, D.M., Watanabe, S., Senda, H., PharB, C.I., Smith, K.M.B.A., Pillai, R., Ramakrishna, T.M.D., Olin, J.T. (2013). Efinaconazole 10% solution in the treatment of toenail onychomycosis: two phase III multicenter, randomized, double-blind studies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 68(4), 600-608.
- El-sherif, N.I., Shamma, R.N., Abdelbary, G. (2018). In-situ gels and nail lacquers as potential delivery systems for treatment of onychomycosis. A comparative study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 43, 253–261.
- Emtestam, L., Kaaman, T., Rensfeldt, K. (2012). Treatment of distal subungual onychomycosis with a topical preparation of urea, propylene glycol and lactic acid: results of a 24-week, double-blind, placebo-controlled study. *Mycoses*, 55(6), 532–540.

- Erduran, F., Eren, F., Hayran, Y., Oğuz, E. F., İyidal, A. Y., Erel, Ö. (2023). Higher Serum Ceruloplasmin Levels May Indicate the Role of Oxidative Stress in Onychomycosis. *Journal of the Turkish Academy of Dermatology*, 17(3), 89–94.
- Escalante, A., Gattuso, M., Pérez, P., Zacchino, S. (2008) Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of Natural Products*, 71, 1720–1725
- Escalante, A., Santeccchia, C., López, S., Gattuso, M., Gutiérrez Ravelo, A., Delle Monache, F., González, M., Zacchino, S. (2002). Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an Argentinean species in critical risk. *Journal of Ethnopharmacology*, 82:29–34
- Esfanjani, A.F. & Jafari, S.M. (2017). Nanoencapsulation of phenolic compounds and antioxidants. In *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients*. Elsevier. 63–101.
- Espino, M., De los Ángeles Fernández, M., Gómez, F.J.V., Silva, M.F. (2016). Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76 126-136.
- Espino, M., Solari, M., de los Ángeles Fernández, M., Boiteux, J., Gómez, M. R., Silva, M. F. (2019). NaDES-mediated folk plant extracts as novel antifungal agents against *Candida albicans*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 167, 15-20.
- Etaware, P.M., America, O., Egara, O.W., Ekun, V. S. (2025). Herbal medicine: scientific validation and future prospects. *International Journal of Pharmacy and Chemistry*, 11(3), 67-75.
- Evans, E.G.V. (2003). Drug synergies and the potential for combination therapy in onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, 149(s65), 11–13.
- Fan, R., Yuan, F., Wang, N., Gao, Y., & Huang, Y. (2015). Extraction and analysis of antioxidant compounds from the residues of *Asparagus officinalis* L. *Journal of food science and technology*, 52(5), 2690-2700.
- Farmacopea Argentina VII Ed. (1040. Estudios de estabilidad). (2003), 1, 405–408.
- Fazolin Petrucelli, F., M., Martins-Santana, M.L., Oliveira, L., Sanches, V.M., Rossi, P.R., Martinez-Rossi, N.M. (2024). The Transcription Factor StuA Regulates Oxidative Stress-Responsive Genes in *Trichophyton rubrum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 12959.
- Fernandes, R.P.P, Trindade, M.A., de Melo, M.P. (2018). Chapter 2. Natural antioxidants and food applications: Healthy perspectives. *Alternative and Replacement Foods Handbook of Food Bioengineering*, 31-64.

- Fernández, M.D.I.A., Espino, M., Gomez, F.J.V., Silva, M.F. (2018). Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. *Food Chemistry*, 239, 671–678.
- Francisco, M., Bruinhorst, A.V.D, Kroon, M.C. (2013). Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): A new Generation of Designer Solvents. *Angewandte Chemie International*, Edition 52(11) (2013) 3074-3085.
- Fu, M., Zhang, H., Bai, J., Cui, M., Liu, Z., Kong, X., ... & Kong, L. (2025). Application of Deep Eutectic Solvents with Modern Extraction Techniques for the Recovery of Natural Products: A Review. *ACS Food Science & Technology*, 5(2), 444-461.
- Fuad, F.M., Nadzir, M.M., Harun, A. (2021). Hydrophilic natural deep eutectic solvent: A review on physicochemical properties and extractability of bioactive compounds. *Journal of Molecular Liquids*, 339, 116923.
- Fuad, F.M., Nadzir, M.M., Harun, A. (2021). Hydrophilic natural deep eutectic solvent: A review on physicochemical properties and extractability of bioactive compounds. *Journal of Molecular Liquids*, 339, 116923.
- Gabriele, F., Chiarini, M., Germani, R., Tiecco, M., Spreti, N. (2019). Effect of water addition on choline chloride/glycol deep eutectic solvents: Characterization of their structural and physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 291, 111301.
- Galuszka, A., Migaszewski, Z. M., Namieśnik, J. (2012). The 12 principles of green analytical chemistry and the significance of Green Analytical Chemistry Metrics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78–84.
- Gałuszka, A., Migaszewski, Z.M., Konieczka, P., Namieśnik, J. (2012). Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37, 61-72.
- Gao, M.Z., Cui, Q., Wang, L.T., Meng, Y., Yu, L., Li, Y.Y., Fu, Y.J. (2020). A green and integrated strategy for enhanced phenolic compounds extraction from mulberry (*Morus alba* L.) leaves by deep eutectic solvent. *Microchemical Journal*, 154, 104598.
- Ghasemzadeh, A. & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal plants research*, 5(31) 6697-6703.
- Giada, M.D.L.R. (2013). Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for antioxidants*. IntechOpen.
- Gill, I. & Vulfson, E. (1994). Enzymic catalysis in heterogeneous eutectic mixtures of substrates. *Trends in biotechnology*, 12(4), 118-122.

- Giner, B., Sangüesa, E., Zuriaga, E., Culleré, L., Lomba, L. (2025). Deep eutectic solvent systems as media for the selective extraction of anti-inflammatory bioactive agents. *Molecules*, 30(16), 3357.
- Goldstein, A.O., Bhatia, N., Post, T.W. (2019). Onychomycosis: Epidemiology, clinical features, and diagnosis. Up To Date. Waltham, MA.
- Gómez, J., Simirgiotis, M.J., Manrique, S., Lima, B., Bórquez, J., Feresin, G.E., Tapia, A. (2020). UHPLC-HESI-OT-MS-MS Biomolecules Profiling, Antioxidant and Antibacterial Activity of the “Orange-Yellow Resin” from *Zuccagnia punctata* Cav. *Antioxidants*, 9, 123.
- González-Laredo, R. F., Sayago-Monreal, V. I., Moreno-Jiménez, M. R., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Landeros-Macías, L. F., & Rosales-Castro, M. (2023). Natural deep eutectic solvents (NaDES) as an emerging technology for the valorisation of natural products and agro-food residues: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 58(12), 6660-6673.
- Grover, C. & Khurana, A. (2012). Onychomycosis: Newer insights in pathogenesis and diagnosis. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*, 78(3): 263-70.
- Guardia, M. & Ruzicka, J. (1995). Towards environmentally conscientious analytical chemistry through miniaturization, containment and reagent replacement. *Analyst*, 120(2) (1995) 17N-17N.
- de la Guardia, M., & Garrigues, S. (2011). Economic Opportunity. Challenges in Green Analytical Chemistry, 13, 1.
- Gunt, H.B. & Kasting, G.B. (2007). Effect of hydration on the permeation of ketoconazole through human nail plate in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32:254–60.
- Gupta, A. K. (2000). Onychomycosis in the elderly. *Drugs & aging*, 16(6), 397-407.
- Gupta, A. K., & Gregurek-Novak, T. (2001). Efficacy of itraconazole, terbinafine, fluconazole, griseofulvin and ketoconazole in the treatment of *Scopulariopsis brevicaulis* causing onychomycosis of the toes. *Dermatology*, 235-238.
- Gupta, A. K., Lynde, C. W., Jain, H. C., Sibbald, R. G., Elewski, B. E., DANIEL III, C. R., ... & Summerbell, R. C. (1997). A higher prevalence of onychomycosis in psoriatics compared with non-psoriatics: a multicentre study. *British Journal of Dermatology*, 136(5), 786-789.
- Gupta, A. K., Paquet, M., & Simpson, F. C. (2013). Therapies for the treatment of onychomycosis. *Clinics in dermatology*, 31(5), 544-554.
- Gupta, A.K., Simpson, F. (2012). Newly approved laser systems for onychomycosis. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 102(5):428-430.

- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Mateo, C. R., & del Monte, F. (2009). Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: a suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures. *Langmuir*, 25(10), 5509-5515.
- Haerens, K., Matthijs, E., Binnemans, K., Van der Bruggen, B. (2009). Electrochemical decomposition of choline chloride based ionic liquid analogues. *Green Chemistry*, 11(9), 1357-1365.
- Hagerman, A.E. y Buttlar, L.G. (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, (256), 4494-4497.
- Handa, S. S. (2008). An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, 1(1), 21-40.
- Harmatha, J. y Dinan, L. (2003). Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. *Phytochemistry Reviews*, 2(3), 321-330.
- Hassanpour, S., Sadaghian, M., MaheriSis, N., Eshratkhah, B., ChaichiSemsari, M. (2011). Effect of condensed tannin on controlling faecal protein excretion in nematode-infected sheep: in vivo study. *Journal of American Science*, 7(5), 896-900.
- Hayyan, M., Hashim, M.A., Hayyan, A., Al-Saadi, M.A., AlNashef, I.M., Mirghani, M.E., Saheed, O.K. (2013). Are deep eutectic solvents benign or toxic?, *Chemosphere* 90(7) 2193-2195.
- Hayyan, M., Looi, C. Y., Hayyan, A., Wong, W. F., & Hashim, M. A. (2015). In vitro and in vivo toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents. *PloS one*, 10(2), e0117934.
- Hayyan, M., Mbous, Y. P., Looi, C. Y., Wong, W. F., Hayyan, A., Salleh, Z., Mohd-Ali, O. (2016). Natural deep eutectic solvents: cytotoxic profile. *SpringerPlus*, 5(1), 913.
- He, X., Yang, J., Huang, Y., Zhang, Y., Wan, H., & Li, C. (2019). Green and efficient ultrasonic-assisted extraction of bioactive components from *Salvia miltiorrhiza* by natural deep eutectic solvents. *Molecules*, 25(1), 140.
- Heikkilä, H., & Stubb, S. (1995). The prevalence of onychomycosis in Finland. *British Journal of Dermatology*, 133(5), 699-703.
- Heinrich, M., & Gibbons, S. (2001). Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(4), 425-432.
- Hernández, M. P., Abedini, W. L., & Delucchi, G. (1998). Estrategias para la Conservación de *Phytolacca tetramera* Hauman. *Phytolaccaceae. Especie Endémica de la Provincia de Buenos Aires*. In XXVI Jornadas Argentinas de Botánica.

- Hikmawanti, N.P.E., Ramadon, D., Jantan, I., Mun'im, A. (2021). Natural deep eutectic solvents (NADES): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development. *Plants*, 10(10), 2091.
- Hoque, M. B., Tanjila, M. J., Hosen, M. I., Hannan, M. A., Haque, P., Rahman, M. M., & Hasan, T. (2025). A comprehensive review of the health effects, origins, uses, and safety of tannins. *Plant and Soil*, 507(1), 221-240.
- Huang, W., Tang, S., Zhao, H., Tian, S. (2013). Activation of commercial CaO for biodiesel production from rapeseed oil using a novel deep eutectic solvent. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(34), 11943-11947.
- Huang, X. & Dudareva, N. (2023). Plant secondary metabolites: biosynthesis, regulation, and ecological functions. *Annual Review of Plant Biology*, 74, 1–25.
- Huang, Y., Feng, F., Chen, Z. G., Wu, T., & Wang, Z. H. (2018). Green and efficient removal of cadmium from rice flour using natural deep eutectic solvents. *Food chemistry*, 244, 260-265.
- Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., & Chen, Z. G. (2017). Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 221, 1400-1405.
- Hussen, N. H., Hussein, L. B., Hasan, A. H., Hamid, S. J., Abdl, C. O., Sarkar, B., Kazhin, D., ... & Muhamadd, D. (2025). Chalcone-related small molecules as potent antibacterial and antifungal agents: Design, synthesis, In vitro, and computational approaches. *Aspects of Molecular Medicine*, 5, 100066.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4) 1821-1835.
- Insuasty-Obando, B. (2016). Las chalconas y su uso como precursores en la síntesis de compuestos heterocíclicos nitrogenados. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(155), 234-243.
- Isla, M. I., Moreno, M.A., de los Ángeles Álvarez, M., Zampini, I.C. (2021). Some plants of the Monte region from Argentina: Phytochemistry and its use in health care. *Studies in Natural Products Chemistry*, 69, 349-369.
- Isla, M.I., Moreno, M.A., de los Ángeles Álvarez, M., Zampini, I.C. (2021). *Zuccagnia punctata* Cav. En *Plantas medicinales y aromáticas de Sudamérica*, vol. 2: Argentina, Chile y Uruguay (págs. 537-551). Cham: Springer International Publishing.

- Isla, M.I., Zampini, C., Salas, A. (2016). Bioactive chalcones and flavonoids from *Zuccagnia punctata*: ethnopharmacological uses and biological properties. *Natural Product Communications*, 11(10), 1497–1504.
- Jayatilake, J.A., Tilakatatne, W.M. & Panagoda, G.J. (2009). Candidal onychomycosis : A mini-review . *Mycopathology* , 168 , 165–173.
- Jeliński, T., Przybyłek, M. & Cysewski, P. (2019). Disolventes eutécticos profundos naturales como agentes para mejorar la solubilidad, la estabilidad y la liberación de curcumina. *Investigación farmacéutica*, 36 (8), 116.
- Jeong, K. M., Ko, J., Zhao, J., Jin, Y., Yoo, D. E., Han, S. Y., Lee, J. (2017). Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *Journal of Cleaner Production*, 151, 87-95.
- Jimenez, C.M., Sampietro, D.A., Sgariglia, M.A., Soberón, J.R., Vattuone, M.A. (2014) Isolation, identification and usefulness of antifungal compounds from *Zuccagnia punctata* for control of toxigenic ear rot pathogens. *Natural Product Communications*, 9, 1461-1464.
- Joey, N. L., Ismail, N. A., Ahmad Mokhtar, A. M., & Che Zain, M. S. (2025). Integrated ultrasonic–natural deep eutectic solvent-assisted extraction for standardizing polyphenol-enriched extract from cocoa (*Theobroma Cacao* L.) rind with enhanced antioxidant properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-19.
- Juneidi, I., Hayyan, M., & Mohd Ali, O. (2016). Toxicity profile of choline chloride-based deep eutectic solvents for fungi and *Cyprinus carpio* fish. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(8), 7648-7659.
- Kalidindi, N., Thimmaiah, N.V., Jagadeesh, N.V., Nandeeep, R., Swetha, S., Kalidindi, B. (2015). Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. Leaves. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4) 795-802.
- Kaltsa, O., Lakka, A., Grigorakis, S., Karageorgou, I., Batra, G., Bozinou, E., Lalas, S., Makris, D.P.A. (2020). Green Extraction Process for Polyphenols from Elderberry (*Sambucus nigra*) Flowers Using Deep Eutectic Solvent and Ultrasound-Assisted Pretreatment. *Molecules*, 25, 921.
- Kamrad Savi, L., Gipiela Correa Dias, M.C., Carpino, D., Waszcynskj, N., Hoffmann Ribani, Windson Haminiuk, C.I. (2018). Natural deep eutectic solvents (NaDESs) based on citric acid and sucrose as a potential green technology: A comprehensive study of water inclusion and its effect on thermal, physical and rheological properties. . *Food Science & Technology* 54, 898–907.

