



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis de Maestría:

***Estudio de actividades farmacológicas, aspectos botánicos y
caracterización fitoquímica de Humulus lupulus L. (Cannabaceae)***

Tesista:

Blga. Carmita Lucia Lojano Gutierrez

Director/a:

Prof. Dra. Alicia E. Consolini

Codirector/a:

Prof. Dr. Osvaldo León Córdoba

Prof. Mg. Marta Colares

Año: 2024

DEDICATORIA

*A mi madre Nelly y a la memoria de mi padre Jorge Alejandro.
y a mis hermanos quienes siempre me apoyaron a pesar de la distancia.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata y a la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, por brindarme la oportunidad de obtener la formación en sus aulas universitarias.

A mis directores de tesis Prof. Dra. Alicia Consolini, Prof. Mg. Marta Colares y Prof. Dr. Osvaldo León Córdoba, y a la colaboración de la Prof. Dra. María Luján Flores (CRIDECIT, FCNyCS, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina), por todo su apoyo incondicional en la elaboración del trabajo de tesis y durante todo el periodo académico, mil gracias por todos los aprendizajes y la hospitalidad en la República Argentina.

A Soledad Matera, muchas gracias por la amistad y apoyo en cada etapa de la maestría y a todas las personas que tuve la oportunidad de conocer en este hermoso país, sin duda su presencia hizo más fácil el trayecto que se realizó lejos de mi familia en Ecuador.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	9
1.1 GENERALIDADES ACERCA DEL LÚPULO	10
1.2 HISTORIA Y ETNOFARMACOLOGIA DEL LUPULO	14
1.3 REFERENCIAS HISTÓRICAS DE LUPULO EN ARGENTINA	15
1.4 REFERENCIAS BOTÁNICAS	16
1.4.1 Rizoma	16
1.4.2 Tallo	17
1.4.3 Hojas	18
1.4.4 Flores.....	19
1.4.5 El cono (estróbilo)	20
1.4.6 Lupulina	21
1.5 FARMACOLOGÍA Y FITOQUÍMICA	22
1.6 ACEITE VOLÁTIL.....	23
1.7 MODELOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD SOBRE MÚSCULO LISO.....	24
1.7.1 Músculo liso intestinal	25
1.7.2 Músculo liso uterino.....	27
1.7.3 Músculo liso de la vejiga urinaria	28
1.8 ESTUDIOS DE CONDUCTA EN RATONES	29
1.8.1- Test de campo abierto	29
1.8.2- Test del laberinto en cruz elevado	29
1.8.3- Test de supresión del alimento	29
1.9 HIPÓTESIS DE TRABAJO PARA LA TESIS	30
2. OBJETIVOS DE LA TESIS.....	31
2.1 OBJETIVOS GENERALES	32

2.2 Objetivos Específicos	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 MATERIAL VEGETAL	34
3.2 Extractos para estudios farmacológicos	35
3.2.1 Preparación de la tintura madre de Lúpulo	35
3.2.2 Preparación de la decocción de Lúpulo	36
3.3 Animales empleados	37
3.4 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA	37
3.4.1 Soluciones y drogas empleadas	38
3.4.2 Preparados biológicos <i>ex vivo</i>	39
3.4.2.1 Intestino aislado de rata	39
3.4.2.2 Vejiga aislada de rata	40
3.4.2.3 Útero aislado de rata	40
3.4.3 Curvas concentración – respuesta (CCR) de Carbacol	40
3.4.4 Curvas concentración – respuesta (CCR) de calcio	41
3.5 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CENTRAL	42
3.5.1 Soluciones y drogas empleadas	42
3.5.2 Test de campo abierto en ratones	42
3.5.3 Test de supresión del alimento	44
3.5.4 Test del laberinto en cruz elevada	45
3.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	45
3.7 METODOLOGÍA PARA ESTUDIOS BOTÁNICOS	46
3.7.1. Material estudiado	46
3.7.2 Microscopía óptica	46
3.7.3 Técnica de Dizzeo de Stritmatter	47

3.7.4 Técnica de Arambarri	47
3.8 METODOLOGIA PARA ANALISIS FITOQUIMICOS	48
3.8.1 Obtención del material vegetal	49
3.8.2 Obtención de los extractos	51
3.8.2.1 Extracción con etanol de 70°	51
3.8.2.2 Extracción acuosa	51
3.8.2.3 Extracción con cloroformo	52
3.8.2.4 Extracción con éter etílico	52
3.8.2.5 Extracción mediante destilación por arrastre con vapor de agua	52
3.8.2.6 Rendimiento	53
3.8.2.7 Reconstitución de los extractos para estudios posteriores	53
3.9 CARACTERIZACION QUIMICA	53
3.9.1 Hidratos de carbono: reacción de Molisch (α - naftol en etanol al 10 % P/V)	53
3.9.2 Flavonoides: reaccion de Shinoda	54
3.9.3 Hidroxilos fenolicos: reacción con FeCl_3 al 1-2 %	54
3.9.4 Quinonas: reaccion de Bornträger	54
3.9.5 ESTEROIDE / TRITERPENOS: reacción de Liebermann-Burchard	55
3.9.6 ALCALOIDES: REACTIVO DE DRAGENDORFF, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ en HNO_3 -KI en agua destilada	55
3.10 DETERMINACIÓN DE PERFILES CROMATOGRÁFICOS	55
3.10.1 Sistema cromatográfico planar en capa fina de adsorción orientado a evidenciar flavonoides (TLC):	56
3.10.2 Sistema cromatográfico planar de partición orientado a flavonoides (CP):	56
3.10.3 Sistema cromatográfico planar en capa fina de adsorción orientado a terpenos (TLC):	56
3.10.4 RP-HPLC-DAD	57
3.10.5 CG-MS	57
4. RESULTADOS	59
4.1 RESULTADOS DE ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS	60
4.1.1 Estudios de la actividad antiespasmódica sobre el músculo liso intestinal del extracto hidroalcohólico de flores de lúpulo	60
4.1.1.1. Efectos del lúpulo sobre las curvas concentración respuesta de carbacol	60

4.1.2 Estudio de la actividad antiespasmódica del extracto hidroalcohólico de lúpulo sobre la vejiga aislada de rata	62
4.1.2.1. Efectos de lúpulo en las CCR de carbacol	62
4.1.2.2. Efectos de lúpulo sobre las CCR de Calcio	64
4.1.3 Efectos de <i>Humulus lupulus</i> sobre la contractilidad de útero aislado.....	65
4.1.3.1. Efectos de la tintura de Lúpulo sobre las CCR de carbacol	65
4.1.4 ESTUDIO DE LOS EFECTOS SOBRE LA CONDUCTA EN RATONES	67
4.1.4.1 Test de campo abierto	67
4.1.4.2. Test de supresión del alimento.....	70
4.1.4.3. Test del laberinto en cruz elevado	72
4.2 RESULTADOS DE ESTUDIOS BOTÁNICOS	74
4.2.1 BRACTEOLA (VISTA SUPERFICIAL DE EPIDERMIS).....	74
4.2.2 Haz o cara adaxial.....	75
4.2.3 Enves o cara abaxial	78
4.3 RESULTADOS DEL ANALISIS FITOQUIMICO.....	81
4.3.1 Extracción general y rendimientos	81
4.3.2. Hidratos de carbono. Reacción de Molisch.....	82
4.3.3. Flavonoides. Reacción de Shinoda.....	82
4.3.4 Hidroxilos fenólicos. reacción con FeCl ₃ AL 1-2 %	83
4.3.5 Quinonas. Reacción de Bornträger.....	84
4.3.6. Esteroides / triterpeno. Liebermann-Burchard	87
4.3.7. Alcaloides. Reacción con el reactivo de Dragendorff	87
4.4 RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS CROMATOGRÁFICOS	90
4.4.1 Resultados del estudio mediante cromatografía instrumental empleando RP-HPLC-DAD.....	99
4.4.2 Resultados del estudio mediante cromatografía instrumental empleando CG-MS	103
5. DISCUSION.....	106
5.1 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS	107

5.1.1 Efectos antiespasmódicos.....	107
5.1.2 Efectos centrales.....	110
5.2 ESTUDIOS BOTÁNICOS.....	112
5.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICOS.....	115
6. CONCLUSIONES.....	120
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

1. INTRODUCCION



1.1 GENERALIDADES ACERCA DEL LÚPULO

El lúpulo, *Humulus lupulus* L., pertenece a la familia Cannabaceae, que incluye entre otras especies al cáñamo o marihuana (*Cannabis sativa*). Según la revisión bibliográfica realizada el 29 de febrero de 2024 en el enlace Plants of the World Online (POWO, 2024), actualmente existen 7 especies del género *Humulus* L. aceptadas:

Humulus lupulus L.

Humulus americanus Nutt.

Humulus cordifolius Miq.

Humulus japonicus (Siebold & Zucc).

Humulus pubescens (E. Small) Tembrock

Humulus neomexicanus (A. Nelson & Cockerell) Rydb.

Humulus scandens (Lour.) Merr.

Humulus lupulus es una especie dioica, trepadora, perenne en su parte subterránea y anual en la parte aérea. Su sistema radical lo conforma una raíz pivotante y numerosas raíces secundarias, que profundiza hasta 2-3 m. y lateraliza más de 2 m. desde el eje. La planta posee durante su desarrollo una raíz pivotante principal y raíces secundarias. Suele formar rizomas (tallos subterráneos) desde donde nacen numerosas raíces (Dodds, 2017).

Cada primavera se generan numerosas raicillas que al cambiar las condiciones ambientales al final de la temporada se atrofian y mueren, para volver a regenerarse en primavera. Ese rizoma que brota anualmente, tiene una vida media útil de 12 a 15 años (Nievas *et al.*, 2021).

El tallo aéreo es robusto, piloso, verde o violáceo, con sección transversal hexagonal e interiormente fistuloso; con estípulas (**Figura 1**). Dichas hojas son opuestas, palmeado y divididas en 3 a 5 lóbulos con márgenes cerrados (Nievas *et al.*, 2021).



Figura 1. Etapa de brotación de lúpulo (Fuente: Libro el cultivo del lúpulo. INTA 2021).

Posee un fuerte fototropismo que le permite crecer hacia donde se encuentra la mayor cantidad de luz disponible y un tigmotropismo o respuesta al contacto físico con el tutor que le facilita enrollarse alrededor del mismo (McCormack, 2006). A esto se suma una marcada dominancia apical que hace que el tallo no cese el desarrollo vertical prácticamente hasta que aparecen las ramas laterales en las cuales se producen las flores (Magadán, 2011). Puede crecer en la temporada hasta 30 cm/día (Kneen, 2003), con lo cual se la cataloga como una de las especies de más rápido crecimiento después del bambú (Wildfind, 2020). Son las características propias del sistema radicular en cuanto a su extensión y capacidad de almacenamiento, las que hacen posible este rápido desarrollo durante la primavera verano (Nievas *et al.*, 2021).

La **Figura 2** muestra detalles botánicos de la especie: el lúpulo incluye plantas típicamente dioicas. En las axilas de las hojas superiores se disponen las inflorescencias masculinas o estaminadas paniculiformes; y las femeninas con aspecto de estrobilo o cono. Las flores masculinas poseen un perianto reducido y cinco estambres; las flores femeninas carecen de perianto y están protegidas por brácteas. El fruto es uniseminado.



Figura 2. a) Rama con flores masculinas o estaminadas; b) inflorescencia masculina; c) Flor masculina; d) Ramilla femenina; e) Inflorescencia femenina; f) Detalle de la porción apical de una inflorescencia femenina; g) Bráctea con una flor femenina; h) Bráctea con dos flores femeninas; i) Fruto maduro; j) Fruto abierto que muestra semilla; k) Semilla. (Fuente: Castroviejo B. Libro Flora Iberica-Plantas Vasculares)

La planta de lúpulo es conocida en todo el mundo como materia prima en la industria cervecera por los compuestos polifenólicos existentes en las inflorescencias femeninas que dan un aroma y sabor característicos. También ha sido utilizada con fines medicinales, particularmente para trastornos del sueño. Además, en medicina tradicional se ha considerado que ejerce efectos diuréticos, antiespasmódicos, antirreumáticos, analgésicos y anafrodisíacos (Zanoli y Zavatti, 2008). Sin embargo, el número de estudios preclínicos y

clínicos que avalan estos usos medicinales es limitado, por lo cual la efectividad de la planta en el tratamiento del insomnio es aún cuestionable.

Otro uso medicinal que se le atribuye es para activar la función gástrica como amargo estomáquico. Esta actividad ha sido evaluada en varios estudios experimentales con modelos de acidez gástrica y de inhibición del crecimiento del *Helicobacter pylori* y de factores inflamatorios epiteliales como la IL-8 (Sangiovanni y *et al.*, 2019).

Por otra parte, en Alemania el lúpulo ha sido empleado tradicionalmente para tratar alteraciones ginecológicas. En los últimos años se han investigado sus propiedades estrogénicas, observando que el extracto metanólico estimula receptores estrogénicos de tipo genómico alfa y beta, RE α y RE β (Liu y *et al.*, 2001). Esta propiedad ha sido investigada tanto en el control hormonal, como en una posible actividad quimiopreventiva del cáncer (Colgate *et al.*, 2007).

En Argentina la región por excelencia para el cultivo de lúpulo es la ciudad patagónica de El Bolsón, situada en la Comarca Andina del paralelo 42° en el noroeste de la Patagonia. En esta región actualmente hay más de 100 hectáreas en producción y unas 60 en el Camino de Los Nogales, que es considerada la zona más fértil, según los productores. El lúpulo para su crecimiento requiere una gran cantidad de energía solar, así como agua y nutrientes, y los productores dicen que “*al lúpulo le gustan los días largos*”, por eso la Patagonia es el lugar ideal para su producción. Se están haciendo ensayos en Mar del Plata, pero más al norte no se desarrollaría en forma óptima (nota de La Nación, 2020). En dicha nota, Hernán Testa, productor de lúpulo en el sur Argentina, ha indicado que al momento no se han desarrollado productos sintéticos que lo reemplacen en la producción de cerveza. A pesar de que en la Argentina se consumen 1000 toneladas de lúpulo por año, se producen apenas 350, con lo cual es necesario importar. El principal consumo del lúpulo es para la elaboración de cerveza, siendo agua, malta, lúpulo y levadura los ingredientes esenciales de esta bebida. Se requieren entre 1 y 3 kilos (en promedio) de lúpulo para preparar 1000 litros de cerveza artesanal.

1.2 HISTORIA Y ETNOFARMACOLOGIA DEL LUPULO

Como informó Behre (1999), en Europa hay sólo pocos hallazgos de hojas o flores de *H. lupulus* en períodos prehistóricos, mientras que hay un mayor número de sitios donde se lo encontró que datan de principios de la Edad Media. Esto es probablemente debido a que en el periodo medieval se inició la utilización de la planta en el proceso de elaboración de cerveza. Al principio, las plantas se colectaban en su hábitat silvestre. El cultivo del lúpulo se inició a mediados del siglo IX, entre los años 859 y 875 d.C., en Alemania, donde se extendió de norte a sur durante la Alta Edad Media, así como a otras regiones de Europa central. Al principio, *H. lupulus* se utilizó como alternativa a la especie vegetal *Myrica gale* (familia Miricaceae) conocida como mirto de turbera, que era el aditivo de cerveza predominante en el área europea de donde era originario. En el siglo XVIII el uso de *Humulus lupulus* superó al de la especie *M. gale* debido a que resultaba mejor su conservación (Behre, 1999).

Originalmente se utilizó *H. lupulus* como conservante por su actividad antimicrobiana; más tarde se utilizó adicionalmente para agregar un sabor. Desde un punto de vista histórico, la primera referencia literaria de *H. lupulus* fue realizada por el naturalista Plinio el Viejo (23-79 d.C.) quien describió el uso alimenticio de la planta por los romanos (Grieve, 1971). Los tallos fibrosos, al igual que el cáñamo (*Cannabis sativa*, Cannabaceae), se utilizaron en la fabricación de un tipo de telas toscas y en la producción de papel (Grieve, 1971). El lúpulo se usaba también en perfumes, especialmente los tipos especiados y orientales, y como aditivo en cremas y lociones para la piel (Lawless, 1995).

H. lupulus tiene además una larga historia como planta medicinal para tratar una amplia gama de dolencias. Tradicionalmente, el lúpulo se utilizaba para tratar la excitabilidad y la inquietud asociadas a la cefalea tensional; para mejorar el apetito y la digestión; para aliviar el dolor de muelas, el dolor de oídos y la neuralgia (Grieve, 1971). Su uso como planta medicinal para tratar diferentes trastornos está algo documentado, y entre los usos se pueden citar el alivio de síntomas menopáusicos, incluyendo la ansiedad e insomnio (Zanoli y Zavatti 2008). Ha sido recomendado como sedante en trastornos del sueño y nerviosismo; las inflorescencias se han utilizado para tratar la ansiedad y la

inquietud provocada por la cefalea tensional; también para mejorar el apetito y la digestión, aliviar el dolor de muelas, de oídos y las neuralgias (Zorzano, 2013). En aromaterapia, el lúpulo se ha utilizado para el cuidado de la piel, afecciones respiratorias, nerviosismo, dolor nervioso y afecciones relacionadas con el estrés (Lawless, 1995). Por vía tópica el lúpulo se utilizó para tratar úlceras crurales y lesiones cutáneas y para aliviar los espasmos musculares y el dolor nervioso (Lawless, 1995). Dichos usos han sido documentados en la página de MedlinePlus Suplementos (2021), junto a otros como hiperlipidemias, calambres intestinales, vejiga hiperactiva, y el uso tópico en úlceras de piernas, aunque se indica que hay insuficiente evidencia científica para todos ellos.

El efecto estrogénico del lúpulo se describió por primera vez hace más de 50 años cuando se documentó que el ciclo menstrual de las mujeres que recolectaban lúpulo se veía influido por el momento de la recolección. En 1988 se identificó la estructura química del compuesto descrito como el principal fitoestrógeno del lúpulo, la 8-prenilnaringenina (8-PN), a partir de los estudios realizados por Milligan *et al.* (1999) y Liu *et al.* (2001).

1.3 REFERENCIAS HISTÓRICAS DE LUPULO EN ARGENTINA

Con referencia al cultivo de lúpulo en Argentina, los primeros gajos fueron traídos al país después de la primera guerra mundial. Se trataba de material procedente de Alemania, de las regiones de Spalt y Tettang. Las experiencias se realizaban en establecimientos privados y esporádicamente también en los oficiales, hasta que la empresa cervecera Quilmes decidió implantarlo en forma industrial. En el año 1935 lo cultivó en Sierra de la Ventana, y luego en el año 1945 en Comandante Nicanor Otamendi en las proximidades de Mar del Plata (Leskobar, 1978).