- Karimi, R., & Rashidinejad, A. (2023) Karimi, R. y Rashidinejad, A. (2023). Lignans: Properties, health effects, and applications. In Handbook of Food Bioactive Ingredients: Properties and Applications (pp. 545-570). Cham: Springer International Publishing.). Lignans: Properties, health effects, and applications. In Handbook of Food Bioactive Ingredients: Properties and Applications (pp. 545-570). Cham: Springer International Publishing.
- Khezeli, T., Daneshfar, A., & Sahraei, R. (2016). A green ultrasonic-assisted liquid–liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC–UV determination of ferulic, caffeic and cinnamic acid from olive, almond, sesame and cinnamon oil. *Talanta*, 150, 577-585.
- Koigerova, A., Gosteva, A., Samarov, A., Tsvetov, N. (2023). Deep Eutectic Solvents Based on Carboxylic Acids and Glycerol or Propylene Glycol as Green Media for Extraction of Bioactive Substances from *Chamaenerion angustifolium* (L.). *Scop. Molecules*, 28(19), 6978.
- Krakovska-Sieprawska, A., Kiełbasa, A., Rafińska, K., Ligor, M., Buszewski, B. (2022). Modern Methods of Pre-Treatment of Plant Material for the Extraction of Bioactive Compounds. *Molecules*. 23;27(3):730.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013(1), 162750.
- Lagrange, S.P., MacAdam, J.W., Villalba, J.J. (2021). The use of temperate tannin containing forage legumes to improve sustainability in forage–livestock production. *Agronomy*, 11(11), 2264.
- Lazović, M., Cvijetić, I., Jankov, M., Milojković-Opsenica, D., Trifković, J., Ristivojević, P. (2022). Eficiencia de disolventes eutécticos profundos naturales para la extracción de compuestos fenólicos de *Agrimonia eupatoria*: Estudio experimental y modelado in silico. *Plants*, 11, 2346.
- Lazović, M., Cvijetić, I., Jankov, M., Milojković-Opsenica, D., Trifković, J., Ristivojević, P. (2022). Efficiency of natural deep eutectic solvents to extract phenolic compounds from *Agrimonia eupatoria*: experimental study and in silico modelling. *Plants*, 11(18), 2346.
- Leal, M., Moreno, M.A., Albornoz, P.L., Mercado, M.I., Zampini, I.C., Isla, M.I. (2023b). MorphologicPoal characterization of *Nicotiana tabacum* inflorescences and chemical-functional analysis of extracts obtained from its powder by using green solvents (NaDESs). *Plants*. 12(7): 1554.
- Leal, M., Moreno, M.A., Albornoz, P.L., Mercado, M.I.; Zampini, I.C., Isla, M.I. (2023a). *Nicotiana tabacum* leaf waste: Morphological characterization and chemical-functional analysis of extracts obtained from powder leaves by using green solvents. *Molecules*. 28(3): 1396.

- Lee, J.E., Jayakody, J.T. M., Kim, J.I., Jeong, J.W., Choi, K.M., Kim, T.S., Ryu, B. (2024). The influence of solvent choice on the extraction of bioactive compounds from Asteraceae: A comparative review. *Foods*, 13(19), 3151.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125(2):288-306.
- Lersten, N. R., y Curtis, J. D. (1996). Survey of leaf anatomy, especially secretory structures, of tribe Caesalpinieae (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution*, 200(1), 21-39.
- Leyva, E., Navarro-Tovar, G., Loredó-Carrillo, S. E., Santos, D.M.S. (2011). Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides. *Boletín de la Sociedad Química de México*, 5(2), 3.
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and purification technology*, 48(2), 189-196.
- Lima, B., Agüero, M., Zygodlo, J., Tapia, A., Solis, C., Rojas de Arias, A., Yaluff, G., Zacchino, S., Feresin, G., Schmeda, G. (2009) Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 54:68–72
- Lima, B., López, S., Luna, L., Agüero, M., Aragón, L., Tapia, A., Zacchino, S., López, M., Zygodlo, J., Feresin, G. (2011) Essential oils of medicinal plants from the central Andes of Argentina: chemical composition and antifungal., antibacterial and insect repellent activities. *Chemistry & Biodiversity*, 8:924–936
- Lima, B., Sánchez, M., Luna, L., Agüero, M., Zacchino, S., Filippa, E., Palermo, J., Tapia, A., Feresin, G. (2012) Antimicrobial and antioxidant activities of *Gentianella multicaulis* collected on the Andean slopes of San Juan province. *Zeitschrift für Naturforschung* , C 67:29–38
- Lin, L. (2022, August). Phenolic acid extraction from orange peel with natural deep eutectic solvents. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 2321, No. 1, p. 012020). IOP Publishing.
- Lipner, S. R., y Scher, R. K. (2015). Onychomycosis: diagnosis and therapy. *Medical mycology: current trends and Future prospects*, 28.
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2018). Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *Journal of natural products*, 81(3), 679-690.
- Liu, M., Panda, S. K., & Luyten, W. (2020). Plant-based natural products for the discovery and development of novel anthelmintics against nematodes. *Biomolecules*, 10(3), 426.
- Loo, D. S. (2007). Onychomycosis in the elderly: drug treatment options. *Drugs & aging*, 24(4), 293-302.