En 1948, la Dirección de Cultivos Especiales, división de Plantas Aromáticas y Medicinales, elaboró un proyecto de ensayos en distintas regiones del país. Los resultados de las primeras experiencias entusiasmaron a la misma empresa cervecera que decidió seguir con la experimentación, y en 1949 inició

con el fomento del cultivo en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. (Leskobar, 1978).

En 1957 se suma a esta región el Valle de El Bolsón al sur de San Carlos de Bariloche, donde el lúpulo se afirmó a través de años, proporcionando a la región un importante progreso socio-económico (Leskobar, 1978). Se han seleccionado tres cultivares para el Alto Valle y cuatro para El Bolsón. Son éstos: *Clusters* y *Cascade* procedentes de E.E.U.U. y *Pride of Ring Wood* de Australia; y para El Bolsón además de *Cascade* desarrollan normalmente: *Brewers Gold* y *Bullion*, originarios de Inglaterra y el clásico *Spalt* de procedencia alemana, conocido como lúpulo aromático (Leskobar, 1978).

1.4 REFERENCIAS BOTÁNICAS

Se presume que el origen del género es China, porque todas las especies se encontraron en ese área (Zanoli y Zavatti, 2008).

Las especies difieren en características morfológicas como el número de lóbulos de la hoja y pelos. Los lúpulos norteamericanos y japoneses se parecen morfológicamente, lo que sugiere una relación genéticamente estrecha, mientras que difieren ampliamente de los lúpulos europeos.

A continuación, se describen las principales características morfológicas de la planta:

1.4.1 TALLO SUBTERRÁNEO O RIZOMA

Humulus lupulus L. es una enredadera perenne que vuelve a crecer cada primavera a partir de un rizoma subterráneo, el cual se muestra en la **Figura 3**.



Figura 3. Rizoma de lúpulo (Fuente: Doodds K, 2017, Hops a guide for new growers).

El rizoma es el órgano de almacenamiento perenne de la planta. Alimenta el crecimiento del dosel productivo y asegura la supervivencia de la planta de una temporada a la siguiente. Las coronas maduras generalmente tienen algunas raíces penetrantes muy profundas y un sistema de raíces alimentadoras poco profundas. Las plantas de lúpulo pueden seguir siendo productivas durante muchos años.

Un rizoma es un tallo subterráneo con brotes y raíces. A medida que la corona del lúpulo madura y se desarrolla, algunos rizomas pueden cosecharse y usarse como fuente de materia de propagación clonal.

1.4.2 TALLO AÉREO

El tallo es robusto, piloso, verde o violáceo, de sección generalmente hexagonal y con estípulas de las que salen las hojas. Dichas hojas son opuestas, palmeado - hendidas, y divididas en 3 a 5 lóbulos (Magadán, 2011), con márgenes serrados (Sirrione, 2010).

Los tallos aéreos son delgados y trepadores (**Figura 4**). Giran alrededor de su soporte en el sentido de las agujas del reloj. Una referencia al hábito de la planta de trepar sobre otras plantas se refleja en su nombre *lupulus*, que se deriva del término latino lupus, “un lobo trepando sobre una oveja” (Grieve, 1971). Además, el nombre común en inglés “hop” proviene del anglosajón hoppan que significa escalar.



Figura 4. Tallos aéreos trepadores de lúpulo en el sentido de las agujas de reloj. Planta ubicada en la ciudad de La Plata (Foto / Fuente: Lucia Lojano Gutierrez).

1.4.3 HOJAS

Las hojas son de color verde oscuro, pecioladas, con el pecíolo más corto que el limbo; limbo foliar 3-5 (7) lobulado, a veces simple en hojas apicales; 4-11 x 4-8 cm, glabro o con pubescencia suave en la cara abaxial; cara adaxial sin o con pocos pelos cistolíticos en el margen cuando la hoja es joven; base cordada; margen groseramente aserrado. (**Figura 5**).



Figura 5. Hojas de lúpulo. Planta sembrada en la ciudad de La Plata, Argentina. (Foto / Fuente: Carmuta Lucia Lojano Gutierrez).

1.4.4 FLORES

El lúpulo es dioico, es decir, las flores estaminadas o masculinas, y las pistiladas o femeninas nacen en plantas separadas. En la producción comercial de lúpulo, sólo se desean inflorescencias pistiladas sin fertilizar (sin semillas) ya que producen el mayor rendimiento de lupulina (resina). Las plantas masculinas sólo se usan cuando los fitomejoradores desean hibridar y desarrollar nuevas variedades (Dodds, 2017). Las plantas masculinas se distinguen fácilmente de las femeninas. Las flores estaminadas se disponen en inflorescencias paniculiformes con racimos largos, de 7,5 a 12,5 cm de largo; mientras que las pistiladas se desarrollan formando conos (llamados estróbilos), de 2,5 a 5 cm de largo, formados por brácteas membranáceas (Dodds, 2017). (**Figuras 6 y 7**).



Figura 6. Flores de lúpulo femeninas o pistiladas.



Figura 7. Flores de lúpulo masculinas o estaminadas

(Fuente / fotos Doodds K, 2017, Libro Hops a guide for new growers)

1.4.5 EL CONO O INFLORESCENCIA (ESTRÓBILO)

El cono (estróbilo) de lúpulo es la inflorescencia de flores pistiladas. El cono contiene las glándulas de lupulina que producen los ácidos alfa, los ácidos beta y los aceites esenciales que los cerveceros valoran por su amargor y sus propiedades aromáticas. La mayor parte de la lupulina se produce alrededor de la base de las bracteolas dentro del cono de lúpulo (Dodds, 2017). La **Figura 8** presenta detalles del cono.



Figura 8. Conos de lúpulo de una plantación de la ciudad de La Plata. (Fuente.Fotos. Carmita Lucía Lojano Gutierrez).

1.4.6 LUPULINA

La resina conocida como lupulina, está compuesta por varios ácidos y aceites diferentes, cada uno de los cuales contribuye de manera ligeramente diferente al proceso de elaboración de la cerveza. Los de interés principal para el cervecero son los ácidos alfa y beta.

Se describen tres ácidos alfa principales: humulona, adhumulona y cohumulona. La adhumulona se presenta sólo en pequeñas cantidades y no es particularmente importante. La humulona es el ácido alfa más estudiado, y la cohumulona es objeto de mucha controversia entre los cerveceros y los investigadores. Se cree que la cohumulona produce una amargura más severa, por lo que a menudo se busca un perfil bajo de este ácido. Los ácidos alfa producen amargor en la cerveza, fundamental para el equilibrio seco-dulce que le da carácter a la cerveza (Zanoli y Zavatti, 2008). La **Figura 9** indica las glándulas de lupulina.

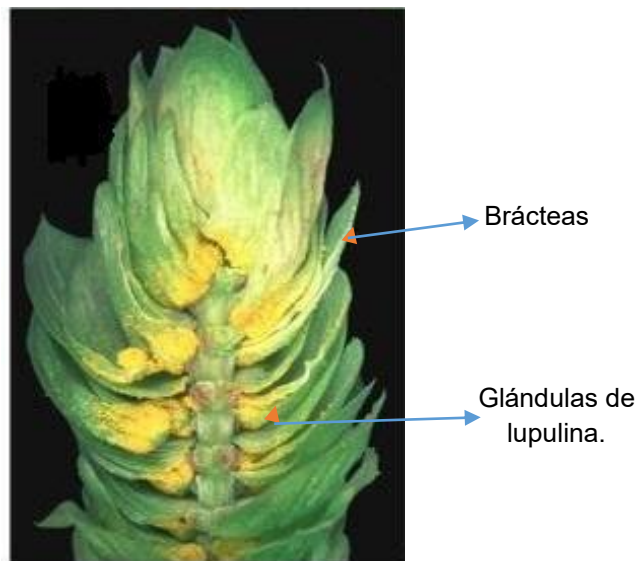


Figura 9. Glándulas de lupulina. Fuente: (Doodds K, 2017)

1.5 FARMACOLOGÍA Y FITOQUÍMICA

Tal como se describió en párrafos anteriores, los ácidos amargos presentes en las inflorescencias femeninas se clasifican principalmente en humulonas (ácidos alfa) y lupulonas (ácidos beta). Todos ellos son derivados prenilados del floriglucinol (Hsu y Kao, 2019).

Además, se describieron chalconas y otros flavonoides como la 8-prenilnaringenina (8-PN) caracterizado como uno de los fitoestrógenos más potentes (Zanoli y Zavatti, 2008). El consumo moderado de lúpulo ha evidenciado efectos positivos en la salud a nivel digestivo, cardiovascular, endócrino y esquelético. Sin embargo, no hay suficientes estudios científicos. A nivel endócrino, el extracto de *Humulus lupulus* se utilizó para tratar los síntomas posmenopáusicos debido a sus propiedades estrogénicas (Chadwick y col., 2006). Además, la 8-PN confirmó su efectividad fitoestrogénica en diferentes

experimentos *in vivo*, incluidas ratas ovariectomizadas (Diel *et al.*, 2004; Overk *et al.*, 2008).

Por otra parte, se atribuyó principalmente un efecto beneficioso sobre la osteoporosis postmenopáusica a los compuestos bioactivos del lúpulo, especialmente al xantohumol y a los ácidos amargos. Los ácidos amargos promueven la osteogénesis e inhiben la actividad osteoclástica (Chadwick *et al.* 2006).

Los flavonoides podrían ser los responsables de los efectos antiespasmódicos del lúpulo a nivel gastrointestinal. Otras plantas que poseen flavonoides han demostrado producir efecto antiespasmódico asociado a la inhibición del influjo de calcio al músculo liso (Ragone *et al.*, 2007; Nigusse *et al.*, 2019; Bernal-Ochoa *et al.*, 2020).

Además, se ha descrito que el extracto de lúpulo tiene propiedades antioxidantes, ya que las humulonas y lupulonas mostraron dicha actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica (Kontek y *et al.*, 2021).

1.6 ACEITE VOLÁTIL

Entre muchos metabolitos secundarios aislados de las plantas, se destacan algunos, muy especiales, de amplio uso en diversas ramas de la industria, medicina y en muchos productos empleados en la vida cotidiana, esta clase de sustancia recibe el nombre de aceite esencial, aceite volátil, aceite etéreo o esencia. Numerosas sustancias forman parte de la esencia, que es una mezcla compleja de compuestos volátiles y de naturaleza química muy diversa. (Stashenko, 2009).

Los aceites esenciales en las plantas pueden encontrarse en las diferentes células oleíferas, en los canales secretorios, en las glándulas o en los tricomas. El material vegetal, al ser sometido al vapor de agua, libera una mezcla odorífera líquida (aceite esencial) de una gran variedad de sustancias volátiles,

que recuerdan el olor, en forma muy concentrada, de la misma planta. Esta mezcla puede tener desde 50 hasta más de 300 sustancias químicas y está compuesta por hidrocarburos terpénicos, sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos y cetonas, así como éteres, ésteres, compuestos fenólicos, fenilpropanoides y otros derivados. (Stashenko, 2009)

Se sabe que el aceite esencial de lúpulo contiene una gran cantidad de componentes volátiles, incluidos alcanos, monoterpenos y sesquiterpenos oxidados simples (Farnsworth, 2008). Eri *et al.* (2000) detectaron 286 sustancias químicas distintas en el aceite volátil mediante cromatografía gaseosa, de las cuales más de 100 no fueron identificadas. Los constituyentes volátiles primarios en todos los cultivares fueron los monoterpenos tales como mirceno, y los sesquiterpenos β -cariofileno y humuleno. Se demostró que en conjunto comprenden entre el 57 y el 82 % del aceite volátil, dependiendo del cultivar y el método de detección (Eri *et al.*, 2000).

1.7 MODELOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD SOBRE MÚSCULO LISO

Los experimentos en órganos aislados (“*ex vivo*”) permiten conocer sobre qué tipo de receptor actúa un compuesto químico. Si hay un grupo de sustancias que interactúe con el mismo sistema receptor produciendo la misma clase de efectos, es posible comparar sus respectivas propiedades de interacción droga-receptor. Por lo tanto, estos preparados pueden ser utilizados para obtener información acerca de los efectos de principios activos obtenidos de plantas, y de esta manera lograr un acercamiento a la definición del mecanismo de acción de estos principios activos (Consolini y Ragone, 2017).

Con el objeto de obtener los parámetros de interacción fármaco-receptor se construyen curvas concentración-respuesta (CCR), que consisten en un barrido de los efectos producidos por un rango amplio de concentraciones del agonista. Para el estudio de los efectos de extractos de origen vegetal se utiliza el método de CCR acumulativa, dado que es el más rápido para realizarlas y

obtener los parámetros correspondientes que caracterizan la interacción droga-receptor. El método consiste en el agregado de una serie de concentraciones crecientes del agonista, hasta lograr el efecto máximo del tejido elegido. Luego se realizan las mismas curvas en presencia de diferentes concentraciones del extracto en estudio, y se comparan con las anteriores (controles). Este método permitirá deducir el tipo de interacción existente entre el extracto y los receptores presentes en el preparado y calcular los parámetros correspondientes a tal interacción (Consolini y Ragone, 2017).

En esta Tesis se emplearon los preparados aislados de intestino delgado, vejiga y útero de rata.

1.7.1 MÚSCULO LISO INTESTINAL

El intestino delgado está formado por dos capas de músculo liso, el longitudinal y el circular intestinal, y se encuentra innervado por las ramas simpáticas y parasimpáticas del sistema nervioso autónomo, cuyos axones convergen en el plexo mientérico. La regulación autonómica del músculo liso intestinal se origina en dos sitios ganglionares, el plexo mientérico (Auerbach) y el plexo submucoso (Meissner). El plexo mientérico separa y provee la innervación para la regulación del ritmo de las dos capas musculares, interna circular y externa longitudinal. Los movimientos peristálticos son miogénicos y accionados por reflejos locales. El movimiento pendular es el único que perdura en el intestino una vez aislado, y se debe a una actividad eléctrica marcapaso con localización oscilante en el músculo, que genera pulsos de despolarización. Estas ondas, comúnmente conocidas como espigas, activan canales de Ca^{2+} tipo L que desencadenan el tono basal y contracciones pendulares. Esto se comprueba porque la eliminación del Ca^{2+} del medio extracelular disminuye el tono y el movimiento pendular (Mc Hale *et al.* 2006).

Los movimientos peristálticos intestinales son aumentados por la activación del sistema nervioso parasimpático, que libera acetilcolina actuando en receptores muscarínicos M1 y M3. Estos receptores se acoplan a la proteína

Gq, la cual estimula al sistema de fosfolipasa C, que cataliza la formación de los segundos mensajeros IP₃ y DAG. El DAG activa a la PKC y ésta fosforila y consecuentemente activan a los canales tipo L de calcio. El proceso de contracción del músculo liso es mucho más lento que el del músculo esquelético o cardíaco, y está regulado por la concentración intracelular de Ca²⁺. Esta aumenta luego del ingreso de Ca²⁺ a través de los canales tipo L voltaje-dependientes (canales sensibles a las dihidropiridinas) y eventualmente al ser liberado por el retículo sarcoplasmático (Rang y Dale, 2008).

Por el contrario, el músculo liso intestinal es inhibido por el sistema nervioso simpático, del cual se libera noradrenalina (NA). Ésta interactúa con los receptores α -2 presinápticos en la fibra colinérgica vagal, de manera que reducen la liberación de acetilcolina (ACh) y el peristaltismo. Sinérgicamente, la adrenalina circulante estimula a los receptores β -2, los cuales median la relajación del músculo intestinal. La activación de este receptor estimula la vía Gs/AC/AMPc/PKA que fosforila a la KCLM (quinasa de la cadena liviana de la miosina) reduciendo la formación del complejo Ca²⁺-calmodulina-KCLM y la consecuente contractilidad de las fibras musculares lisas (Rang y Dale, 2008).

En los experimentos se utilizó el preparado de porciones de duodeno e íleon de rata aislados, los cuales conservan un movimiento pendular consecuente a despolarizaciones a modo de marcapaso difuso. Mediante estos preparados se evaluó la acción del lúpulo sobre la fuerza de contracción de la capa muscular longitudinal, ya que el preparado se ubica en una cuba de órgano conectado a un transductor de fuerza en sentido longitudinal. Considerando que la musculatura lisa del preparado es de bajo espesor, se puede aplicar el método de superfusión, sumergiendo el tejido en la solución nutritiva (Tyrode) con el requisito de mantener el tubo intestinal abierto para la circulación del medio oxigenado (Consolini y Ragone, 2017).

1.7.2 MÚSCULO LISO UTERINO

El músculo liso uterino tiene tanto innervación simpática como parasimpática. Los receptores muscarínicos presentes son de los subtipos M1 y M3, los que al igual que en intestino y demás músculos lisos viscerales están acoplados a una proteína Gq y conducen al aumento del influjo de Ca^{2+} y el consecuente aumento del tono uterino. La población de receptores se modifica con el estado hormonal, especialmente en la proporción de los receptores adrenérgicos de tipo α -2 y β -2 adrenérgicos, aunque ambos conducen a relajación (Darios *et al.*, 2012).

Además, el útero responde a otros agonistas, principalmente oxitocina, serotonina (5-HT) y prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$), quienes disparan la activación de las corrientes de calcio tipo L. La oxitocina y la prostaglandina son los agentes oxitócicos naturales encargados de desencadenar el parto, mientras Ach y 5HT ejercen un rol modulador menor en condiciones no gestantes (Kitchen, 1984).

Por otra parte, el tejido uterino aislado tiene una actividad eléctrica espontánea que desencadena contracciones fásicas seguidas por relajaciones hasta el tono basal. Las contracciones fásicas son originadas por la inactivación de canales de K^+ , lo cual provoca despolarización y consecuentemente la activación de canales de calcio tipo L (L-Ca^{2+}). En cambio, la relajación es provocada por la inactivación de dichos canales de Ca^{2+} y la activación de varias clases de canales de K^+ , lo cual provoca repolarización o hiperpolarización. Entre ellos, se han encontrado en el útero los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de gran conductancia o "big K^+ channels" (BK), los canales de K^+ sensibles a ATP (KATP), y al menos un canal de K^+ rectificador hacia el interior (Smith *et al.* 2007). En el preparado de vejiga aislada de rata y superfundida en una cuba de órgano, esta actividad espontánea se reduce bajando la temperatura desde 37 a 32 °C, y empleando un medio extracelular con baja concentración de calcio (solución de Jalon). Además, se aconseja inducir el estado de estro del animal por

administración subcutánea de un estrógeno 24 horas antes del experimento (Kitchen, 1984).