- López-Fandiño, R., Gill, I., & Vulfson, E. N. (1994). Protease-catalyzed synthesis of oligopeptides in heterogenous substrate mixtures. *Biotechnology and bioengineering*, 43(11), 1024-1030.
- López, S., Furlan, R., Zacchino, S. (2011) Detection of antifungal compounds in *Polygonum ferrugineum* Wedd., extracts by bioassay-guided fractionation- Some evidence of their mode of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 138:633–636
- López-Alarcón, C. y , Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.
- Lu, C., Cao, J., Wang, N., Su, E. (2016). Significant improvement of nonsteroidal anti-inflammatory drug solubility in deep eutectic solvents for potential delivery in non-aqueous liquids. *Medicinal Chemistry Communications*, 7, 955–959.
- Luard, E. J. (1982). Growth and accumulation of solutes by *Phytophthora cinnamomi* and other lower fungi in response to changes in external osmotic potential. *Microbiology*, 128(11), 2583-2590.
- Lück, M., Bergs, F., & Jupke, A. (2020). Solvent accessibility limitation by plant matrix compounds in extraction of rutin from *Solanum lycopersicum*. *Separation Science Plus*, 3(3), 63-71.
- Luo Luo, W., Ang, C. T.A., Gehring, T.M., Heinze, L.J., Lin, A. (2003). Determination of phenolic compounds in dietary supplements and tea blends containing Echinacea by liquid chromatography with coulometric electrochemical detection, *Journal of AOAC International*, 86(2)202-8
- Ma, C., Laaksonen, A., Ji, X., Lu, X. (2018). The peculiar effect of water on ionic liquids and deep eutectic solvents. *Chemical Society Reviews*, 47 8685–8720.
- MacAdam, J.W. y Villalba, J.J. (2015). Beneficial effects of temperate forage legumes that contain condensed tannins. *Agriculture*, 5(3), 475-491.
- Mahapatra, D.K. y Bharti, S.K. (2016) Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents. *Life Sciences*, 148:154–172.
- Mahapatra, D.K., Asati, V., Bharti, S.K. (2015) Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: structural and pharmacological perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92:839–865.
- Mangan, J.L. (1988). Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition research reviews*, 1(1), 209-231.
- Mansinhos, I., Goncalves, S., Rodriguez-Solana, R., Ordonez-Diaz, J. L., Moreno-Rojas, J. M., & Romano, A. (2021). Ultrasonic-assisted extraction and natural deep eutectic solvents combination: A

- green strategy to improve the recovery of phenolic compounds from *Lavandula pedunculata* subsp. lusitanica (chaytor) franco. *Antioxidants*, 10(4), 582.
- Mansur, A.R., Song, N.E., Jang, H.W., Lim, T.G., Yoo, M., Nam, T.G. (2019). Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts. *Food Chemistry*, 293, 438-445.
- Marcano, A., Vargas, N., Pire, A. (2005). Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial in vitro de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. *Revista de la Facultad de Agronomía* 22(4) 315-324.
- Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V. (2003). Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry*, 81, 189-197.
- Markinson, B.C., Monter, S. I., Cabrera, G. (1997). Traditional approaches to treatment of onychomycosis. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 87(12), 551-556.
- Martínez Chamás, J., Isla, M. I., & Zampini, I. C. (2023). Antibacterial and antibiofilm activity of different species of *Fabiana* sp. extract obtained via maceration and ultrasound-assisted extraction against *Staphylococcus epidermidis*. *Plants*, 12(9), 1830.
- Martins, R.N. (2015). Oxidative stress responses in the human fungal pathogens: Adaptation and survival strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 66.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4384116/>
- Maschio-Lima, T., Lemes, T.H., Marques, M.D.R., Siqueira, J.P.Z., de Almeida, B.G., Caruso, G. R., Kress, M.R.V., Tarso da Costa, P., Regasini, L.O., de Almeida, M.T.G. (2025). Synergistic activity between conventional antifungals and chalcone-derived compound against dermatophyte fungi and *Candida* spp. *International Microbiology*, 28(2), 265-275.
- Massiha, A., y Muradov, P.Z. (2015). Comparison of antifungal activity of extracts of ten plant species and griseofulvin against human pathogenic dermatophytes. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 17(10).
- Máthé, Ákos, Bandoni, Arnaldo. *Medicinal and Aromatic Plants of South America Vol 2: Argentina, Chile and Uruguay*". 2021. Series Ed.: Springer Verlag. ISBN 978-3-030-62817-8
- Mercado, M. I., Ruiz, A. I., Zampini, I. C., Nuño, G., Cuello, S., Isla, M. I., & Ponessa, G. I. (2013). Foliar architecture and caulinar morphoanatomy of *Zuccagnia punctata* (Fabaceae). *Histolocalization of bioactive compounds*. *Lilloa*, 50(2), 58-68.

- Mertin, D. & Lippold, B. C. (1997). In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: prediction of the penetration rate of antimycotics through the nail plate and their efficacy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(9), 866–872.
- Metin, M. S., Elmas, Ö. F., Demirbaş, A., Erel, Ö., Atasoy, M., Türsen, Ü., Lotti, T. (2021). The role of oxidative stress in onychomycosis: Thiol/disulphide homeostasis. *Mycoses*, 64(8), 947-953.
- Min, B.R. y Hart, S.P. (2003). Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science*, 81, E102-E109.
- Mingorance Álvarez, E., Villar Rodríguez, J., López Ripado, O., & Mayordomo, R. (2024). Antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia* Cheel.) essential oils against the main onychomycosis-causing dermatophytes. *Journal of Fungi*, 10(10), 675
- Monteagudo, B., Figueroa, O., Suárez-Magdalena, O., & Méndez-Lage, S. (2019). Green nail caused by onychomycosis coinfecting with *Pseudomonas aeruginosa*. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 110(9), 783-785.
- Morán Vieyra, F., Boggetti, H., Zampini, I., Ordoñez, R., Isla, M., Álvarez, R., De Rosso, V., Mercadante, A., Borsarelli, C. (2009). Singlet oxygen quenching and radical scavenging capacities of structurally related flavonoids present in *Zuccagnia punctata* Cav. *Free Radical Research*, 43:553–564.
- Moreno, M. A., Córdoba, S., Zampini, I. C., Mercado, M. I., Ponessa, G., Sayago, J. E., Pino-Ramo, L. L., Schmeda-Hirschmann, G. e Isla, M. I. (2018b). Argentinean *Larrea* dry extracts with potential use in vaginal candidiasis. *Natural Product Communications*, 13, 131-134.
- Moreno, M.A., Gómez-Mascaraque, L., Arias, M., Zampini, I.C., Sayago, J.E., Pino Ramos, L.L., SchmedaHirschmann, G., López-Rubio, A., Isla, M.I. (2018). Electrosprayed chitosan microcapsules as delivery vehicles for vaginal phytoformulations. *Carbohydrate Polymers*, 201:425–437.
- Moura, B., Monteiro, H., Mata, T. M., & Martins, A. A. (2022). Life cycle energy and carbon emissions of essential oil extraction from Rosemary. *Energy Reports*, 8, 291-297.
- Mu, L., Gao, J., Zhang, Q., Kong, F., Zhang, Y., Ma, Z., Lv, S. (2023). Research progress on deep eutectic solvents and recent applications. *Processes*, 11(7), 1986.
- Muschietti, L., Derita, M., Sülsen, V., de Dios Muñoz, J., Ferraro, G., Zacchino, S., & Martino, V. (2005). In vitro antifungal assay of traditional Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2), 233-238.