1.7.3 MÚSCULO LISO DE LA VEJIGA URINARIA

La vejiga está formada por dos tipos de músculos lisos. Uno de ellos es el detrusor, que es el músculo que forma la pared de la víscera y su contracción promueve la expulsión de la orina y el vaciamiento de la vejiga. El segundo músculo es el trígono, quien hace las veces de esfínter, permitiendo la salida de la orina hacia la uretra y los uréteres cuando se relaja, y el llenado adecuado mientras está contraído. Los dos músculos lisos reciben una regulación externa a cargo del sistema nervioso autónomo, que mediante la rama parasimpática dispara simultáneamente la contracción del detrusor y la relajación del trígono para promover la micción. Por otra parte, la activación de la vía simpática promueve los efectos opuestos durante los períodos de llenado de la vejiga.

Estos músculos lisos tienen un potencial de membrana característico, regulado por diversas corrientes iónicas. En el detrusor juegan un rol importante los canales de K^+ dependientes de voltaje y de Ca^{2+} , conocidos como "big channels" por su gran conductancia (BK, BKCa, MaxiK, Slo1, o KCa1.1). Los canales BK controlan la excitabilidad y contractilidad del detrusor, manteniendo el potencial de reposo (E_m) y dando forma a la fase de repolarización de los potenciales de acción espontáneos que determinan la automaticidad o ritmo contráctil espontáneo, y la activación por distensión. En el detrusor, estos canales tienen complejos mecanismos regulatorios que involucran señales integradas de Ca^{2+} intracelular, proteinquinasas, fosfodiesterasas, y estrechas interacciones funcionales con los receptores muscarínicos que inician la contracción, y los β -adrenérgicos que disparan la relajación. En algunas patologías de la vejiga como la hiperactividad del detrusor, está implicada una alteración del canal BK (Petkov, 2014).

1.8 ESTUDIOS DE CONDUCTA EN RATONES

Los estudios de fármacos que tienen efectos sobre la conducta (estimulación, sedación, ansiolisis, etc.) se realizan tradicionalmente en ratones, por ser animales con gran actividad espontánea de locomoción y exploración. Han sido validados en la bibliografía internacional mediante el uso de fármacos con las respectivas actividades (control positivo) y en comparación con la actividad en ratones tratados con el vehículo o solución fisiológica (control negativo) (Wikinski, 2017).

Los tests empleados en la presente tesis responden a los siguientes fundamentos:

1.8.1- TEST DE CAMPO ABIERTO

Permite evaluar el comportamiento espontáneo de movilidad o locomoción, y de exploración. Los sedantes reducen ambas actividades, mientras los fármacos estimulantes los aumentan.

1.8.2- TEST DEL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO

Permite evaluar actividad ansiolítica. Se basa en el comportamiento natural de preferencia del ratón, que deambula durante más tiempo en las ramas oscuras y protegidas del laberinto (control negativo). Sin embargo, el tratamiento con un fármaco ansiolítico le reduce la aprehensión natural, por lo que se aventura a los espacios abiertos del laberinto (conducta desinhibida).

1.8.3- TEST DE SUPRESIÓN DEL ALIMENTO

Permite evaluar actividad ansiolítica. Se basa en que el ratón hambriento tendrá cierta demora en alimentarse cuando se le presenta el alimento en una zona iluminada y abierta (conflicto entre satisfacer su necesidad y enfrentar la aprehensión de un ambiente de peligro). El ansiolítico reduce el tiempo en que el ratón se alimentará, por disminuir esa aprehensión (conducta desinhibida).

1.9 HIPÓTESIS DE TRABAJO PARA LA TESIS

A- Considerando los usos medicinales tradicionales del lúpulo, y la composición fitoquímica rica en flavonoides, se hipotetiza que el extracto de lúpulo puede tener las siguientes actividades farmacológicas:

- a) actividad antiespasmódica en músculo liso visceral,
- b) actividad ansiolítica y/o sedante

B- La actividad farmacológica depende de la presencia de flavonoides en la “huella digital” obtenida por HPLC.

C- Es posible encontrar características micrográficas para caracterizar las muestras botánicas.

2. OBJETIVOS DE LA TESIS



2.1 OBJETIVOS GENERALES

- a) Estudiar las bases farmacológicas del uso tradicional de las partes aéreas, incluyendo las inflorescencias femeninas, de *Humulus lupulus* L., como antiespasmódico y sedante.
- b) Evaluar el perfil fitoquímico que caracteriza la muestra y determina las actividades farmacológicas.
- c) Efectuar estudios morfológicos y anatómicos de las hojas y bracteolas para caracterizar elementos de diagnóstico, a fin de asegurar la correcta identificación de la especie fundamentalmente cuando se encuentra en polvo o fragmentada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudiar la actividad antiespasmódica del extracto acuoso de *Humulus lupulus* en sistemas *ex vivo* como los preparados de músculo liso aislado de rata (intestino, vejiga y útero), y el mecanismo de acción.
- b) Evaluar en sistemas *in vivo* la posible actividad ansiolítica/sedante en ratones.
- c) Identificar la presencia de fitoestrógenos, isoflavonas y otros flavonoides en muestras comerciales de *H. lupulus*.
- d) Analizar las características micrográficas de las partes aéreas incluyendo las inflorescencias femeninas, de muestras comerciales de *H. lupulus*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 MATERIAL VEGETAL

Para los estudios fitoquímicos, farmacológicos y anatómicos, se utilizaron partes aéreas (**pa**) de lúpulo (hojas, tallos, brácteas, conos) adquiridas en la Farmacia Homeopática Argentina, de la ciudad de La Plata (provincia de Buenos Aires, Argentina) e inflorescencias femeninas (**f**) enteras procedentes de un cultivo de lúpulo de las afueras de La Plata (Los Hornos), colectadas en noviembre de 2021, frescas y luego secadas al aire. También se trabajó con polvo de las inflorescencias de lúpulo cultivado en la ciudad de El Bolsón, provincia de Río Negro, Patagonia Argentina (Variedad Cascade en flor), producido para fines comerciales (lote 01 de la cosecha 2019, conteniendo 9 % de ácidos alfa según lo informado en el envase correspondiente como se muestra en la Figura 10).

El estudio botánico se realizó sobre el material fresco de la plantación de lúpulo de la ciudad de La Plata.

Los estudios farmacológicos de CCR en tejidos viscerales de rata se hicieron con tintura de la muestra de lúpulo adquirido en la Farmacia Argentina de la ciudad de La Plata.

Los estudios *in vivo* en ratones se hicieron con tintura a partir de las inflorescencias de lúpulo de El Bolsón, y con extracto acuoso del lúpulo colectado en las afueras de La Plata.

El material vegetal fue caracterizado en el área de Botánica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, de la Universidad Nacional de La Plata.

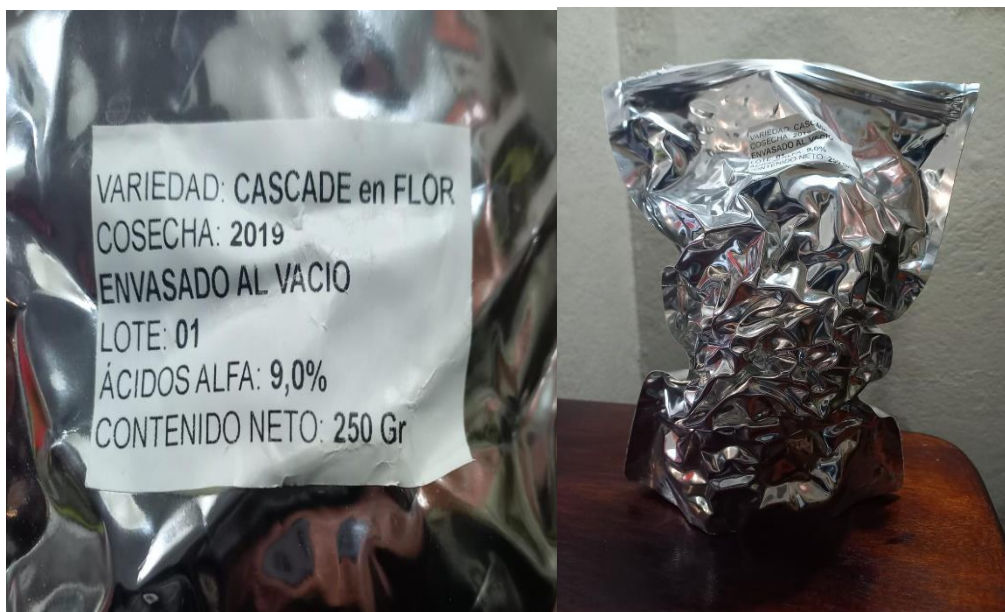


Figura 10. Material correspondiente a lúpulo procedente de El Bolsón, provincia de Río Negro, Patagonia Argentina (Foto de Lucía Lojano Gutierrez).

3.2 EXTRACTOS PARA ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS

3.2.1 PREPARACIÓN DE LA TINTURA MADRE DE LÚPULO

La tintura madre (Tm) se preparó a partir de 3 muestras: partes aéreas adquiridas en farmacia homeopática de la ciudad de La Plata, inflorescencias desecadas colectadas en la ciudad de La Plata, y flores de la variedad Cascada en Flor provenientes de El Bolsón.

Para la preparación de Tm al 10 % de la respectiva muestra de *Humulus lupulus*, se pesaron 10 g del material vegetal. El mismo fue triturado en un mortero, se trasladó a un envase color ámbar, se le agregó 100 ml de etanol 70° y se dejó en maceración a temperatura ambiente, por un periodo de 48 h. Posteriormente los extractos fueron filtrados. El rendimiento de esta tintura se calculó por evaporación y pesado, resultando ser en promedio de 27,4 % p/p (g extracto seco/g droga seca). Dado que la tintura original (10 % p/v) fue diluida para realizar los experimentos farmacológicos, los resultados de concentración

de la tintura se expresan en masa de lúpulo por mililitro de solución en las CCR (y/o en % p/v), y en base a este rendimiento fueron convertidos a masa del extracto seco por mililitro de solución en la leyenda de cada figura.

3.2.2 PREPARACIÓN DE LA DECOCCION DE LÚPULO

La preparación del extracto acuoso se realizó mediante una decocción al 5 % p/v de dos tipos de muestra: inflorescencias desecadas (origen La Plata) y la muestra de inflorescencias (origen El Bolsón) de *Humulus lupulus*, para lo cual se pesaron 5 g previamente triturados en un mortero de la droga vegetal. En un envase se agregaron 100 ml de agua destilada, y se lo mantuvo en ebullición suave durante 20 minutos (evitando evaporación con un vidrio de reloj sobre el Erlenmeyer). Finalmente se dejó enfriar y luego se filtró.

Los extractos (tintura y decocción) se prepararon según las directrices de la Farmacopea Argentina, VII Ed. En la **Figura 11** se observan detalles iniciales del proceso de extracción.



Figura 11. Proceso de extracción de tintura madre e infusión.

3.3 ANIMALES EMPLEADOS EN LOS ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS

Los animales utilizados fueron ratas Wistar (para el estudio de la actividad antiespasmódica) y ratones Swiss (para el estudio de los efectos en conducta). Todos ellos fueron mantenidos en el bioterio de la cátedra de Farmacología bajo un ambiente estandarizado acorde a las necesidades de los animales y condiciones controladas de 12 h luz –12 h oscuridad, a 24 °C, y con alimento y agua *ad libitum*, a menos que el ensayo a realizar tuviera algún requerimiento específico en cuanto a este aspecto.

El manejo de los animales de experimentación se realizó bajo los principios y normas internacionales, publicados en la guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (publicación del NIH #85-23 revisado en 1985). La eutanasia y los procedimientos realizados en cada uno de los ensayos utilizados fueron aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Los protocolos autorizados fueron los siguientes:

N°001-29-18 (Protocolo para el estudio farmacológico de plantas medicinales en preparados aislados de músculo liso intestinal, vesical y uterino de rata), el cual fue seguido para la realización de las curvas concentración-respuesta en duodeno e íleon, útero y vejiga aislados de rata.

N° 005-29-18 (Protocolo para el estudio farmacológico de extractos de plantas medicinales en el comportamiento en ratones), el cual fue seguido para la realización de los test para evaluar actividad sedante y ansiolítica.

3.4 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA

Para obtener los órganos aislados, se utilizaron ratas Wistar de 200-250 g de peso, de ambos sexos. Previo ayuno de 12 horas, los animales fueron sacrificados con sobredosis de pentobarbital (40 mg/kg vía intraperitoneal) y analgesia profunda con tramadol (10-20 mg/kg S.C.). Luego se procedió a

extraer el intestino delgado (duodeno e íleon), la vejiga y el útero, según correspondía.

La actividad antiespasmódica se evaluó en estudios *ex vivo* mediante curvas de concentración-respuesta (CCR) del agonista muscarínico carbacol (Cbl), en ausencia y presencia de diversas concentraciones del extracto alcohólico (tintura) de lúpulo. Para evaluar los efectos de las tinturas a nivel de los canales de calcio del músculo liso intestinal de rata, se efectuaron protocolos de CCR de calcio en medio despolarizante de alta $[K^+]$ (40 mM), en ausencia y presencia de diversas concentraciones del extracto de lúpulo.

3.4.1 SOLUCIONES Y DROGAS EMPLEADAS

Solución Tyrode (concentraciones en mM): 8,0 NaCl, 2,0 KCl, 2,6 $MgCl_2$, 1,0 $NaHCO_3$, 1,3 NaH_2PO_4 , 1,0 glucosa, 1,8 $CaCl_2$ para intestino. El burbujeo se efectuó con aire lo cual determina un pH de 8,2 que es considerado el óptimo para el intestino aislado (Livingstone y Livingstone, 1970; Hamada y col., 1997; Ragone *et al.*, 2007).

Tyrode sin Calcio (0- Ca^{2+}): misma composición de la solución Tyrode, pero sin el agregado de $CaCl_2$.

Tyrode 0- Ca^{2+} - 40 mM K^+ : con agregado de 0.6 ml de solución de KCl al 10 % en la cuba de 20 ml de Tyrode 0- Ca^{2+} .

Solución De Jalon para tejido uterino (en mM): 9,0 NaCl, 0,5 $NaHCO_3$, 0,5 glucosa, 0,4 KCl, 0,1 $CaCl_2$, burbujeo con aire (Kitchen, 1984; Gavilanez-Buñay *et al.*, 2018).

Soluciones para las curvas concentración-respuesta de carbacol: se preparó una solución madre de 2000 $\mu g/ml$ de carbacol, a partir de la cual se realizaron diluciones con el fin de obtener las siguientes concentraciones: 1, 2, 7, 20, 70, 200, 700 y 1000 $\mu g/ml$. De ellas se agregó sucesiva y acumulativamente 0,2 ml de cada concentración en 20 ml de Tyrode (dilución 1/100 en la cuba).

Soluciones para las curvas concentración-respuesta de Calcio: Se preparó una solución madre de 500 µg/ml de CaCl₂ a partir de la cual se realizaron diluciones con el fin de obtener las siguientes concentraciones: 0,882, 1,75, 5,3, 18,5, 56, 186 µg/ml que se agregaron sucesiva y acumulativamente a razón de 0,2 ml de cada concentración en 20 ml de Tyrode 0-Ca²⁺-40 mM K (dilución 1/100 en la cuba).

Vehículo etanólico: solución de etanol 70° sin el agregado de la droga vegetal en estudio. Luego se diluyó en igual proporción que la tintura para evaluar su efecto en las CCR.

Tintura madre de lúpulo (TM): se diluyó la TM al 20 % en agua destilada con concentraciones resultantes de 1, 3, 10, 25 mg de droga seca/ml, de las cuales se agregó secuencialmente un volumen de 0,2 ml a la cuba conteniendo 20 ml de Tyrode, en las CCR de carbacol y Calcio (dilución 1/100 en cuba).

3.4.2 PREPARADOS BIOLÓGICOS EX VIVO

3.4.2.1 INTESTINO AISLADO DE RATA

Una vez sacrificada la rata se aislaron los duodenos e íleons, se cortaron trozos de aproximadamente 2 o 3 cm de longitud, se colocaron en cubas de doble camisa termostatizadas a 37 °C conteniendo 20 ml solución Tyrode y burbujeo constante de aire, a pH 8,2 (Livingstone y Livingstone,1970; Ragone *et al.*, 2007).

Los trozos de intestino se montaron longitudinalmente en cada cuba, el extremo inferior fue sujetado a un soporte fijo, mientras que el extremo superior se conectó mediante un hilo de cirugía a un transductor de fuerza isométrico (WPI Instruments, USA) con el fin de registrar la tensión desarrollada por los órganos. La señal eléctrica (en voltios) fue amplificada (WPI, USA) y registrada en la computadora a través del programa Eagle ® (USA).

3.4.2.2 VEJIGA AISLADA DE RATA

En las mismas ratas empleadas para extraer el intestino delgado, se extirpó la vejiga entera, la cual fue cortada longitudinalmente en 2 porciones que se montaron en respectivas cubas para baño de órgano. Se utilizó la misma solución Tyrode que aquella empleada para intestino aislado, a 37 °C, a pH 8,2 (Livingstone y Livingstone, 1970; Gavilanez Buñay *et al.* 2018).

El extremo correspondiente a la base de la vejiga se ligó a un soporte fijo inferior, y el extremo superior se ligó mediante hilo de cirugía conectado a un transductor de fuerza. De esta forma, se detectó la contracción producida por el músculo detrusor, estimulado mediante agonistas colinérgicos.

3.4.2.3 ÚTERO AISLADO DE RATA

En ratas hembra, además del intestino aislado se extirparon los 2 cuernos uterinos, los cuales fueron separados y montados en respectivas cubas de órgano conteniendo 20 ml de solución de Jalon a 34 °C (Bernal-Ochoa y *et al.* 2021). Esta solución posee baja $[Ca^{2+}]$ por lo cual reduce la actividad de grandes ondas contráctiles propias del útero.