- Mustafa, N.R., Spelbos, V.S., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2021). Solubility and stability of some pharmaceuticals in natural deep eutectic solvents-based formulations. *Molecules*, 26(9), 2645.
- Nair, A. B., Kiran Vaka, S. R., & Murthy, S. N. (2011). Transungual delivery of terbinafine by iontophoresis in onychomycotic nails. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(10), 1253-1258.
- Negi, T., Kumar, A., Sharma, S. K., Rawat, N., Saini, D., Dutta, A. (2024). Deep eutectic solvents: Preparation, properties, and food applications. *Heliyon*, 10, e28784.
- Nematollahi, A. R., Badiiee, P., & Nournia, E. (2015). The efficacy of ultraviolet irradiation on *Trichophyton* species isolated from nails. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(6), e18158.
- Nenoff, P., Grunewald, S., Paasch, U. (2014). Laser therapy of onychomycosis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 12, 33–38.
- Nguta, J. M. (2015). Evaluation of acute toxicity of crude plant extracts from kenyan biodiversity using brine shrimp, *Artemia salina* L.(artemiidae). *The Open Conference Proceedings Journal*, 3, (1) 30–34.
- Nieva Moreno, M. I., Zampini, I. C., Ordóñez, R. M., Jaime, G. S., Vattuone, M. A., Isla, M. I. (2005). Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 8957–8962.
- Norris, A. (2005). Orientación óptima de sólidos anisotrópicos. *Revista Trimestral de Mecánica y Matemáticas Aplicadas*, 59(1), 29–53.
- Nouripour-Sisakht, S., Mirhendi, H., Shidfar, S., Ahmadi, B., Rezaei-Matehkolaei, A., Geraemishoar, M., Zarei, F., Jalalizand, N. (2015). *Aspergillus* species as emerging causative agents of onychomycosis. *The Journal of Medical Mycology*, 25(2), 101–107.
- Nuño, G. (2015). Tesis Doctoral. Aislamiento y caracterización de biomoléculas producidas por especies vegetales que crecen en ecosistemas semiáridos. Universidad Nacional de Tucumán.
- Nuño, G., Alberto, M., Zampini, I., Cuello, S., Ordoñez, R., Sayago, J., Baroni, V., Wunderlin, D., Isla, M.I. (2014). The effect of *Zuccagnia punctata* Cav, an Argentina medicinal plant, on virulence factors from *Candida* species. *Natural Product Communications*, 9(7), 933–936.
- Nuño, G., Alberto, M.R., Arena, M.E., Zampini, I.C., Isla, M.I. (2018). Effect of *Zuccagnia punctata* Cav. (Fabaceae) extract on pro-inflammatory enzymes and on planktonic cells and biofilm from *Staphylococcus aureus*. *Toxicity studies. Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(8), 1713–1719.

- Obluchinskaya, E.D., Daurtseva, A.V., Pozharitskaya, O.N., Flisyuk, E.V., Shikov, A.N. (2019). Natural deep eutectic solvents as alternatives for extracting phlorotannins from brown algae. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 53(3), 243–247.
- Obluchinskaya, E.D., Pozharitskaya, O.N., Zakharova, L.V., Daurtseva, A.V., Flisyuk, E.V., Shikov, A.N. (2021). Efficacy of natural deep eutectic solvents for extraction of hydrophilic and lipophilic compounds from *Fucus vesiculosus*. *Molecules*, 26(14), 4198.
- Ortega, C.A., María, A.O.M., Gianello, J.C. (2000). Chemical components and biological activity of *Bidens subalternans*, *B. aurea* (Astereaceae) and *Zuccagnia punctata* (Fabaceae). *Molecules*, 5(3), 465–470.
- Ortiz, A. E., Avram, M. M., & Wanner, M. A. (2014). A review of lasers and light for the treatment of onychomycosis. *Lasers in surgery and medicine*, 46(2), 117-124.
- Osmakov, D. I., Kalinovskii, A. P., Belozerova, O. A., Andreev, Y. A., & Kozlov, S. A. (2022). Lignans as pharmacological agents in disorders related to oxidative stress and inflammation: chemical synthesis approaches and biological activities. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 6031.
- Pacciaroni, A., Gette, M., Derita, M., Ariza-Espinar, L., Gil, R., Zacchino, S., Silva, G. (2008) Antifungal activity of *Heterothalamus alienus* metabolites. *Phytotherapy Research*, 22:524–528
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C. (2014). Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2(5) 1063-1071.
- Palchetti, M.V., Zamudio, F., Zeballos, S., Davies, A., Barboza, G. E., Giorgis, M.A. (2023). Large-scale patterns of useful native plants based on a systematic review of ethnobotanical studies in Argentina. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 21(2), 93-100.
- Palos-Hernandez, A., Fernández, M. Y. G., Burrieza, J. E., Pérez-Iglesias, J. L., & González-Paramás, A. M. (2022). Obtaining green extracts rich in phenolic compounds from underexploited food by-products using natural deep eutectic solvents. Opportunities and challenges. *Sustainable chemistry and pharmacy*, 29, 100773.
- Pan, J. Y., Chen, S. L., Yang, M. H., Wu, J., Sinkkonen, J., & Zou, K. (2009). An update on lignans: natural products and synthesis. *Natural Product Reports*, 26(10), 1251-1292.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. (2016). Flavonoides: una visión general. *Revista de ciencias nutricionales*, 5, e47.

- Parekh, J., & Chanda, S. (2008). In vitro antifungal activity of methanol extracts of some Indian medicinal plants against pathogenic yeast and moulds. *African journal of Biotechnology*, 7(23).
- Parmar, G., & Pundarikakshudu, K. (2019). Determination and validation assay for total phenolic content in two Euphorbiaceous plants by Folin Ciocalteu Method. *International Journal of Pharmaceutical Research* 12: 608-612
- Parra, A.L., Hebra, R. S., García, G., Alonso, M. E. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the LD50 value in mice to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400.
- Pawar, N.V., y Borkar, M.R. (2025). SUPRADES: unlocking the versatility of cyclodextrin-based deep eutectic solvents. *Journal of Drug Targeting*, 1-18.
- Pederiva, R.& Giordano, O. (1984) 3,7-Dihydroxy-8-methoxyflavone from *Zuccagnia punctata*. *Phytochemistry*, 23:1340–1341.
- Pederiva, R., Kavka, J., & D’Arcangelo, A. T. (1975). Chalcones and flavanones isolated from *Larrea nitida*. In *Anales de la Asociacion Quimica Argentina* (Vol. 63, pp. 85-90).
- Pena-Pereira, F., Kloskowski, A., Namieśnik, J. (2015). Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives. *Green Chemistry*, 17(7), 3687–3705.
- Peng, W., Wang, X., Wang, W., Wang, Y., Huang, J., Zhou, R., Bo, R., Liu, M., Yin, S. & Li, J. (2024). Comparison, optimization and antioxidant activity of ultrasound-assisted natural deep eutectic solvents extraction and traditional method: A greener route for extraction of flavonoid from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 109, 107003.
- Pereira, T. C., Souza, V. P., Padilha, A.P.F., Duarte, F.A., Flores, E.M. (2025). Trends and perspectives on the ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds using natural deep eutectic solvents. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 47, 101088.
- Petenatti, E., Gette, M., Derita, M., Petenatti, M., Solis, C., Zuljan, F., Del Vitto, L., Zacchino, S. (2008). Importance of the ethnomedical information for the detection of antifungal properties in plant extracts from the Argentine flora. In: Martino V, Muschietti L (eds) *South American medicinal plants as potential source of bioactive compounds*. Transworld Research Network, Kerala, pp 15–38.
- Pinto, D., Lameirão, F., Delerue-Matos, C., Rodrigues, F., Costa, P. (2021). Characterization and stability of a formulation containing antioxidants-enriched *Castanea sativa* shells extract. *Cosmetics*, 8(2), 49.