3.4.3 CURVAS CONCENTRACIÓN – RESPUESTA (CCR) DE CARBACOL

Para el estudio de la actividad antiespasmódica de los extractos de la especie en estudio se realizaron curvas concentración-respuesta acumulativas, metodología que ha sido descrita previamente por el grupo de trabajo (Ragone *et al.*, 2007).

Luego de un periodo de estabilización, en cada preparado se efectuaron dos curvas control (en ausencia de tintura y/o vehículo) con el agregado de 0,2 ml de cada concentración de carbacol en orden creciente (0,01, 0,02, 0,07, 0,1, 0,2, 0,7, 2 µg/ml solución Tyrode), hasta obtener la máxima respuesta contráctil (efecto máximo, Emáx). El Emáx de la segunda CRC fue considerado como

referencia (100 %) para calcular la respuesta porcentual de cada una de las concentraciones agregadas.

Posteriormente a las CCR control, se realizó una CCR con 0,2 ml del vehículo etanólico en dilución similar a la de mayor concentración de tintura (1:8 o alrededor de 9 % de etanol) para cada preparado. A continuación, en cada preparado se realizaron curvas con concentraciones únicas de la tintura de lúpulo, agregando 0,2 ml de cada dilución de la serie desde la de menor a la de mayor concentración. La tintura se agregó 5 minutos previos a la realización de la CCR y se mantuvo el extracto en contacto durante la misma. Las CCR fueron analizadas referidas al Emáx del control inicial o del vehículo según corresponda.

3.4.4 CURVAS CONCENTRACIÓN – RESPUESTA (CCR) DE CALCIO

Previamente se realizó una estabilización de los preparados de órgano aislado en medio de Tyrode con Ca^{2+} , constatando la respuesta contráctil a carbacol. Posteriormente, se reemplazó con medio de Tyrode 0- Ca^{2+} , para iniciar las CCR control de calcio. Una vez estabilizado el tejido sin calcio, se agregaron 0,6 ml de la solución de KCl al 10 % para llevar la concentración de potasio a 40 mM, y se realizó la respectiva CCR de Ca. Para ello, se adicionaron sucesivamente 0,2 ml de cada concentración de Ca^{2+} , en orden creciente (ver la serie en el punto sobre Soluciones), hasta registrar el Emáx (100 %). Se realizaron curvas sucesivas en presencia del respectivo vehículo, y de concentraciones únicas de la tintura de lúpulo, en orden creciente de concentración. El esquema de tratamiento con el vehículo y la tintura fue similar al empleado en las CCR de carbacol.

Las CCR se analizaron referidas al Emáx, obtenido en las curvas control o vehículo según corresponda, como fue descripto antes (Ragone *et al.*, 2007; Gavilanez Buñay *et al.*, 2018; Bernal-Ochoa *et al.*, 2021).

3.5 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CENTRAL

Se evaluó el efecto de los extractos de lúpulo en dos pruebas de conducta:

- a) la actividad espontánea locomotora y exploratoria de ratones en el test de campo abierto.
- b) la actividad ansiolítica en el test de supresión de alimento, y en el test de laberinto en cruz elevada.

3.5.1 SOLUCIONES Y DROGAS EMPLEADAS

Controles negativos:

Solución fisiológica (SF), solución estéril de cloruro de sodio al 0,9 % (p/v).

Extracto etanólico de lúpulo (tintura al 20 % p/v) diluido a diversas dosis.

Controles positivos:

Diazepam (Roche ®, Argentina): a partir de ampollas de 10 mg/2 ml, se administraron las dosis de 0,3 y 1 mg/kg (para prueba de campo abierto), y se administró una dosis de 0,3 mg/kg (para tests de ansiolisis, de supresión de alimento y laberinto en cruz).

3.5.2 TEST DE CAMPO ABIERTO EN RATONES

El test conocido como “open-field” (OF) se realizó utilizando una caja blanca de 30 x 50 cm, con paredes de 27 cm de alto, el piso de la caja dividido en 15 cuadrados de 10 x 10 cm, trazados con líneas negras, en condiciones de baja luminosidad.

Los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos, con seis individuos cada uno, a los cuales se les inyectaron vía i.p. 0,1 ml por cada 30 g de peso del ratón, de los siguientes tratamientos

- 1) solución fisiológica (control negativo), y vehículo etanólico (etanol de 70°)
- 2) diazepam, dosis 0,3 mg/kg (control positivo ansiolítico)
- 3) diazepam, dosis 1 mg/kg (control positivo sedante)
- 3) extracto etanólico de lúpulo al 1 % del cultivo de La Plata, dosis de 33 mg/kg
- 4) extracto etanólico de lúpulo al 3 % del cultivo de La Plata, dosis de 100 mg/kg
- 5) extracto etanólico de lúpulo al 10 % del cultivo de La Plata, dosis de 330 mg/kg

En otra serie se comparó la actividad de una decocción de lúpulo proveniente de la muestra de conos de lúpulo de la Patagonia (empleada en la elaboración de la cerveza), ensayando los siguientes grupos

- 1) solución fisiológica (control negativo)
- 2) diazepam, dosis 1 mg/kg (control positivo sedante)
- 3) extracto acuoso de lúpulo al 1 %, dosis de 33 mg/kg de lúpulo de El Bolsón
- 4) extracto acuoso de lúpulo al 3 %, dosis de 100 mg/kg de lúpulo de El Bolsón
- 5) extracto acuoso de lúpulo al 10 %, dosis de 330 mg/kg de lúpulo de El Bolsón

Cada animal se colocó en un extremo de la caja, permitiendo su libre exploración durante 5 minutos, se grabó en videocámara con el fin de analizar de forma simultánea los comportamientos de locomoción y exploración espontáneas. A saber:

- a) Locomoción espontánea, a partir del número de líneas cruzadas por ambas patas delanteras del ratón.

- b) Actividad exploratoria, mediante el conteo del número de veces que el ratón mantuvo su cuerpo erguido apoyado sobre sus patas traseras.
- c) Número de acicalamientos como estimación de la emocionalidad.

La medición fue repetida cada 30 minutos para cada ratón. Se efectuó la primera medida (tiempo 0) antes de inyectar el extracto con el fin de analizar su comportamiento basal. Luego de la inyección se realizaron cuatro medidas a los 30, 60, 90 y 120 minutos, respectivamente (Ragone *et al.*, 2010).

3.5.3 TEST DE SUPRESIÓN DEL ALIMENTO

Los ratones con previo ayuno de 24 horas se colocaron individualmente en pequeñas cajas-casa, para habituarlos durante 30 min y administrarles las soluciones a inyectar vía i.p. Después de 1 h, cada ratón se colocó en la misma esquina de una caja de madera de 40 × 40 × 30 cm, la cual contenía en su centro un papel de filtro circular blanco de 11 cm de diámetro con un simple “pellet” de alimento en su centro. Se midió el tiempo de latencia que el ratón demoró para acercarse e iniciar la alimentación. Inmediatamente antes de que coma el primer bocado, el ratón fue dispuesto en su caja-casa individual con un único pellet previamente pesado. La actividad ansiolítica está en relación inversa con el tiempo de latencia. Después de 5 min se pesó el mismo pellet, y por diferencia se calculó la cantidad de alimento consumida por el ratón (Jung *et al.* 2014). Finalmente, los ratones se volvieron a colocar en la gran casa-jaula compartida, con agua y alimento ad libitum. Se evaluaron los siguientes grupos:

- 1) Solución fisiológica.
- 2) Vehículo (etanol de 70°) como control negativo.
- 3) Diazepam (0,3 mg/kg) fue usado como compuesto de referencia o control positivo de ansiolítico.
- 4) Tintura de conos de lúpulo de El Bolsón (33 mg lúpulo/kg).
- 5) Tintura de conos de lúpulo de El Bolsón (100 mg lúpulo/kg).

3.5.4 TEST DEL LABERINTO EN CRUZ ELEVADA (TLCE)

El LCE consistió en una cruz de madera negra ubicada a una altura de 50 cm, compuesto de 2 brazos con paredes de 15 cm de alto ubicadas enfrentadas entre sí (ramas cerradas), y las otras 2 ramas sin paredes (ramas abiertas). Cada brazo medía 5 x 30 cm y la zona central 5 x 5 cm. Cada ratón, al que se le administró 30 min antes la solución a ensayar por vía i.p., se ubicó en la zona central, permitiendo la libre exploración durante 5 min. La entrada a cada brazo se consideró cuando las 4 patas estaban dentro de éste. Se calculó el número de veces que el ratón entraba a los brazos abiertos y a los cerrados, y el tiempo total de permanencia en cada brazo (Wasowski y Marder, 2011). El laberinto se limpiaba con alcohol y algodón seco entre cada uno de los ratones. Permite evaluar actividad ansiolítica cuando los ratones aumentan su permanencia en las ramas abiertas.

Se ensayaron los siguientes tratamientos:

1. Tintura de conos de lúpulo del cultivo de La Plata al 1 % (dosis 33 mg/kg).
2. Tintura de conos de lúpulo del cultivo de La Plata al 0,75 % (dosis 25 mg/kg).
3. Diazepam 0,3 mg/kg.
4. Vehículo etanólico en solución fisiológica.

3.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Todos los datos obtenidos se expresaron como media $\pm$ ESM (n).

Los datos obtenidos de las CCR de carbacol y calcio fueron analizados con el programa Graph Pad Prisma versión 8.01. Para comparar las respectivas CCR se utilizó el método estadístico ANOVA de dos vías considerando como variables el tratamiento y log [agonista]. Se realizaron las comparaciones

múltiples a posteriori con la CCR control mediante los post-test de Tukey. En todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Los datos obtenidos de las pruebas de comportamiento se analizaron con el programa Graph Pad Prisma versión 8.01, utilizando el método estadístico ANOVA de 1 vía seguido por el test de Dunnett, considerando para todos los casos un nivel de significancia de $p < 0.05$.

3.7 METODOLOGÍA PARA ESTUDIOS BOTÁNICOS

Para los estudios botánicos se estudió material vegetal de la colección del Herbario LPAG de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Plata, indexado en "The Herbaria of the world" (Holmgren *et al.*, 1990).

Una muestra de las inflorescencias desecadas empleadas en esta tesis, se depositó en el Herbario del Museo de Botánica y Farmacognosia, "Carlos Spegazzini" (LPE) de la Facultad de Ciencias Exactas UNLP.

Los resultados de estos estudios se compararon con una muestra comercial de lúpulo adquirida en una farmacia de la ciudad de La Plata.

3.7.1. MATERIAL ESTUDIADO: ARGENTINA

Humulus lupulus L. Provincia de Buenos Aires, Partido La Plata, Facultad de Agronomía, UNLP, 1951, Montaldi 333 (LPAG).

3.7.2 MICROSCOPIA ÓPTICA

El material de herbario se hidrató durante 72 h en agua más una gota de detergente, en estufa a 25-30 °C y se conservó en una solución de formaldehído, ácido acético y alcohol etílico al 70 % (FAA 70) (Johansen, 1940). El mismo procedimiento se usó para el material proveniente de la muestra comercial.

Se estudiaron los caracteres topográficos del tejido epidérmico de hojas en completo estado de desarrollo y de las bractéolas de las inflorescencias pistiladas, logrando la clarificación (transparencia) del material vegetal empleando dos técnicas de diafanización: la técnica de Dizeo de Stritmatter (1978) y la técnica de Arambarri (2018). Esta última se aplicó para lograr la diafanización de las bractéolas.

3.7.3 TÉCNICA DE DIZZEO DE STRITMATTER

1. El material previamente fijado en FAA, se coloca en un vaso de precipitado con alcohol de 96° y se lleva a ebullición 10 minutos.
2. Transcurrido ese tiempo se pasa a una solución de alcohol de 96° y NaOH al 5 % en partes iguales. Se lleva a ebullición durante 1 minuto.
3. Se efectúan varios lavados hasta que el agua queda totalmente limpia.
4. El material lavado se introduce en una solución de NaClO al 50 % y se deja hasta tornarse transparente.
6. El material transparente se lava con agua destilada hasta la desaparición completa de restos de hipoclorito.
7. El material se coloca en hidrato de cloral (5 g en 100 ml de agua destilada) el tiempo necesario hasta quitarle opacidad.
8. El material transparente de hoja fue lavado, coloreado con solución alcohólica de safranina O al 80 % y montado con gelatina glicerina (Zarlavsky, 2018).

3.7.4 TÉCNICA DE ARAMBARRI

1. En un pote de vidrio se vierten los reactivos hidróxido de sodio al 5 % e hipoclorito de sodio al 5 % en partes iguales (1: 1).
2. Con una pinza se toma el material y se sumerge en la solución de reactivos.

3. El recipiente tapado, rotulado y sin agitar se mantiene a temperatura ambiente, realizando el control visual de la decoloración del material.

4. Cuando el material se ha decolorado, con la pinza, se extrae del recipiente y se somete al lavado. El lavado se hace mínimo dos veces, en agua común o agua destilada ya que luego se lo pasa a otra caja de Petri conteniendo hipoclorito de sodio al 50 % donde se completa la decoloración, generalmente en unos segundos o minutos. El material totalmente decolorado se lava 3-5 veces, en cajas de Petri, por lo menos los tres últimos lavados con agua destilada.

5. Una vez lavado se sumerge en una solución de hidrato de cloral al 5 % que se ha vertido en otra caja de Petri que se tapa, rotula y deja como mínimo 24 horas.

El material clarificado se tiñó con una solución de safranina alcohólica al 80 % siguiendo la técnica de tinción simple (Zarlavsky, 2018) y se montó en gelatina glicerina.

Las observaciones de ambas epidermis foliares, así como las bractéolas de la inflorescencia pistilada y las microfotografías se efectuaron con un microscopio óptico Gemalux equipado con una cámara color PAL CCD.

La terminología y tipos de estomas están de acuerdo con Metcalfe y Chalk (1979).

3.8 METODOLOGIA PARA ANALISIS FITOQUIMICOS

Los estudios se realizaron mediante una estadía de investigación, en los laboratorios de Farmacognosia y Química Biológica II, del Grupo de Investigación en Química, Bioactividad y Metabolismo de Recursos Naturales Patagónicos (GQBMRNP) y del Laboratorio de Cromatografía e Instrumental

(LACROMI – AAI), perteneciente al Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico (CRIDECIT), Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud (FCNyCS) de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), Comodoro Rivadavia, Chubut, lugar de trabajo del codirector de esta tesis Dr. Osvaldo León Córdoba.

3.8.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las drogas vegetales utilizadas fueron partes aéreas (**pa**) adquiridas en la Farmacia Homeopática de la ciudad de La Plata e inflorescencias femeninas secas (**fl**) procedentes de un cultivo de lúpulo de El Bolsón, Provincia de Río Negro.

- Las partes aéreas (**pa**) fueron reducidas a polvo mediante un molino de paletas provisto de un tamiz de malla 20 (**Figura 12**).
- Las inflorescencias se secaron y luego fueron trituradas en un mortero debido a la adherencia del material (**Figuras 13 y 14**).



Figura 12. Molino de paletas con tamiz de malla 20 (GQBMRNP - CRIDECIT, FCNyCS, UNPSJB, Foto de Lucía Lojano Gutierrez).



Figura 13. Secado de Inflorescencias de lúpulo a temperatura ambiente, bajo techo y al abrigo de la luz (GQBMRNP - CRIDECIT, FCNyCS, UNPSJB, Foto de Lucía Lojano Gutierrez).



Figura 14. Trituración de inflorescencias secas de lúpulo en mortero (GQBMRNP - CRIDECIT, FCNyCS, UNPSJB, Foto de Lucía Gutierrez).

3.8.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

3.8.2.1 EXTRACCIÓN CON ETANOL DE 70°

Se prepararon extractos con etanol de 70° mediante maceración a temperatura ambiente durante 24 h, de las partes aéreas y de las inflorescencias, empleando 35 g de la droga en cada caso y 200 ml de etanol de 70° para las partes aéreas (**pa**) y 300 ml de etanol de 70° para las flores (**fl**). Los extractos se separaron de los marcos correspondientes mediante centrifugación refrigerada empleando un rotor que permitió centrifugar a 10000 r.p.m. (**Figura 15**). Los extractos se denominaron **EOLpa** y **EOLfl**, respectivamente. Los marcos fueron secados a temperatura ambiente y pesados. Los extractos se concentraron en un evaporador rotatorio a presión reducida (Büchi), se llevaron a sequedad en una estufa de vacío y se pesaron a fin de obtener los rendimientos de la extracción etanólica en cada caso.



Figura 15. Centrifuga refrigerada utilizada para recuperar los extractos de lúpulo de los correspondientes marcos (GQBMRNP - CRIDECIT, FCNyCS, UNPSJB, foto: Carmita Lucía Lojano Gutierrez).

3.8.2.2 EXTRACCIÓN ACUOSA

Se efectuó mediante **infusión** tratando 10 g de las partes aéreas y 10 g de las inflorescencias procesadas como se indicó anteriormente, con 200 ml de agua recién hervida previamente durante 5 min, al 5 % p/v, durante 20 minutos.

Posteriormente los infusos así obtenidos se recuperaron tras centrifugación refrigerada y se secaron mediante liofilización (**Figura 16**).



Figura 16. Preparación de extractos mediante Infusión de las partes aéreas y las flores de *Humulus lupulus* (Cannabaceae). (GQBMRNP, CRIDECIT, FCNyCS, UNPSJB, foto de Lucía Lojano Gutierrez).

3.8.2.3 EXTRACCIÓN CON CLOROFORMO

Dos gramos de cada muestra se trataron con 30 ml de cloroformo durante 2 h a temperatura ambiente, con agitación magnética. Posteriormente se filtraron y se llevaron a seco a temperatura ambiente.

3.8.2.4 EXTRACCIÓN CON ÉTER ETÍLICO

Un gramo tanto de las pa como las fl se maceraron con 15 ml de éter etílico durante 2 h a temperatura ambiente, se filtraron y llevaron a seco a temperatura ambiente durante 24 horas.

3.8.2.5 EXTRACCIÓN MEDIANTE DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR DE AGUA

Las fl de lúpulo fueron colocadas en el equipo destilador y sometidas a extracción mediante arrastre con vapor de agua. El aceite esencial y el agua

aromática resultante fueron colectados una vez separadas las fases naturalmente.

3.8.2.6 RENDIMIENTO

Se pesó cada extracto seco y se calculó el rendimiento en base al peso de la muestra inicial sometida a la correspondiente extracción. Por otro lado, los marcos fueron también secados a temperatura ambiente y pesados.

3.8.2.7 RECONSTITUCIÓN DE LOS EXTRACTOS PARA ESTUDIOS POSTERIORES

Se pesaron 10 mg de cada extracto seco y se retomaron con 10 ml del mismo solvente empleado para su extracción nuevamente.

3.9 CARACTERIZACION QUIMICA

Cada extracto seco “etanólico infusión, clorofórmico, éter etílico”, una vez pesado para determinar el rendimiento, se trabajó de la siguiente forma:

- a) Se pesaron 10 mg y se retomaron con 10 ml de etanol 96°.
- b) Se pesaron 10 mg y se retomaron con 10 ml de agua destilada.
- c) Se pesaron 10 mg y se retomaron con 10 ml de cloroformo.
- d) Se pesaron 10 mg y se retomaron con 10 ml de éter etílico.

Sobre los extractos retomados en los solventes indicados, se realizaron las reacciones cualitativas clásicas y usuales para la caracterización de grupos químicos (Rondina y Coussio, 1989; Harborne, 1991; Pinto Vitorino *et al.*, 2004), las cuales se detallan a continuación.

3.9.1 HIDRATOS DE CARBONO: REACCIÓN DE MOLISCH (A- NAFTOL EN ETANOL AL 10 % P/V)

Se colocó en tubos de ensayo, 1 ml de cada muestra preparada según se indicó en a) y en b); se les agregaron 2 gotas del reactivo y cuidadosamente por las paredes del tubo, 0,2 ml de H₂SO₄ concentrado.

La observación en la interfase de un anillo de color púrpura violáceo, es indicativa de la presencia de hidratos de carbono.

3.9.2 FLAVONOIDES: REACCION DE SHINODA

A 1 ml de cada muestra obtenida según se indicó en a) y en b), dispuestos en tubos de ensayo, se agregó una punta de espátula de zinc en polvo y 0,5 ml de HCl concentrado. Se observó la aparición de color, siendo positivo desde rosa muy tenue hasta púrpura.

3.9.3 HIDROXILOS FENOLICOS: REACCIÓN CON FeCl₃ AL 1-2 %

Se dispusieron gotas de las muestras retomadas según se indicó en a) y en b) sobre un papel de filtro, se secaron y luego se agregaron gotas de una solución de FeCl₃ al 1-2 %. Se anotaron las observaciones correspondientes. La aparición de color amarillo indica presencia de OH fenólicos aislados; de color verde grisáceo, 2 OH fenólicos adyacentes; de color azul negruzco, 3 OH fenólicos adyacentes.

3.9.4 QUINONAS: REACCION DE BORNRÄGER

De la muestra retomada como se indicó en c), se tomaron 3 alícuotas de 1 ml cada una, se dispusieron en tubos de ensayo y se procedió de la siguiente forma:

En la primera alícuota, se agregó directamente 1 ml del reactivo de Bornträger (NaOH al 5 %). Se observó el color de la fase acuosa. Detecta la presencia de antraquinonas libres y oxidadas (antraquinonas propiamente dichas). Resultado (+): fase acuosa roja, amarilla o amarilla anaranjada con fluorescencia roja.

En la segunda alícuota, previamente llevada a seco, se agregó unas gotas de ácido nítrico fumante; a continuación, se añadió 1 ml del reactivo de Bornträger y se dejó unos minutos para que se mezclen gradualmente. La aparición de color

rojo en un tiempo no mayor a 30 minutos, indica el resultado positivo. Detecta la presencia de derivados de antraquinonas reducidos.

En la tercera alícuota, previamente llevada a seco, se agregó 1 ml de HCl al 1-2 % y 1 ml de FeCl₃ al 2 %, y se calentó a Baño María (100 °C) durante media hora. Posteriormente se agregaron 2 ml de cloroformo, se separó la fase orgánica y a esta última se le agregó 1 ml del reactivo de Bornträger. Se observó la aparición de color rojo, pardo amarillento o anaranjado en la fase acuosa alcalina. Detecta la presencia de dímeros (y/o de C-glicósidos si se tratara de un extracto o fracción de mayor polaridad). Para informar un resultado negativo se deja en reposo hasta 48 h.

3.9.5 ESTEROIDE / TRITERPENOS: REACCIÓN DE LIEBERMANN-BURCHARD

Se mezcló 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, se enfrió a 0 °C y se añadió igual volumen a cada muestra a analizar retomada como se indicó en c) y dispuesta en un tubo de ensayo, también enfriada y mantenida en baño de hielo a 0 °C. Luego por las paredes del tubo se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado previamente enfriado en baño de hielo. Se volvió a poner el tubo en hielo hasta evidenciar la aparición de color. Color verde azulado hasta verde petróleo indica esteroides; color naranja amarillento, rojizo hasta pardo amarronado indica triterpenos.

3.9.6 ALCALOIDES: REACTIVO DE DRAGENDORFF, Bi (NO₃)₃ en HNO₃-KI EN AGUA DESTILADA

A 1 ml de la muestra retomada como se indicó en c) y llevada a seco, dispuesta en tubo de ensayo, se le agregó 1 ml de una solución de ácido clorhídrico al 1-2 %. Posteriormente se le adicionaron 3 gotas (agregando gota a gota) del reactivo de Dragendorff hasta la formación de un precipitado pardo anaranjado, indicativo de resultado positivo.

3.10 DETERMINACIÓN DE PERFILES CROMATOGRÁFICOS

Los perfiles cromatográficos se efectuaron mediante sistemas cromatográficos analíticos planares e instrumentales (RP-HPLC-DAD para flavonoides y otros derivados fenólicos, CG-MS para terpenos y compuestos relacionados).

3.10.1 SISTEMA CROMATOGRÁFICO PLANAR EN CAPA FINA DE ADSORCIÓN ORIENTADO A EVIDENCIAR FLAVONOIDES (TLC)

Fase estacionaria: Sílica Gel 60 FG₂₅₄.

Fase móvil: acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético glacial - agua (100:11:11:26).

Sustancia patrón: rutina.

Muestras: extractos de etanol e infusiones.

Siembra: en bandas de 2-3 mm.

Desarrollo: ascendente, a T°, Humedad y Presión normales.

Revelado: Luz Visible, Luz UV (254 y 365 nm), sin y con NP-PEG

3.10.2 SISTEMA CROMATOGRÁFICO PLANAR DE PARTICIÓN ORIENTADO A FLAVONOIDES (CP)

Fase estacionaria: Sílica Gel G60F₂₅₄.

Fase móvil: acetato de etilo-acido fórmico-acido acético glacial-agua (100:11:11:26).

Muestras: extractos de éter etílico, cloroformo y etanol de las flores y extractos clorofórmicos y de etanol de las partes aéreas.

Siembra: en bandas de 2-3 mm.

Desarrollo: ascendente, a T°, Humedad y Presión normales.

Revelado: Luz visible, Luz UV (254 y 365 nm), sin y con vapores de NH₃ previo, Vapores de Iodo, en ese orden.

3.10.3 SISTEMA CROMATOGRÁFICO PLANAR EN CAPA FINA DE ADSORCIÓN ORIENTADO A TERPENOS (TLC)

Fase estacionaria: Sílica Gel G60 F₂₅₄.

Fase móvil: tolueno - acetato de etilo (93:7).

Sustancia patrón: mentol.

Muestras: extracto de éter etílico de flores, extractos clorofórmicos de pa y fl, extractos alcohólicos de pa y fl e infusiones de pa y fl.

Siembra: en bandas de 2-3 mm.

Desarrollo: ascendente, a T°, Humedad y Presión normales.

Revelado: Vainillín - ácido sulfúrico al 10 %.

3.10.4 RP-HPLC-DAD

Se empleó un equipo Waters 1525 Binnary HPLC (Pump and Rheodyne injector, Waters 2996 Photodiode Array Detector) y una columna C-18 (250 x 4,6 mm) Waters symmetric 300 (5 µm). La Fase móvil estaba constituida por acetonitrilo (A) y agua-ácido acético (40:1, B). El gradiente empleado fue: 15 % A y 85 % B, 0-15 min; seguido de un gradiente lineal hasta 65 % B, 30 min y luego hasta 0 % B en 2 min; flujo 1,0 ml/min; temperatura ambiente; longitud de onda 365 nm.

Se aplicó a la muestra de inflorescencias de lúpulo procedente de El Bolsón

3.10.5 CG-MS

Se llevó a cabo en un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masa Shimadzu GCMS – QP2010, con un potencial de ionización de 70 Ev y con una relación de Split de 10:1, utilizando helio como gas portador (flujo 1,5 ml/min) y una columna Supelco SPB™-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Temperatura de inyección: 200 °C. Rampa de temperatura: 40 °C x 10 min, 40 – 200 °C (3 °C/min), 200-220 °C (2 °C/min). El cromatograma fue analizado utilizando una biblioteca de espectros de masa Wiley 9.0.

4. *RESULTADOS*



4.1 RESULTADOS DE ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS

4.1.1 ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA SOBRE EL MÚSCULO LISO INTESTINAL DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLORES DE LÚPULO

4.1.1.1. EFECTOS DEL LÚPULO SOBRE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN RESPUESTA (CCR) DE CARBACOL

Para evaluar el efecto de la tintura de lúpulo proveniente de El Bolsón sobre el músculo liso gastrointestinal, se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) de Carbacol en intestino aislado de rata. La **Figura 17** muestra que el extracto hidroalcohólico de lúpulo produjo una caída dependiente de la concentración en el efecto máximo de la contracción producida por carbacol en las CCR. Este comportamiento sugiere que la tintura de lúpulo produjo una inhibición no-competitiva sobre las CCR de Carbacol en intestino aislado de rata (**Figura 17**)

Se interpoló un valor de CI50 de $82,4 \pm 21,8$ µg lúpulo/ml de solución Tyrode. Considerando que el rendimiento de la tintura resultó ser en promedio de 27,4 % p/p (g extracto seco/g lúpulo), la CI50 es equivalente a $22,6 \pm 6,0$ µg extracto seco/ml).

En comparación, el modo de acción no-competitivo de la tintura de lúpulo fue similar a la inhibición producida por verapamilo en una CCR de acetilcolina (control positivo). Dicho conocido bloqueante de los canales de Ca^{2+} mostró una afinidad estimada como pK' de $6,22 \pm 0,16$, es decir cercana a una concentración de 1 µmol/l (**Figura 18**).

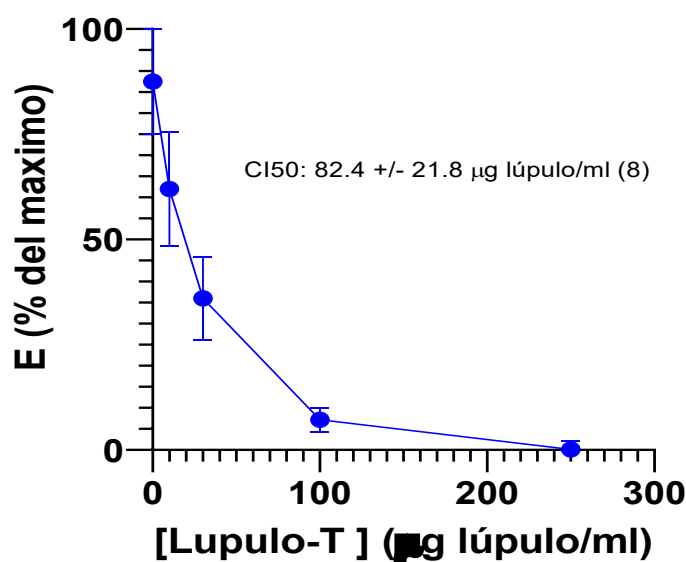
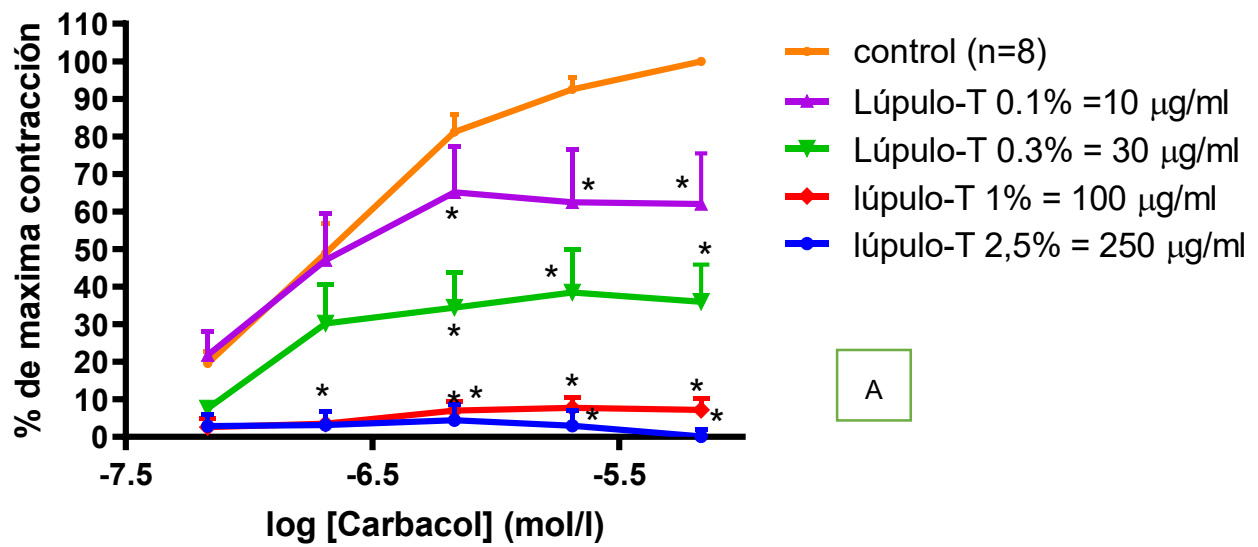


Figura 17. (A) CCR de Carbacol en ausencia (control) y presencia de tintura de *Humulus lupulus* en intestino de rata. $p\text{CE}_{50}$ de Carbacol: $6,63 \pm 0,12$ (* $p < 0.05$ vs control). **(B)** Curva de inhibición promedio (derivada de las CCR de Carbacol) de la cual se interpoló la CI_{50} de *Humulus lupulus*. en $82,4 \pm 21,8 \mu\text{g lúpulo/ml}$ equivalente a $22,6 \pm 6,0 \mu\text{g extracto seco/ml}$ (n= 8).

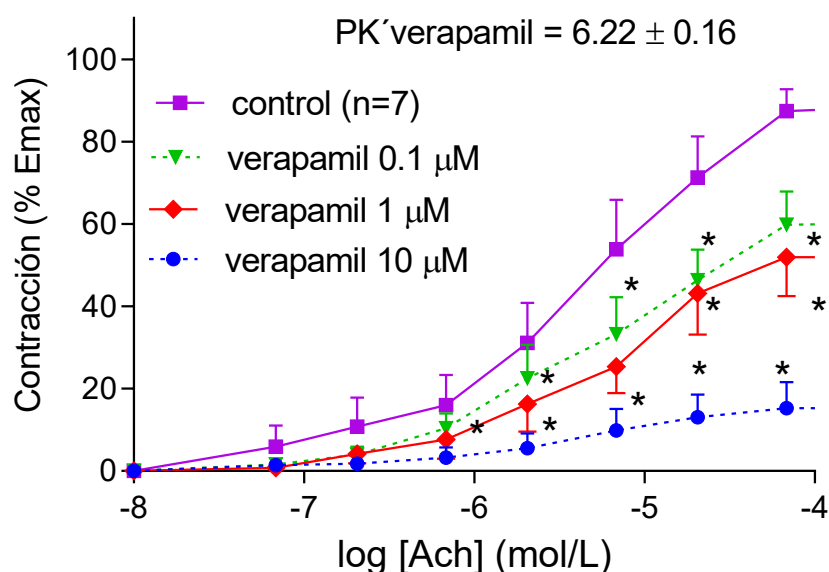


Figura 18. Antagonismo no-competitivo del bloqueante de los canales de calcio, verapamilo, en las CCR de acetilcolina (* $p < 0.05$ vs control).

4.1.2 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LÚPULO SOBRE LA VEJIGA AISLADA DE RATA

4.1.2.1. EFECTOS DE LÚPULO EN LAS CCR DE CARBACOL EN VEJIGA AISLADA DE RATA

El extracto hidroalcohólico de lúpulo de El Bolsón demostró también un efecto antiespasmódico por el mecanismo de antagonista no-competitivo en la CCR de carbacol en vejiga aislada (**Figura 19**). Así, la tintura demostró no interferir con los receptores muscarínicos, sino con otro mecanismo posterior en la cascada celular que conduce a la contracción, como podría ser el influjo de calcio. Se interpoló un valor de CI_{50} de $45,63 \pm 13$ µg de lúpulo/ml, equivalente según el rendimiento a $12,5 \pm 3,6$ µg extracto seco/ml.