- Piraccini, B.M. y Alessandrini, A. (2015). Onychomycosis: A review. *Journal of Fungi (Basel)*, 1(1): 30-43
- Pires, I.V., da Silva, L.H.M., Rodrigues, A.M.D.C., Saldaña, M.D. (2024). Natural deep eutectic solvents for anthocyanin extraction from agricultural sources: Process parameters, economic and environmental analysis, and industrial challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(6), e70057.
- Plaha, N.S.; Awasthi, S.; Sharma, A.; Kaushik, N. (2022). Distribution, biosynthesis and therapeutic potential of lignans. *Biotech*, 2022, 12, 255.
- Popovic, B. M., Micic, N., Potkonjak, A., Blagojevic, B., Pavlovic, K., Milanov, D., & Juric, T. (2022). Novel extraction of polyphenols from sour cherry pomace using natural deep eutectic solvents– Ultrafast microwave-assisted NADES preparation and extraction. *Food Chemistry*, 366, 130562.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Quiroga, E. N., Sampietro, A. R., & Vattuone, M. A. (2001). Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 74(1), 89-96.
- Radošević, K., Ćurko, N., Srček, V. G., Bubalo, M. C., Tomašević, M., Ganić, K. K., Redovniković, I. R. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *Food Science and Technology*, 73, 45-51.
- Radošević, K., Bubalo, M. C., Srček, V. G., Grgas, D., Dragičević, T. L., & Redovniković, I. R. (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and environmental safety*, 112, 46-53.
- Ramírez, M. E., Barajas, L., Pérez, C., Sáenz, A., & Silva, S. Y. (2012). Synthesis and biological activity of chalcones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 43(4), 7-14.
- Rammohan, A., Reddy, J. S., Sravya, G., Rao, C. N., & Zyryanov, G. V. (2020). Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(2), 433-458.
- Ratera E.L., Ratera M.O. (1980) Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular. Ed. hemisferio sur. Buenos Aires, Argentina, 189 pp.
- Ražná, K., Nôžková, J., Vargaová, A., Harenčár, L., & Bjelková, M. (2021). Biological functions of lignans in plants. *Agriculture* 67 (4): 155–165.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

- Rex, J.H., Alexander, B.D., Andes, D., Arthington-Skaggs, B., Brown, S.D., Chaturvedi, V., Walsh, T. J. M27-A3. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Clinical & Laboratory Standards Institute, 3rd ed., 28, 14.
- Ribeiro, L.O., Pereira, R.N., Tonon, R.V., Cabral, L.M.C., Santiago, M.C.P., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Matta, V.M., Freitas, S.P. (2018). Antioxidant compounds recovery from juçara residue by thermal assisted extraction. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1), 68-73.
- Rienth, M., Vigneron, N., Darriet, P., Sweetman, C., Burbidge, C., Bonghi, C., ... & Castellarin, S. D. (2021). Grape berry secondary metabolites and their modulation by abiotic factors in a climate change scenario—a review. *Frontiers in Plant Science*, 12, 643258.
- Ristivojević, P., Krstić Ristivojević, M., Stanković, D., Cvijetić, I. (2024). Advances in extracting bioactive compounds from food and agricultural waste and by-products using natural deep eutectic solvents: A circular economy perspective. *Molecules*, 29(19), 4717.
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., & Verde-Star, M. J. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. *OmniaScience*.
- Roberts, D.T., Taylor, W.D., Boyle J. (2003). Guidelines for treatment of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, 148:402–10.
- Roco, J., Alarcon, G., Sierra L., Zampini, C., Isla, M. I., & Jerez, S. (2017). Beneficial effects of hydroalcoholic extract and flavonoids from *Zuccagnia punctata* in a rabbit model of vascular dysfunction induced by high cholesterol diet. *Medicinal Chemistry Research*, 26(10), 2336-2344.
- Roco, J., Alarcon, G., Medina, M., Zampini, C., Isla, M. I., & Jerez, S. (2018). Oral administration of *Zuccagnia punctata* extract improves lipid profile, reduces oxidative stress and prevents vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Phytomedicine*, 48, 104-111.
- Rodríguez, B., Pacheco, L., Bernal, I., & Piña, M. (2023). Mechanisms of action of flavonoids: antioxidant, antibacterial and antifungal properties. *Ciencia, Ambiente y Clima*, 6(2), 33-66.
- Rodríguez-Llorente, D., Cañada-Barcala, A., Álvarez-Torrellas, S., Águeda, V.I., García, J., Larriba, M.A. (2020). Review of the Use of Eutectic Solvents, Terpenes and Terpenoids in Liquid–liquid Extraction Processes. *Processes*, 8, 1220.
- Roig, F. (2002). Flora medicinal mendocina. Las plantas medicinales y aromáticas de Mendoza (Argentina).

- Roleira, F.M.F., Tavares-Da-Silva, E.J., Varela, C.L., Costa, S.C., Silva, T., Garrido, J., Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*, 183, 235-258.
- RStudio. RStudio: Desarrollo Integrado para R; RStudio, PBC: Boston, MA, EE. UU., 2020.
Disponible en línea: <http://www.rstudio.com/> (consultado el 1 de julio de 2024).
- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C., Durand, E. (2017). Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3591-3601.
- Ruesgas-Ramón, M., Suárez-Quiroz, M. L., González-Ríos, O., Baréa, B., Cazals, G., Figueroa-Espinoza, M. C., Durand, E. (2020). Biomolecules extraction from coffee and cocoa by-and co-products using deep eutectic solvents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(1), 81-91.
- Rutkowska, M., Namieśnik, J., & Konieczka, P. (2017). Ultrasound-assisted extraction. In *The application of green solvents in separation processes* (pp. 301-324). Elsevier.
- Salazar, J., Ortega, Á., Pérez, J. L., Garrido, B., Santeliz, R., Galbán, N., Díaz, M.P., Cano, R., Cano G., Contreras-Velasquez, J.C., ... & Chacín, M. (2025). Role of polyphenols in dermatological diseases: Exploring pharmacotherapeutic mechanisms and clinical implications. *Pharmaceuticals*, 18(2), 247..
- Salazar-Aranda, R., Granados-Guzmán, G., Pérez-Meseguer, J., González, G. M., Waksman de Torres, N. (2015). Activity of polyphenolic compounds against *Candida glabrata*. *Molecules*, 20(10), 17903-17912.
- Saleh K., Albinhassan T., Elbehairi S., Alshehry M., Alfaifi M., Al-ghazzawi A. (2019). Cell Cycle Arrest in Different Cancer Cell Lines (Liver, Breast and Colon) Induces Apoptosis Under the Influence of The Chemical Content of *Aeluropus lagopoides* Leaf Extracts. *Molecules*, 24(3):507.
- Sangiorgi, S., Albertini, B., Bertoni, S., Passerini, N. (2025). An Overview on the Role of Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Oral Pharmaceuticals. *Pharmaceutics*, 17(3), 300.
- Sangiorgio, P., Errico, S., Verardi, A., Moliterni, S., Tamasi, G., Rossi, C., & Balducchi, R. (2023). Bioactive lignans from flaxseed: Biological properties and patented recovery technologies. *Nutraceuticals*, 3(1), 58-74.
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, 62(1), 10-24.