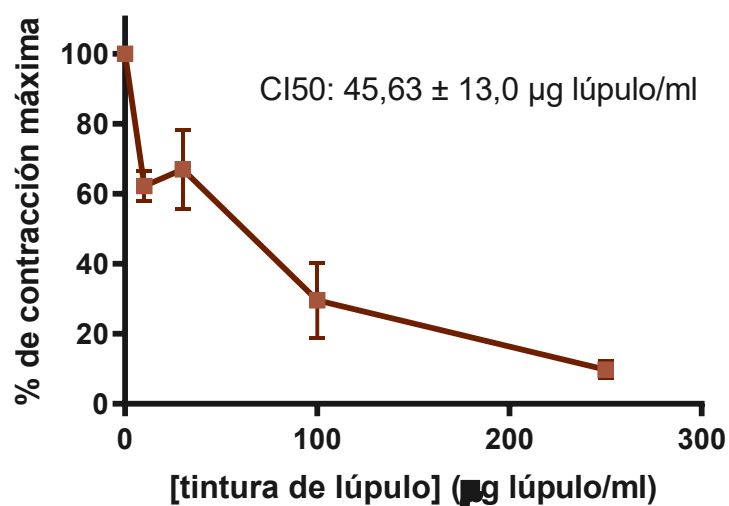
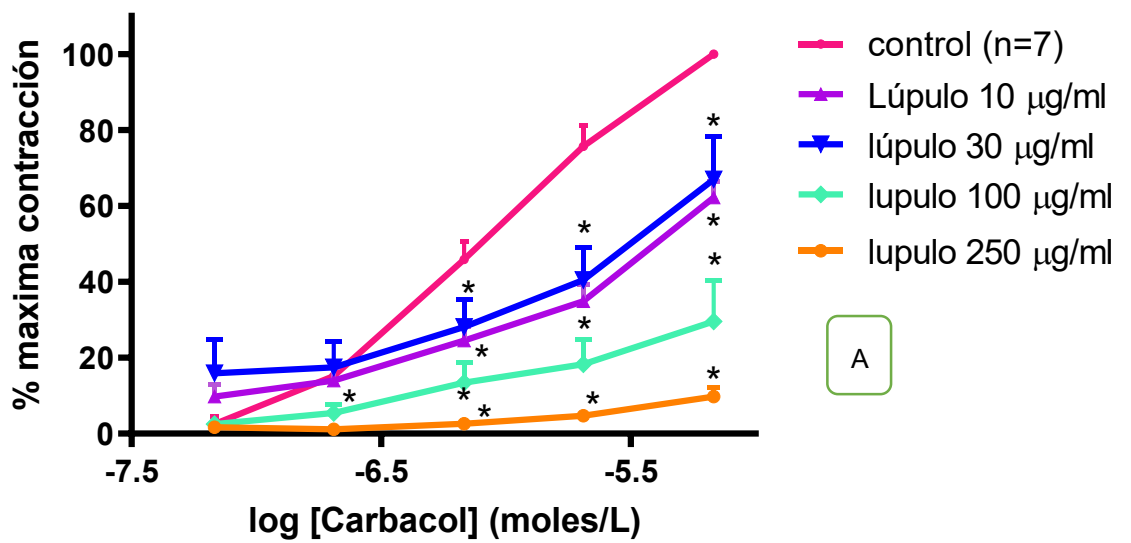


Figura 19 (A) Efectos de la tintura de lúpulo en las CCR de carbacol en el músculo liso de la vejiga aislada. El pCE50 de Carbacol resultó $6,14 \pm 0,12$. **(B)** Curva de inhibición correspondiente a las CCR, de donde se interpoló la concentración inhibitoria al 50 % (CI50) de *Humulus lupulus* de $45,63 \pm 13,0$ µg lúpulo/ml (n=7) equivalente a $12,5 \pm 3,6$ µg extracto seco/ml.

4.1.2.2. EFECTOS DE LA TINTURA DE LÚPULO SOBRE LAS CCR DE CALCIO EN VEJIGA AISLADA DE RATA

Para evaluar si los efectos de la tintura de lúpulo son debidos a la inhibición de canales de Ca^{+2} se ensayó su efecto sobre las CCR de Ca^{+2} (pCE50 : $5,3 \pm 0,5$, $n=6$). La **Figura 20** muestra que la tintura de lúpulo inhibió no-competitivamente las CCR de Ca^{+2} con una CI50 de $313,83 \pm 43,79 \mu\text{g}$ lúpulo/ml ($n=6$), equivalente según el rendimiento, a $86,0 \pm 12,0 \mu\text{g}$ extracto seco/ml).

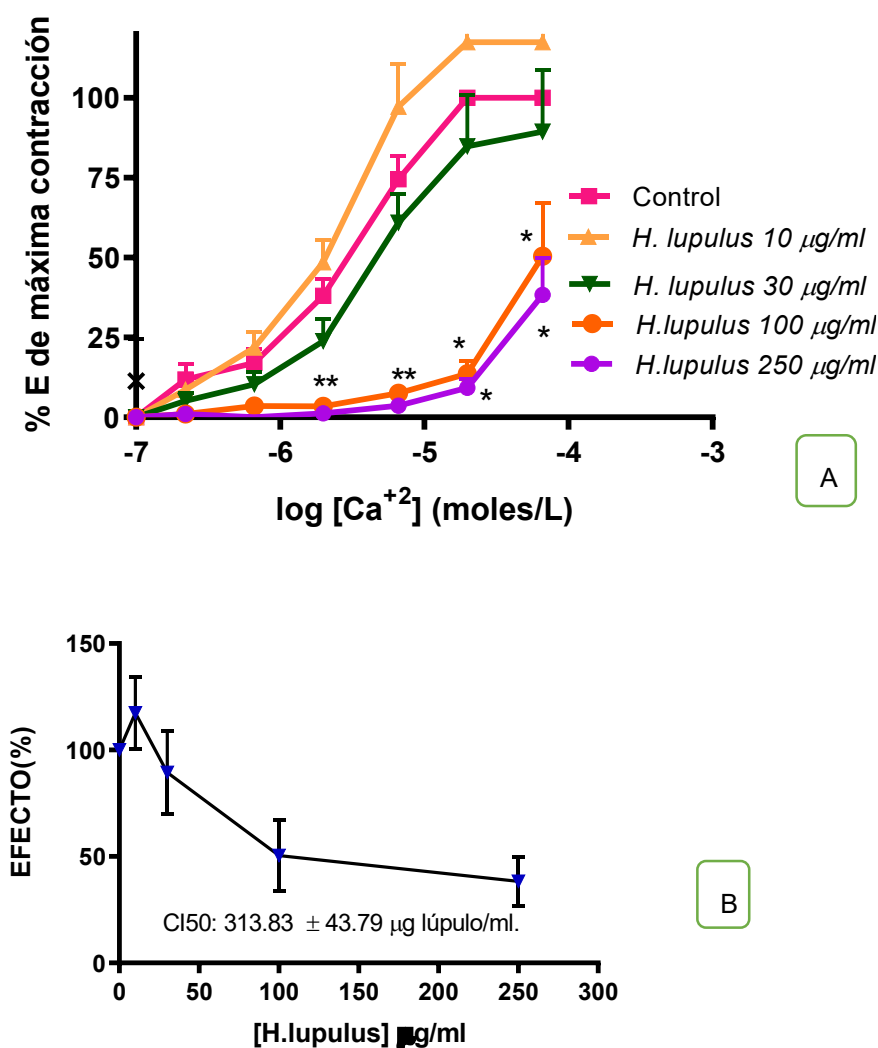


Figura 20. (A) CCR de calcio en ausencia (control) y presencia de tintura de *Humulus lupulus* en vejiga. **(B)** Curva de inhibición de la cual se interpoló la CI50 de *Humulus lupulus*. pCE50 de Ca : $5,3 \pm 0,5$. La CI50 de *Humulus lupulus*: $313,83 \pm 43,79 \mu\text{g}$ lúpulo/ml ($n=6$), equivalente a $86,0 \pm 12,0 \mu\text{g}$ extracto seco/ml.

Para comparar, se analizaron los efectos del conocido bloqueante de los canales de calcio, verapamilo, en las CCR de calcio en vejiga. La **Figura 21** muestra que el verapamilo se comportó igualmente al extracto, como un antagonista no-competitivo.

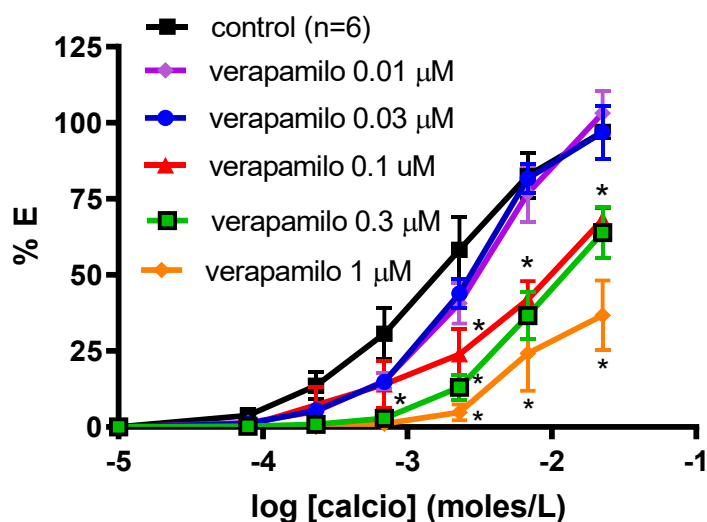


Figura 21. CCR de calcio en ausencia (control) y presencia de diversas concentraciones únicas de verapamilo en intestino aislado de rata. * $p < 0.05$ v control.

4.1.3 EFECTOS DE *HUMULUS LUPULUS* SOBRE LA CONTRACTILIDAD DE ÚTERO AISLADO

4.1.3.1. EFECTOS DE LA TINTURA DE LÚPULO SOBRE LAS CCR DE CARBACOL

La tintura de lúpulo inhibió en modo no-competitivo la CCR de carbacol en el útero (pCE_{50} : $6,32 \pm 0,11$, $n = 6$) con una CI_{50} de $70,0 \pm 20,0$ μg de droga herbácea/ml equivalente según el rendimiento a $19,2 \pm 5,5$ μg extracto seco/ml (**Figura 22**).

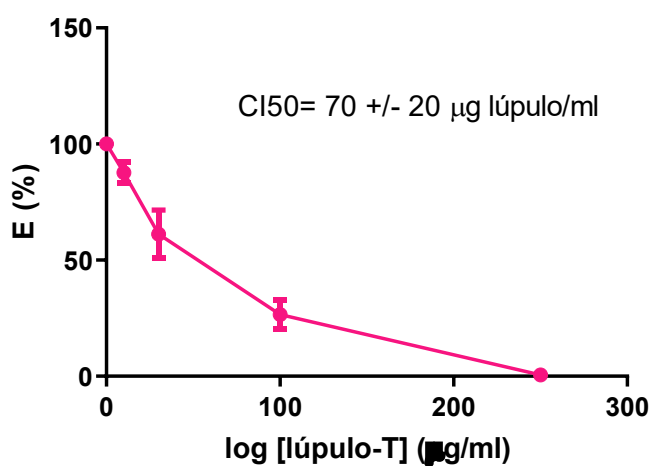
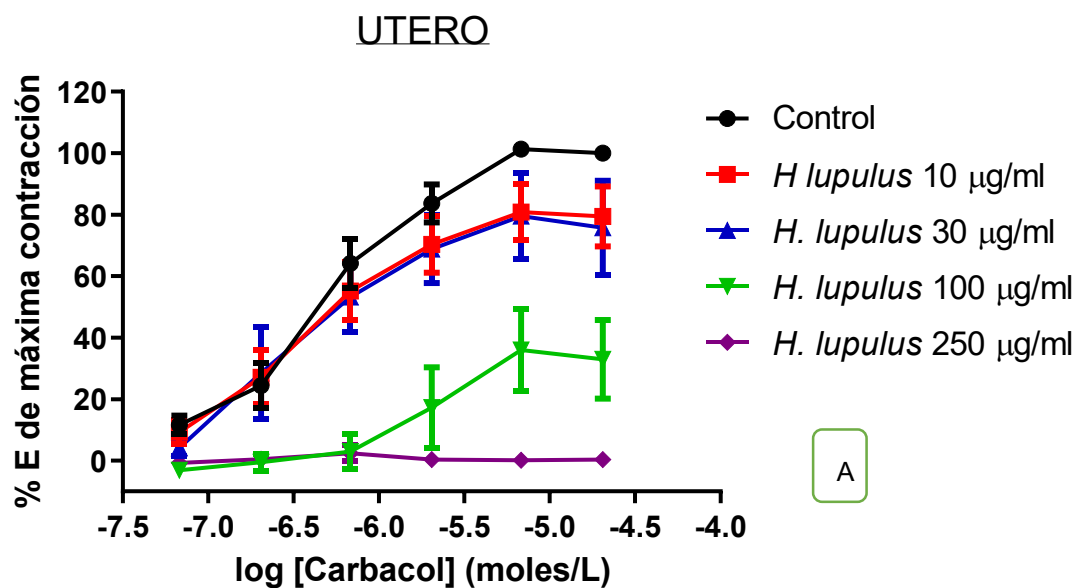


Figura 22. (A) Efectos de la tintura de lúpulo sobre la CCR de Carbacol en útero de rata, **(B)** Curva de inhibición que muestra la CI50 de $70,0 \pm 20,0$ µg lúpulo/ml equivalente a $19,2 \pm 5,5$ µg extracto seco/ml.

4.1.4 ESTUDIO DE LOS EFECTOS SOBRE LA CONDUCTA EN RATONES

4.1.4.1 TEST DE CAMPO ABIERTO

Para evaluar los efectos de los extractos sobre la locomoción espontánea y la actividad exploratoria de los ratones, se realizó el test de campo abierto. Para ello, se ensayaron dos extractos diferentes:

- a) extracto hidroetanólico (10 % p/v) obtenido a partir de los conos de lúpulo que provenían de una plantación de las afueras de La Plata.
- b) Extracto acuoso (10 % p/v) obtenido por decocción de la muestra comercial de lúpulo proveniente de El Bolsón.

La **Figura 23** muestra los resultados obtenidos con las distintas diluciones del extracto hidroetanólico de lúpulo cultivado en La Plata, los cuales no modificaron significativamente el número de líneas cruzadas con respecto al control negativo (solución fisiológica) durante el tiempo total del experimento. Si bien no se encontraron diferencias significativas en los tests a posteriori entre 2 tratamientos, el ANOVA de 2 vías indica diferencias entre tratamientos, y se observa que los grupos tratados con Diazepam 1 mg/kg y Tintura de lúpulo 330 mg/kg son los que tienen más baja movilidad espontánea.

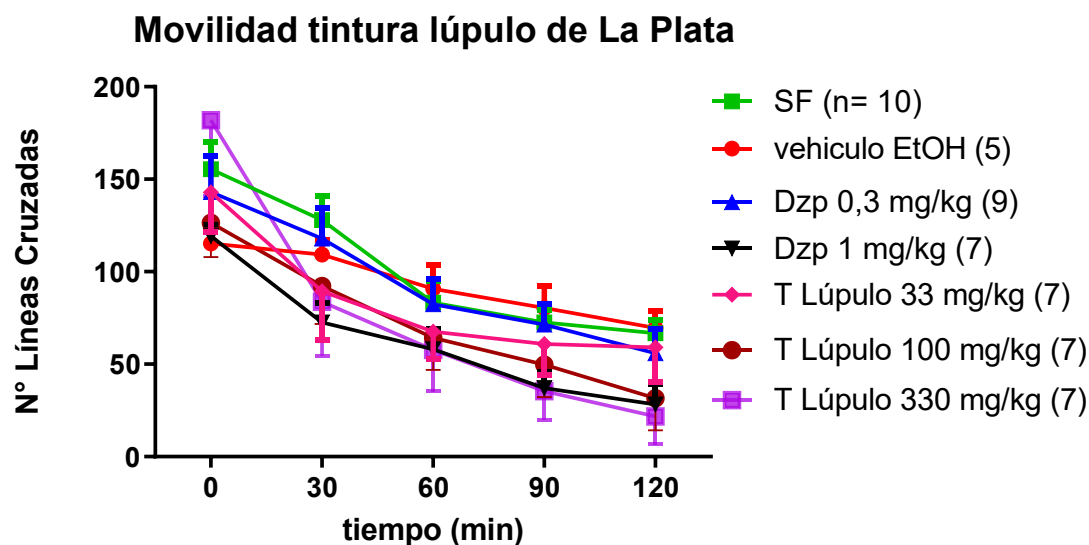


Figura 23. Efecto de las distintas diluciones de tintura de *Humulus lupulus* proveniente de la ciudad de La Plata, sobre la movilidad espontánea de ratones en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vías: tratamiento: $F= 5,748$, $p<0.05$; tiempo: $F= 33,16$, $p<0.0001$, post-tests: NS vs SF o vehículo.

Por otra parte, la **Figura 24** muestra que el extracto etanólico al 10 % de *Humulus lupulus* a las dosis de 100 y 330 mg lúpulo/kg disminuyó significativamente el número de enderezamientos (actividad exploratoria) respecto al control negativo (solución fisiológica y vehículo etanólico) entre los 30 y 90 minutos de la administración. Igual efecto se obtuvo con Diazepam 0,3 y 1 mg/kg. Estos resultados sugieren que el extracto desarrolló actividad levemente sedante, afectando más la capacidad exploratoria que la movilidad espontánea.

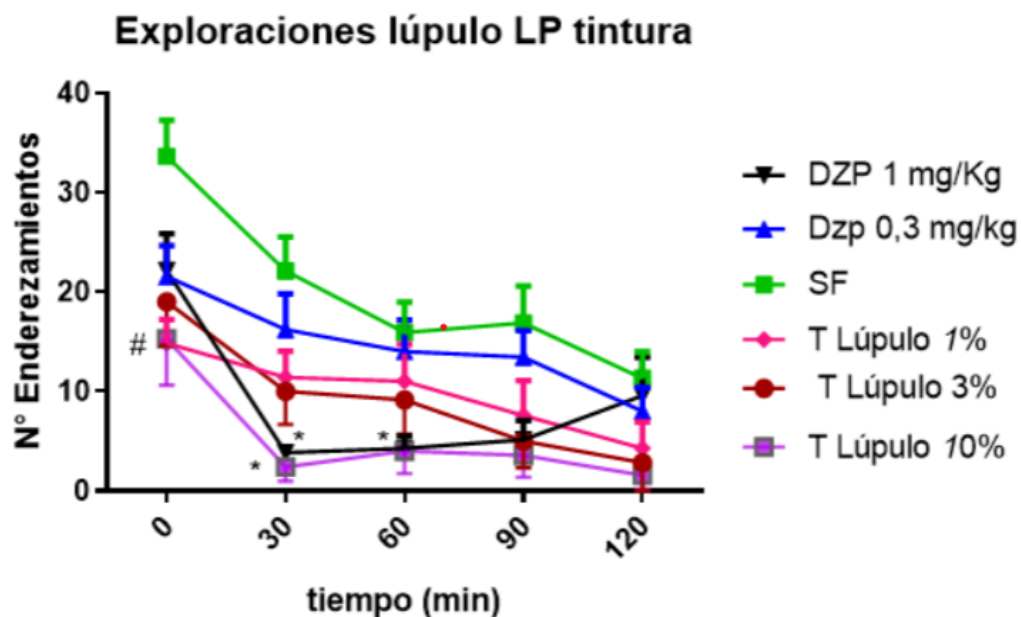
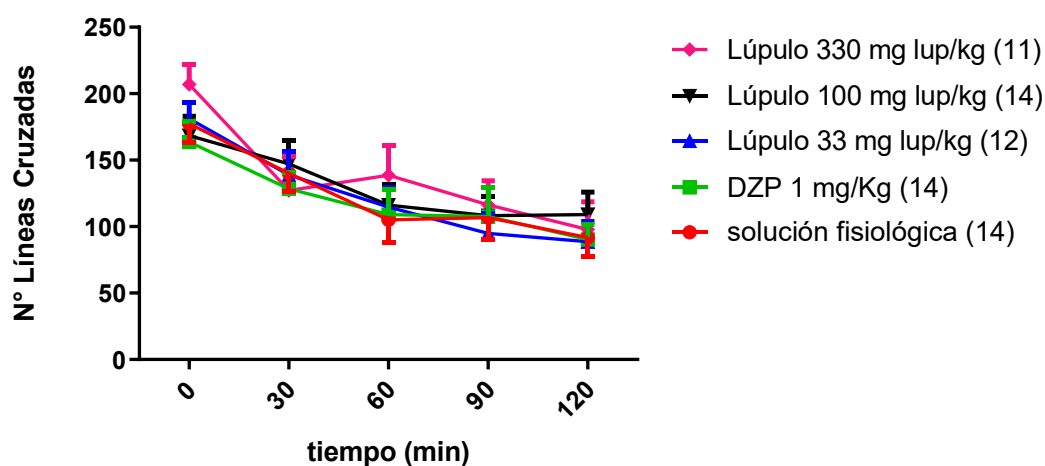


Figura 24. Efecto de distintas diluciones del extracto etanólico de *Humulus lupulus* (Cannabaceae) proveniente de La Plata, sobre el número de enderezamientos en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vías. Por tratamiento: $F(6,255) = 19,45$; $P < 0,0001$. Por tiempo: $F(4, 255) = 19,59$; $P < 0.0001$. Test a posteriori: * $p < 0.05$ vs SF.