- Sarker, S., Nahar, D.L., Kumarasamy, Y., Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Microtitre Y. (2007). Plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42, 32 -324.
- Sato, M., Tsuchiya, H., Akagiri, M., Fujiwara, S., Fujii, T., Takagi, N., Matsuura, M., Linuma, M. (1994). Growth inhibitory properties of chalcones to *Candida*. *Letters in applied microbiology*, 18(1), 53-55.
- Sebbah, T., Yahla, I., Cunha, E., Riazi, A., Amorim, C. G., Rodriguez-Diaz, J. M., & Montenegro, M. C. (2025). Enhanced Extraction and Separation with HPLC-DAD of Phenolic and Flavonoid Antioxidants from *Portulaca oleracea* L. Leaves Using Tailored Terpenoid-Based NaADES: Comparative Assessment of Antiradical and Antimicrobial Activities. *Antioxidants*, 14(2), 132.
- Seebacher, C., Brasch, J., Abeck, D., Cornely, O., Effendy, I., Ginter-Hanselmayer, G. (20087). Onicomycosis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 5(1): 61-6.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition*, 32(1), 67-103.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7749-7759.
- Shanbhag, P. P., & Jani, U. (2017). Drug delivery through nails: Present and future. *New Horizons in Translational Medicine*, 3(5), 252-263.
- Shang, X., Dou, Y., Zhang, Y., Tan, J.N., Liu, X., Zhang, Z. (2019). Tailor-made natural deep eutectic solvents for green extraction of isoflavones from chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Industrial Crops and Products*, 140, 111724.
- Shemer, A. (2012). Update: Medical treatment of onychomycosis. *Dermatology and Therapy*, 25(6): 582-93.
- Singh, S. C., Kumar, R., Singh, N. P. (2020). Worldwide research trends on medicinal plants. *Molecules*, 25(11), 2631.
- Singleton, V.L.,y Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.
- Skarpalezos, D. y, Detsi, A. (2019). Deep eutectic solvents as means of extracting valuable flavonoids from natural sources. *Applied Sciences*, 9 , 4169.
- Spagnuolo, C., Moccia, S., Russo, G.L. (2018). Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 153, 105-115.

- Stratford, M., Plumridge, A., Nebe-von-Caron, G., & Archer, D. B. (2009). Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. *International journal of food microbiology*, 136(1), 37-43.
- Suárez-Medina, K., Coy-Barrera, E. (2016). Diversidad de los compuestos orgánicos bioactivos de origen natural: una singularidad manifestada por la plasticidad en el metabolismo secundario. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 252-269.
- Sulaiman, I., Basri, M., Masoumi, H., Chee, W., Ashari, S., Ismail, M. (2017). Effects of Temperature, Time and Solvent Ratio on The Extraction of Phenolic Compounds and the Anti-radical Activity of *Clinacanthus nutans* Lindau Leaves by Response Surface Methodology. *Chemistry Central Journal* , 11(1).
- Suthar, K.J. (2025). Natural Deep Eutectic Solvents in Extraction Science: Progress, Challenges, and Future Prospects. *Separation Science Plus*, 8(6), e70075.
- Svetaz, L., Agüero, M.B., Alvarez, S., Luna, L., Feresin, G., Derita, M., Tapia, A., Zacchino, S. (2007). Antifungal activity of chalcones from *Zuccagnia punctata* Cav. acting against clinically important fungi and studies of mechanism of action. *Planta Medica*, 73: 1074-1080.
- Svetaz, L., Tapia, A., López, S., Furlán, R., Petenatti, E., Pioli, R., Schmeda-Hirschmann, G., Zacchino, S. (2004) Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. *J Agric Food Chemistry* 52:3297–3300.
- Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., Cechinel Filho, V., Giménez, A., Pinzón, R., Zacchino, S.A., Gupta, M. (2010). Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 137-158.
- Tangarife, V., Royero, J. C., Londoño, B. Z., Durán, C., Stanchenko, E., & Arango, A. C. M. (2011). Actividad contra *Candida albicans*, citotoxicidad e interacción con antifúngicos de aceites esenciales y extractos de plantas medicinales y aromáticas. *Infectio*, 15(3).
- Terahara, N. (2015). Flavonoids in foods: a review. *Natural product Communications* , 10 (3), 1934578X1501000334.
- Thomas, J., Jacobson, G. A., Narkowicz, C. K., Peterson, G. M., Burnet, H., & Sharpe, C. (2010). Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 35(5), 497-519.

- Tiecco, M., Cappellini, F., Nicoletti, F., Del Giacco, T., Germani, R., Di Profio, P. (2019). Role of the hydrogen bond donor component for a proper development of novel hydrophobic deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 281, 423–430.
- Tiwari, P., Sangwan, R.S., Sangwan, N.S. (2016). Plant secondary metabolism linked glycosyltransferases: an update on expanding knowledge and scopes. *Biotechnology Advances*, 34, 714-739.
- Tomás-Barberán, F.A. y Clifford, M.N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1024-1032.
- Torres Carro, R., Isla, M.I., Ríos, J.L., Giner, R.M., Alberto, M.R. (2015). Antiinflammatory properties of hydroalcoholic extracts of Argentina Puna plants. *Food Research International*, 67, 230-237.
- Torres Carro, R., Isla, M.I., Thomas-Valdes, S., Jiménez-Aspee, F., Schmeda-Hirschmann, G., Alberto, M.R. (2017). Inhibition of pro-inflammatory enzymes by medicinal plants from the Argentinean highlands (Puna). *Journal of Ethnopharmacology*, 205, 57-68.
- Toursarkissian, M. (1980) *Plantas medicinales de la Argentina; sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica*. Ed. hemisferio sur, Buenos Aires, Argentina, 178 pp.
- Ulibarri, E.A. (2005). *Zuccagnia punctata* (Leguminosae): ¿nuevo o viejo endemismo argentino? *Darwiniana*, 43:212-215.
- Umezawa, T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 2(3), 371-390.
- Ünlü, A. E. (2021). Green and non-conventional extraction of bioactive compounds from olive leaves: screening of novel natural deep eutectic solvents and investigation of process parameters. *Waste and biomass valorization*, 12(10), 5329-5346.
- Uysal, S., Aktumsek, A., Picot, C.M.N., Sahan, A., Mollica, A., Zengin, G., Fawzi, M. (2017). Mahomoodally, A comparative in vitro and in silico study of the biological potential and chemical fingerprints of *Dorcycinum pentaptyllum* subsp. haussknechtii using three extraction procedures. *New Journal of Chemistry*, 41(22) 13952-13960.
- Valoy, A., Alarcon, G., Roco, J., Zampini, C., Isla, M. I., Jerez, S. (2023a). A flavonoid-rich *Zuccagnia punctata* extract prevents high fat diet-induced normal weight obesity in a rabbit model. *Planta Medica*, 89(03), 245-253.
- Valoy, A., Alarcon, G., Roco, J., Zampini, C., Isla, M. I., Jerez, S. (2023b) Beneficial effects of hydro-alcoholic extract of *Zuccagnia punctata* against atherosclerosis in a normal weight obesity