Con la finalidad de evaluar si la tintura enmascaraba o no extraía principios activos ansiolíticos, se evaluó el efecto de una decocción de inflorescencias provenientes de la Patagonia.

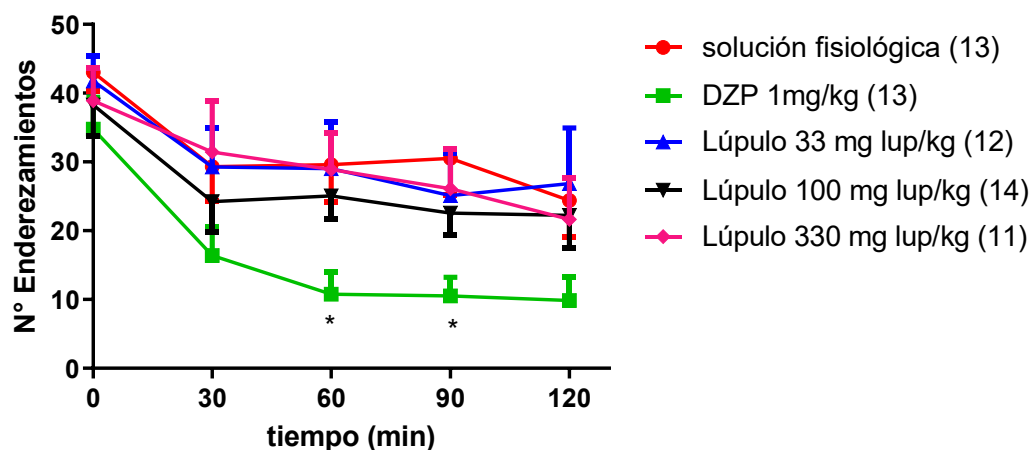
La **Figura 25** muestra que el extracto acuoso de lúpulo de la Patagonia no modificó significativamente la locomoción espontánea (A) ni las exploraciones (B), a diferencia del diazepam que en la concentración de 1 mg/kg redujo significativamente la exploración espontánea.

Movilidad - decocción Lúpulo de Patagonia



A

Exploración - decocción lúpulo de Patagonia



B

Figura 25. Efecto de distintas diluciones del extracto acuoso de *Humulus lupulus* proveniente de la Patagonia, sobre el número de líneas cruzadas (A) y de enderezamientos (B) en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vías: en movilidad: por tratamiento: NS, tiempo: $F = 19,84$, $p < 0.0001$. En exploración: Por tratamiento: $F = 7,658$; $P < 0.0001$. Por tiempo: $F = 10,69$; $P < 0.0001$. Test a posteriori: $*p < 0.05$ vs SF (solución fisiológica).

4.1.4.2. TEST DE SUPRESIÓN DEL ALIMENTO

La **Figura 26** muestra que el extracto etanólico de lúpulo de El Bolsón, Patagonia, redujo la latencia para alimentarse sólo a la dosis de 33 mg lúpulo/kg, pero se neutralizó a mayor dosis. Por otra parte, en ese grupo se redujo la

cantidad de alimento ingerida (**Figura 27**), por lo cual se concluye que la reducción de la latencia no es debida a un efecto orexígeno, sino a ansiolisis.

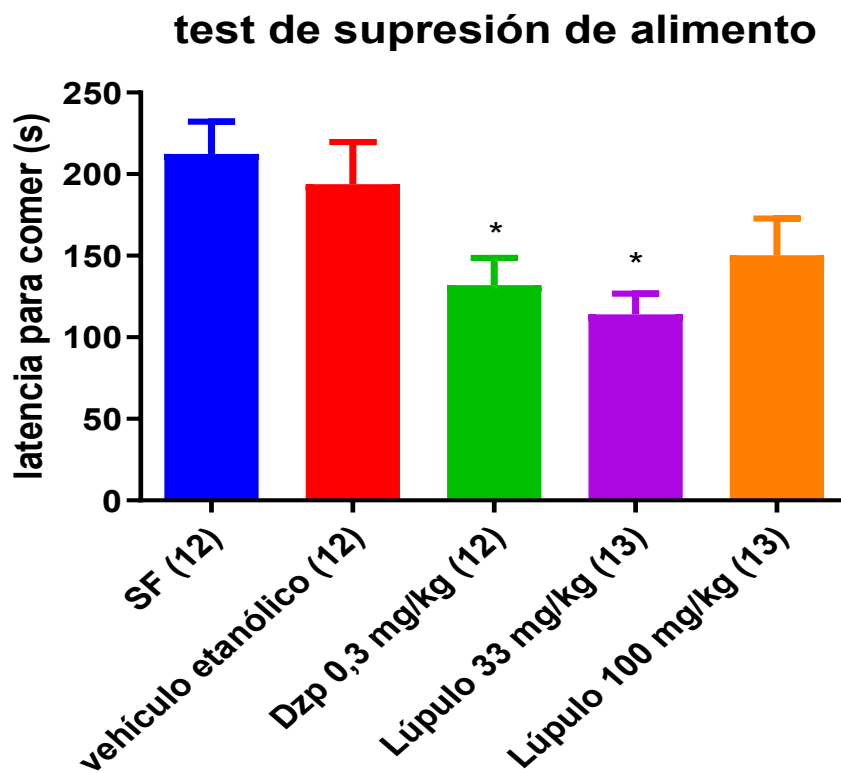


Figura 26. Efectos de la tintura de lúpulo de El Bolsón en la latencia para alimentarse del ratón luego de 24 h de ayuno (test de supresión de alimento). ANOVA: $F = 3,409$, $p < 0.05$ y post-test Dunnett: * $p < 0.05$ vs solución fisiológica (SF)

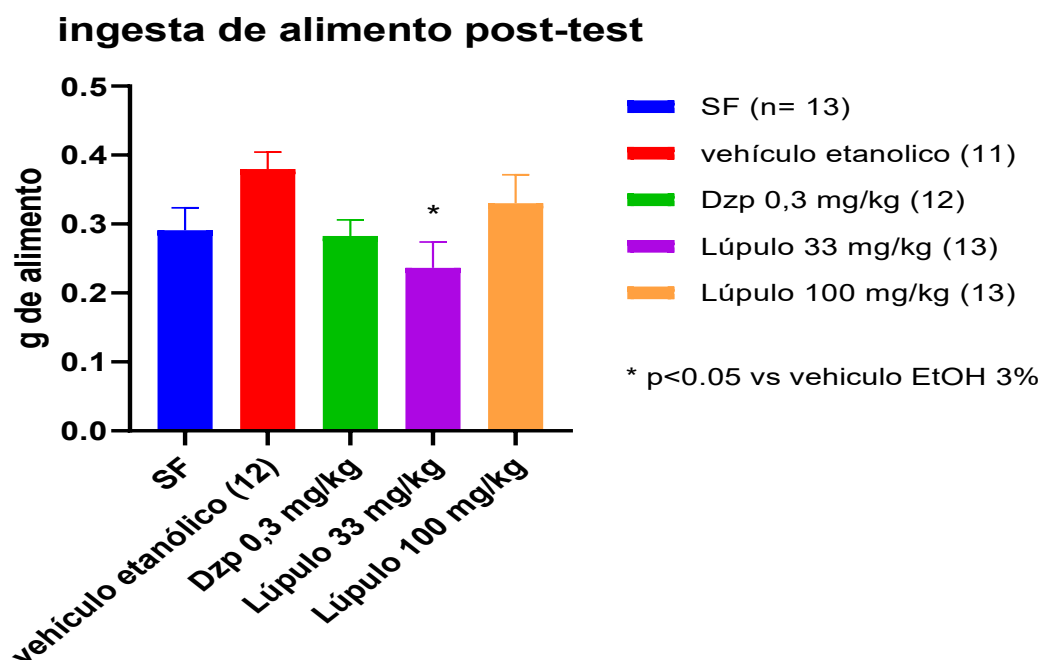


Figura 27: Efectos de la tintura de lúpulo del Bolsón (Patagonia) en la cantidad de alimento ingerida luego de la prueba de latencia en el test de supresión de alimento. ANOVA: $F= 2.529$, $p=0.05$ y post-test Tukey: * $p<0.05$ vs vehículo etanólico.

4.1.4.3. TEST DEL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO

La **Figura 28** muestra que la decocción de inflorescencias de lúpulo recolectadas en La Plata no modificó significativamente el número de entradas a las ramas abiertas y cerradas del laberinto en cruz elevado, aún cuando se expresa como cociente de dichos parámetros de movimiento. Esto sugiere que en la decocción y a las dosis ensayadas, no se obtuvo el efecto ansiolítico.

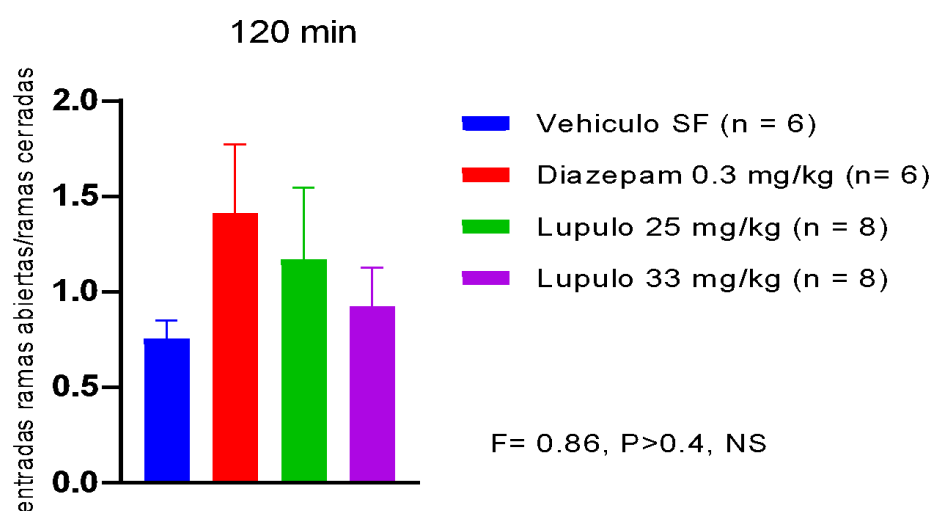
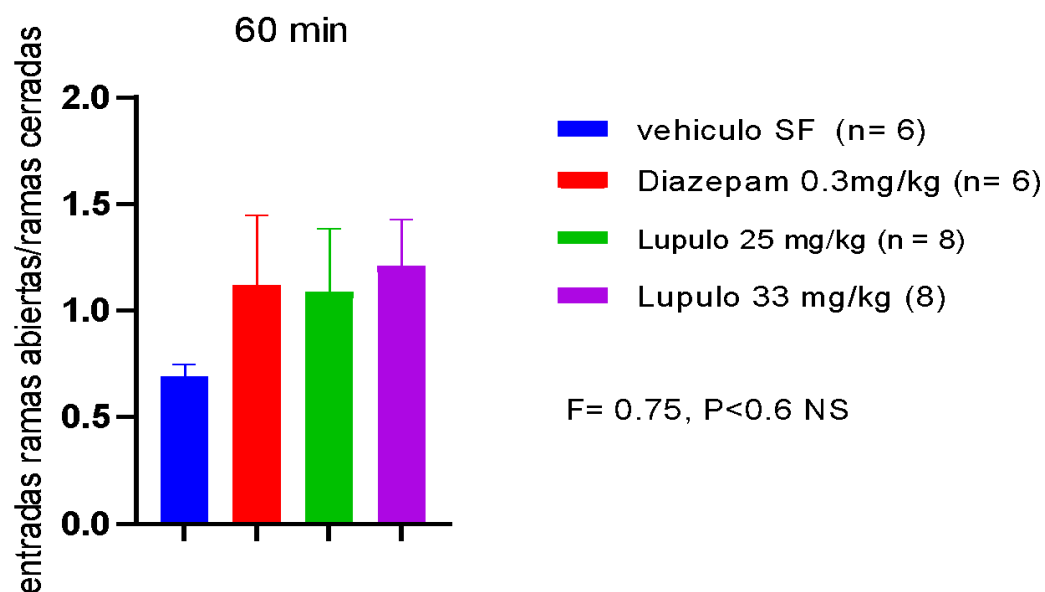


Figura 28. Efectos de la administración i.p. de la decocción de lúpulo (inflorescencias, origen La Plata) en el test del laberinto en cruz elevada a los 60 y 120 minutos de su administración, expresado como cociente del número de entradas a las ramas abiertas y a las cerradas. A pesar de verse una tendencia al aumento respecto del vehículo solución fisiológica, los resultados no son significativos.

4.2 RESULTADOS DE ESTUDIOS BOTÁNICOS

4.2.1 BRACTEOLA (VISTA SUPERFICIAL DE EPIDERMIS)

Las **Figuras 29 y 30**, muestran detalles de la bracteola. Se observaron:

- Células epidérmicas con paredes anticlinales onduladas, tanto en el haz como en el envés.
- Tricomas glandulares presentando una coloración amarilla (de forma natural) en la base en ambas caras de la bráctea.
- Pelos eglandulares, simples unicelulares.

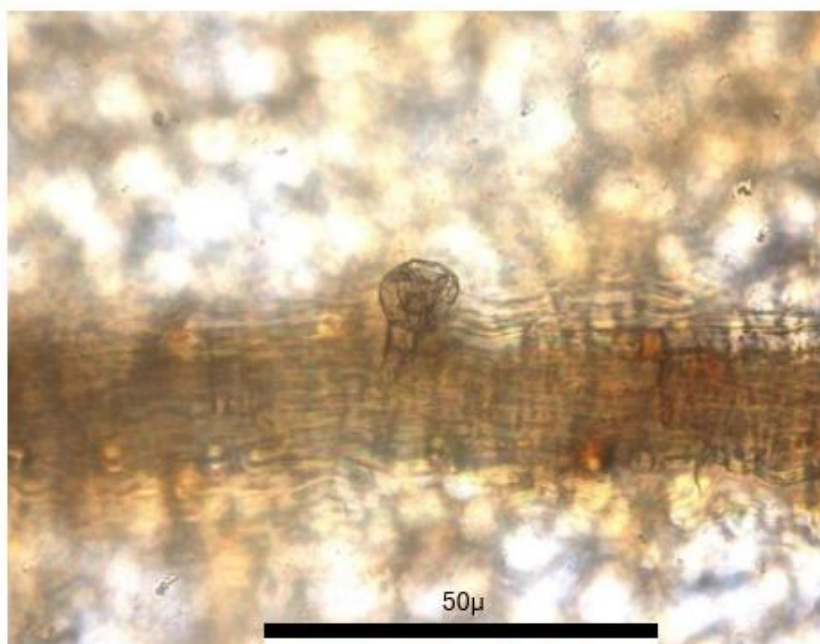


Figura 29. Bracteola con pelo glandular de coloración amarilla sobre la vena media, observada en una muestra de lúpulo. **AUMENTO 400**



Figura 30. Bracteola en vista superficial observada en una muestra de lúpulo. AUMENTO 400

4.2.2 HAZ O CARA ADAXIAL.

- Células epidérmicas dispuestas de manera desordenada con paredes anticlinales onduladas. No se observan estomas.
- Tricomas: se observan glandulares, eglandulares y pelos cistolíticos.
- Pelos glandulares con cabezuela unicelular.
- Pelos eglandulares simples unicelulares distribuidos en lámina y margen.
- Pelos cistolíticos, es decir que presentan una concreción de carbonato de calcio. Son característicos de la familia Cannabaceae.
- El pelo cistolítico está rodeado por una roseta de células (12 ó 14) que presentan notables estrías cuticulares radiadas (**Figuras 31 a 34**).