- accompanied by hypercholesterolemia rabbit model. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*, 3(2), 156-164
- Vanda, H., Verpoorte, R., Klinkhamer, P. G., & Choi, Y. H. (2019). Natural deep eutectic solvents: From their discovery to their applications. *Deep eutectic solvents: synthesis, properties, and applications*, 61-81.
- Vani, V., Sreeja, S., Devika, P. S., Amina, T., Devapriya, S., & Thrishala, K. (2025). Exploring The Therapeutic Potential of Chalcone Derivatives: A Review of Biological Activities. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 13(1), 168-173.
- Vasconcellos, C., Pereira, C. Q. M., Souza, M. C., Pelegrini, A., Freitas, R. S., & Takahashi, J. P. (2013). Identification of fungi species in the onychomycosis of institutionalized elderly. *Anais brasileiros de dermatologia*, 88(3), 377-380.380.
- Vasyliiev, G., Lyudmyla, K., Hladun, K., Skiba, M., & Vorobyova, V. (2022). Valorization of tomato pomace: Extraction of value-added components by deep eutectic solvents and their application in the formulation of cosmetic emulsions. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(Suppl 1), 95-111.
- Vasyliiev, G., Makoś, P., Wyrzykowski, D. (2022). Application of choline-based natural deep eutectic solvents for extraction of phenolics and development of antioxidant cosmetic formulations. *Journal of Molecular Liquids*, 365, 120119.
- Vian, M., Breil, C., Vernes, L., Chaabani, E., Chemat, F. (2017). Green solvents for sample preparation in analytical chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 5 44-48.
- Villa, S. M., Heckman, J., & Bandyopadhyay, D. (2024). Medicinally privileged natural chalcones: abundance, mechanisms of action, and clinical trials. *International journal of molecular sciences*, 25(17), 9623.
- Wagner, H., Bladt, S., & Zgainsky, E. (1984). *Plant Drug Analysis*. Springer: Berlín, Alemanian.
- Walsh, T.J. y Dixon, D.M. (1996). Spectrum of mycoses. *Medical microbiology*, 4(1), 919-925.
<https://www.researchgate.net/publication/50410768>
- Walters, K. A., Flynn, G. L., & Marvel, J. R. (1985). Physicochemical characterization of the human nail: solvent effects on the permeation of homologous alcohols. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 37(11), 771-775.
- Wen, Q., Chen, J.X., Tang, Y.L., Wang, J., Yang, Z. (2015) Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere*, 132:63–69.

- Weng, J. K., Lynch, J. H., Matos, J. O., Dudareva, N. (2021). Adaptive mechanisms of plant specialized metabolism connecting chemistry to function. *Nature Chemical Biology*, 17(10), 1037-1045.
- Westerberg, D. P., y& Voyack, M. J. (2013). Onychomycosis: current trends in diagnosis and treatment. *American family physician*, 88(11), 762-770.
- Wikene, K.O., Røberg-Larsen, H., Flaten, G.E. (2017). Natural deep eutectic solvents (NADES) for pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 530(1-2), 164–173.
- Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 218-223.
- Woisky, R. G., y& Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*, 37(2), 99-105.
- Wu, L., Li, L., Chen, S., Wang, L., & Lin, X. (2020). Deep eutectic solvent-based ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* L. leaves: Optimization, comparison and antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 247, 117014.
- Xin, R., Qi, S., Zeng, C., Khan, F.I., Yang, B., Wang, Y. (2017) Un disolvente eutéctico profundo natural funcional basado en trehalosa: propiedades estructurales y fisicoquímicas. *Food Chemistry*. 217:560–567.
- Yolci Omeroglu, P., Acoglu, B., Özdal, T., Tamer, C. E., & Çopur, Ö. U. (2019). Extraction techniques for plant-based bio-active compounds. In *Natural Bio-active Compounds: Volume 2: Chemistry, Pharmacology and Health Care Practices* (pp. 465-492). Singapore: Springer Singapore.
- Zacchino, A. S., y Gupta, M. P. (2007). Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos. *Corpus Editorial y Distribuidora, Rosario*, 85, 57-73.
- Zacchino, S., Santecchia, C., López, S., Gattuso, S., Muñoz, J. D. D., Cruaños, A., Vivot, E., Cruaños, M.C., Salinas, A., de Ruiz, R.E.,... & Ruiz, S. (1998). In vitro antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. *Phytomedicine*, 5(5), 389-395.
- Zahrina, I., Nasikin, M., Krisanti, E., Mulia, K. (2018). Deacidification of palm oil using betaine monohydrate-based natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 240, 490-495.
- Zampini, I. C., Ordoñez, R. M., & Isla, M. I. (2010). Autographic assay for the rapid detection of antioxidant capacity of liquid and semi-solid pharmaceutical formulations using ABTS•+ immobilized by gel entrapment. *Aaps Pharmscitech*, 11(3), 1159-1163.
- Zampini, I. C., Vattuone, M. A., & Isla, M. I. (2005). Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(3), 450-456.

- Zampini, I. C., Villarini, M., Moretti, M., Dominici, L. e Isla, M. I. (2008). Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of hydroalcoholic extracts of *Zuccagnia punctata* Cav. Journal of Ethnopharmacology, 115(2), 330–335.
- Zampini, I.C., Cuello, S., Alberto, M.R., Ordóñez, R.M., D'almeida, R., Solorzano, E., Isla, M.I. (2009). Antimicrobial activity of selected plant species from “the Argentine Puna” against sensitive and multi-resistant bacteria. Journal of ethnopharmacology, 124(3), 499-505.
- Zampini, I.C., Villena, J., Salva, S., Herrera, M., Isla, M.I., Alvarez, S. (2012). Potentiality of standardized extract and isolated flavonoids from *Zuccagnia punctata* for the treatment of respiratory infections by *Streptococcus pneumoniae*: In vitro and in vivo studies. Journal of Ethnopharmacology, 140(2), 287-292.
- Zhang, J., Wu, Y., Zhao, X., Luo, F., Li, X., Zhu, H., Sun, C., Chen, K. (2014). Chemopreventive effect of flavonoids from Ougan (*Citrus reticulata* cv. Suavissima) fruit against cancer cell proliferation and migration. Journal of Functional Foods, 10, 511-519.
- Zhang, M., Zhang, X., Liu, Y., Wu, K., Zhu, Y., Lu, H., Liang, B. (2021). Insights into the relationships between physicochemical properties, solvent performance, and applications of deep eutectic solvents. Environmental Science and Pollution Research, 28(27), 35537-35563.
- Zhao, B.Y., Xu, P., Yang, F.X., Wu, H., Zong, M.H., Lou, W.Y. (2015). Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 3(11), 2746-2755.
- Zhou, P., Liu, G., Fang, H., Zhao, Z., Zhang, Y., Tang, X., Li, P., Zeng, J., Deng, Y., Zhang, M. (2024). Supramolecular deep eutectic solvents: Current advances and critical evaluation of cyclodextrins from solute to solvent in emerging functional food. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 23(6), e70026.
- Zhou, P., Wang, X., Liu, P., Huang, J., Wang, C., Pan, M., & Kuang, Z. (2018). Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. Industrial Crops and Products, 120, 147-154.
- Zhuang, B., Dou, L. L., Li, P., Liu, E. H. (2017b). Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi Cacumen*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 134, 214-219.
- Zhuang, B., Dou, L., Wang, G., Zhang, H., Zhang, L. (2017a). Efficient extraction of flavonoids from *Platycladi cacumen* by choline chloride-based deep eutectic solvents. Separation and Purification Technology, 174, 325–333.

Zuloaga F.O. y Morrone O. (1999). Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina.

II. Fabaceae-Zygophyllaceae (Dicotyledoneae). Monography Systematic Botany. Missouri Botany Garden, USA, p 74. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/62718305>