-

-

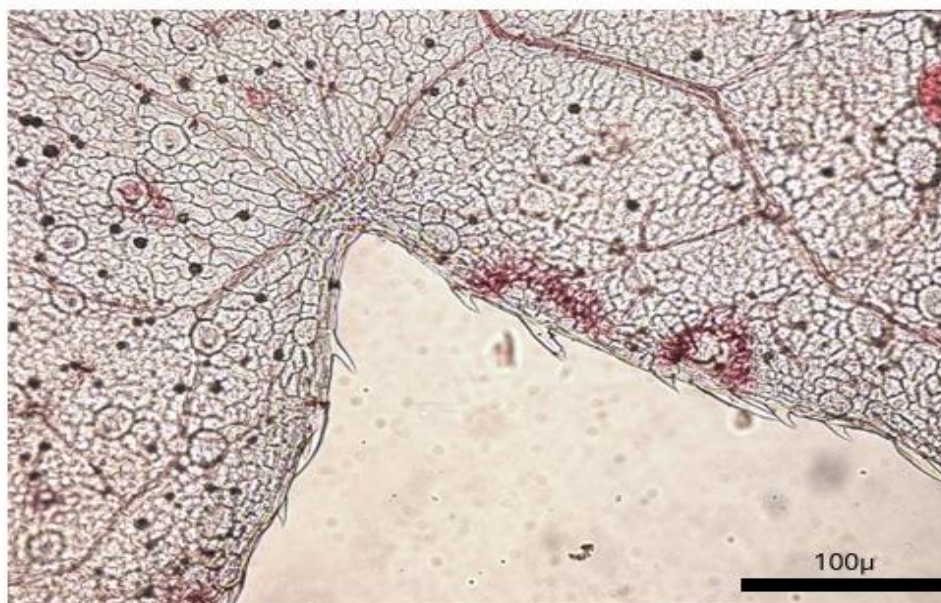


Figura 31. HAZ. Pelos eglandulares, distribuidos en lámina y margen, observados en una muestra de lúpulo. AUMENTO 4X5

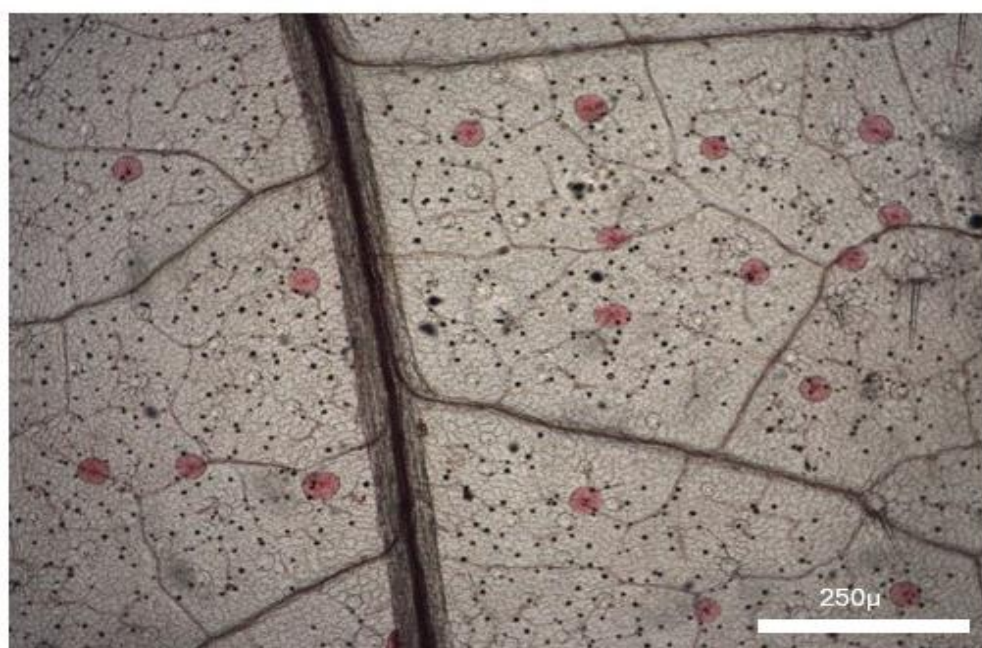


Figura 32. vena o nervadura principal, nervadura de menor calibre y areolas, con numerosos pelos glandulares con cabezuela y algunos pelos eglandulares observadas en una muestra de lúpulo. Aumento 40X.

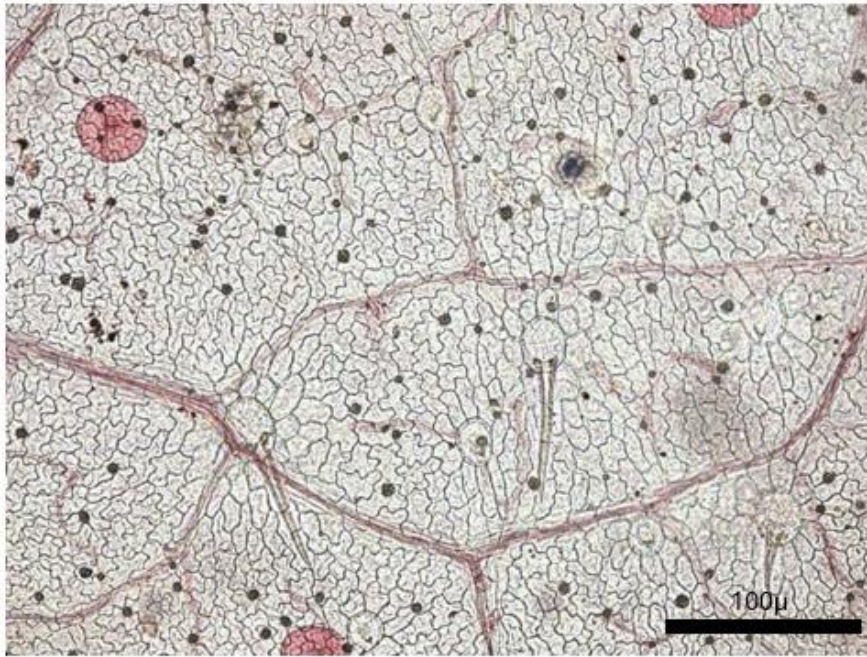


Figura 33. HAZ. Epidermis donde se destacan nervaduras, areolas y numerosos pelos cistolíticos rodeado por una roseta de células, observado en una muestra de lúpulo con un microscopio óptico. Aumento 100x.

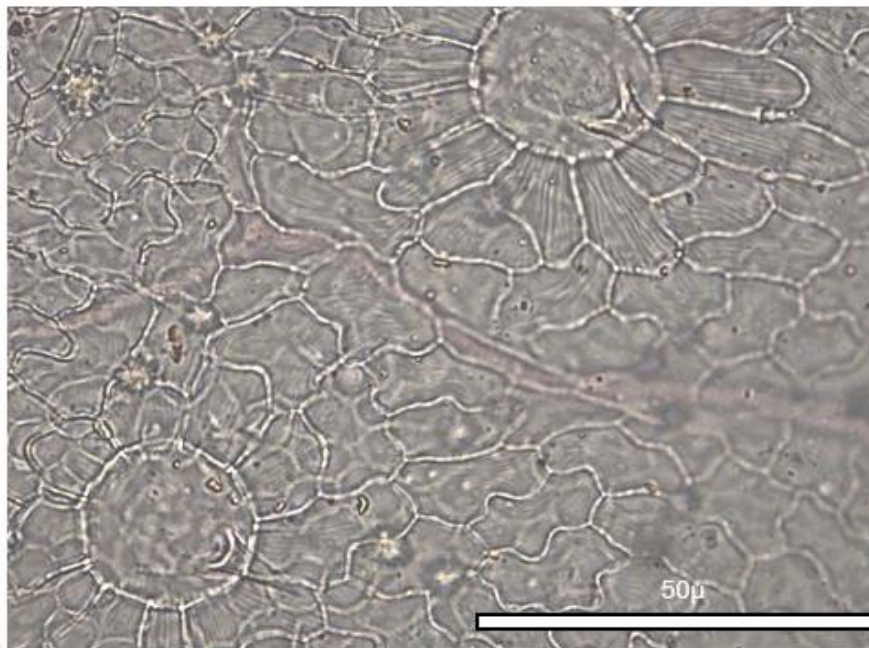


Figura 34. HAZ. Dos pelos cistolíticos, cada uno rodeado por una roseta de células, observado en una muestra de lúpulo con un microscopio óptico. Aumento 400X.

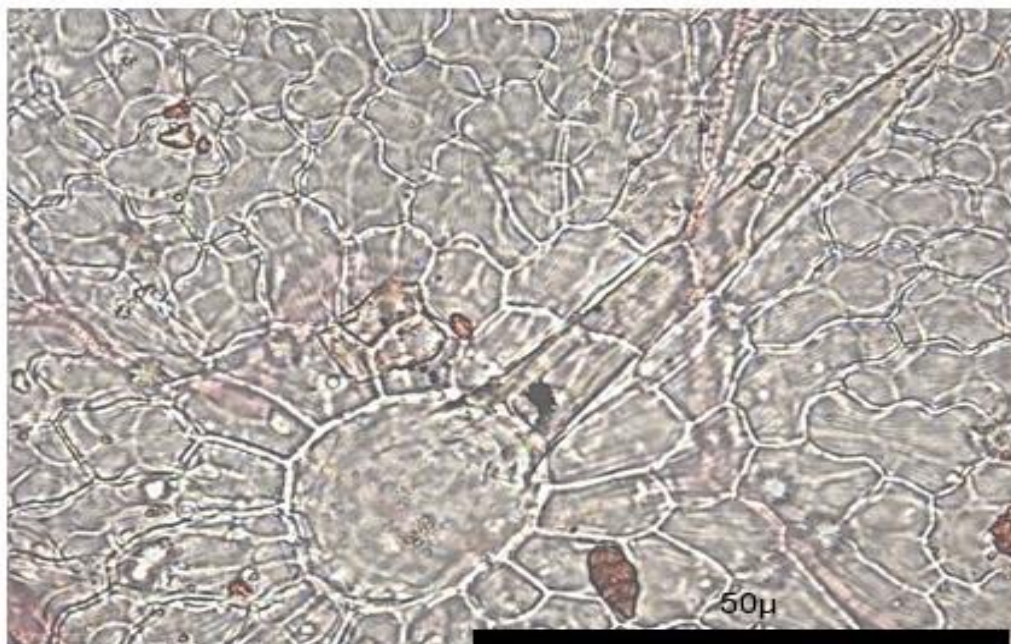


Figura 35. HAZ. Pelo cistolítico que presenta una concreción de carbonato de calcio, observado en una muestra de lúpulo. Aumento 400X

4.2.3 ENVES O CARA ABAXIAL

- Células epidérmicas dispuestas de manera desordenada con paredes anticlinales sinuosas. (**Figura 35**).
- Estomas de tipo anomocítico (las células que lo rodean no tienen diferencia entre sí) con células anexas con conspicuas estrías cuticulares. (**Figura 36**).
- Pelos glandulares (son los mismos que se refirieron en el haz). (**Figura 37**).
- Dientes agudos y sin mucrón.
- Pecíolo con dos líneas de pelos (hileras) en *Humulus* lo cual lo diferencia de *Cannabis*.

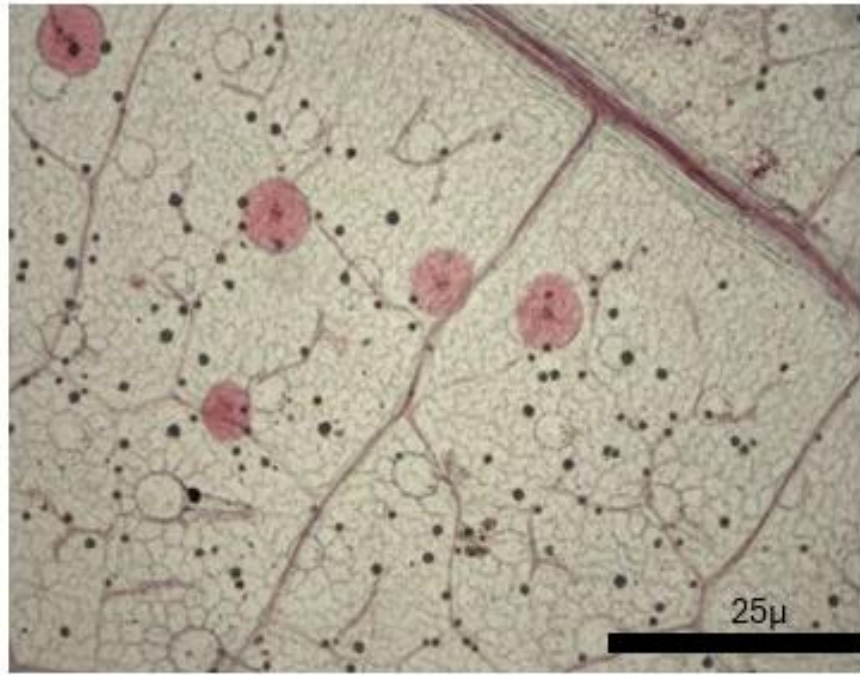


Figura 36. ENVES. Células epidérmicas dispuestas de manera desordenada, pelos glandulares y eglandulares, nervaduras y areolas observadas en una muestra de lúpulo. AUMENTO 100X

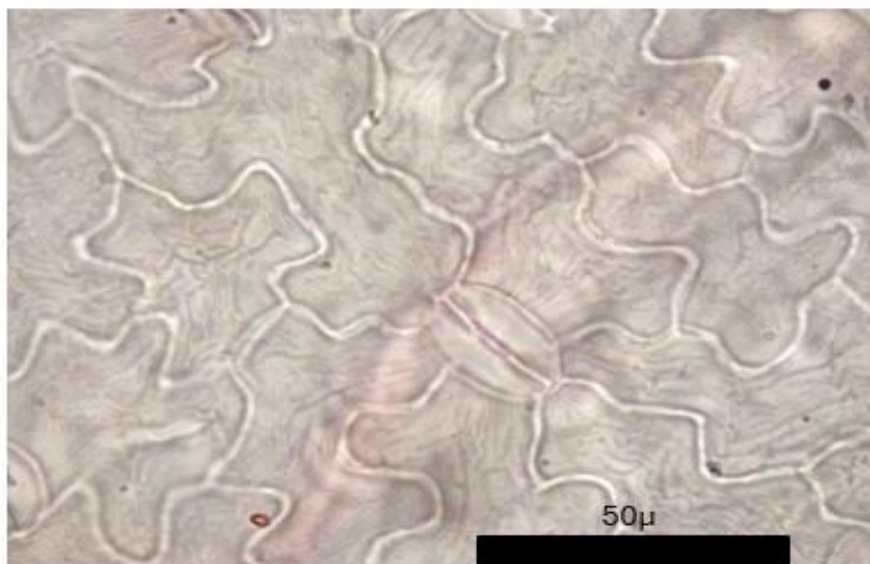


Figura 37. ENVES. Estoma singular de tipo anomocítico y células epidérmicas donde se destacan los paredes anticlinales sinuosas observados en una muestra de lúpulo. AUMENTO 400X

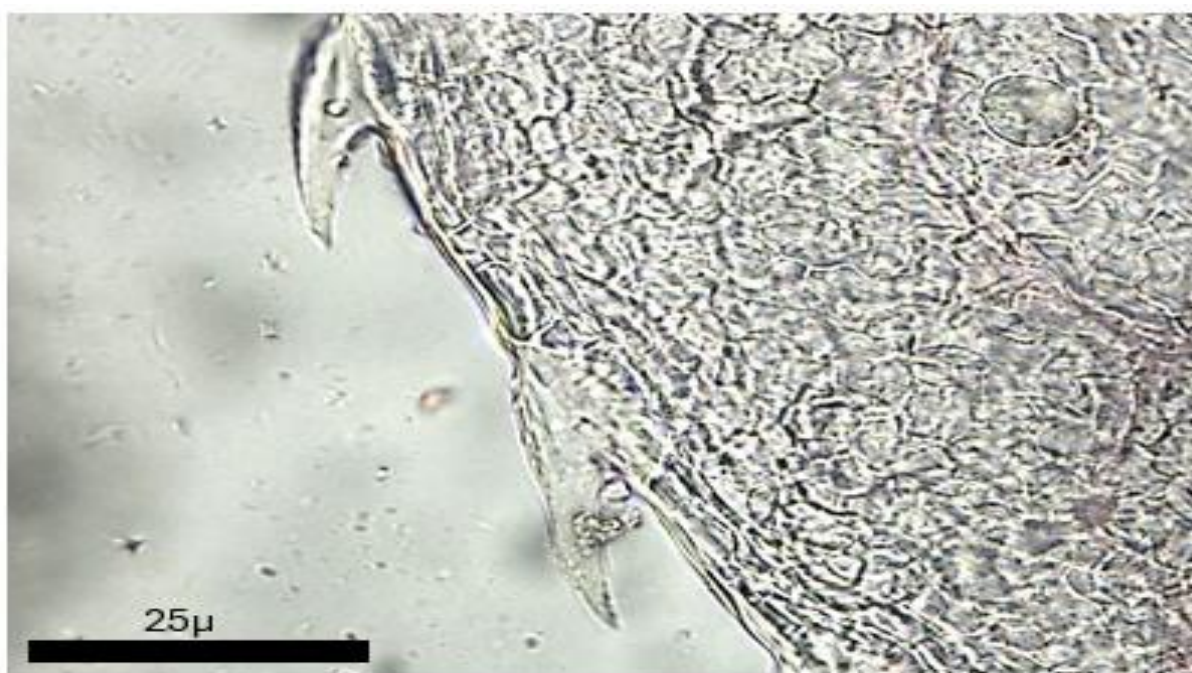


Figura 38. Pelos glandulares y eglandulares, observados en una muestra de lúpulo AUMENTO 400X

Al realizar la observación de la muestra comercializada con el nombre de lúpulo se observaron iguales resultados, tanto para las características de la epidermis de las hojas (la cuales se encontraron en trozos de distintos tamaños) como de las bractéolas que forman parte de las inflorescencias femeninas, ya que estas partes vegetales constituyen la droga vegetal que se dispensa en farmacias y se expende en herboristerías.

4.3 RESULTADOS DEL ANALISIS FITOQUIMICO

El análisis fitoquímico se realizó en los laboratorios del GQBMRNP y LACROMI-AAI, CRIDECIT (FCNyCS, UNPSJB), sitio de trabajo del Dr. Osvaldo L. Córdoba, Codirector de este trabajo de tesis, durante una estadía de investigación.

4.3.1 EXTRACCIÓN GENERAL Y RENDIMIENTOS

Las partes aéreas e inflorescencias de lúpulo, fueron secadas, reducidas a polvo y sometidas a los diferentes procesos extractivos que se describieron en el capítulo de metodología de este trabajo de tesis.

Los extractos obtenidos fueron concentrados y llevados a seco. A partir de estos productos se calcularon los rendimientos, los que fueron expresados como porcentaje P/P considerando el peso total de extracto seco respecto del peso del material vegetal seco reducido a polvo sometido a la extracción. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Rendimiento de las infusiones y de los extractos de etanol obtenidos a partir de partes aéreas (lpa y EOLpa) de muestra comercial y de flores (lf, EOLf) provenientes de El Bolsón de *Humulus lupulus* (Cannabaceae).

EXTRACTO	RENDIMIENTO EN MASA (g)	RENDIMIENTO PORCENTUAL (% P/P)
lpa	2,02	20,02
lf	2,11	21,1
EOLf	8,51	85,1
EOLpa	6,09	60,9

Cada extracto fue analizado mediante el screening químico descrito en materiales y métodos. A continuación, se describen los resultados obtenidos.

4.3.2. HIDRATOS DE CARBONO. REACCIÓN DE MOLISCH

Los resultados para las infusiones de partes aéreas y de flores fueron negativos en todos los casos. En (**Figura 39**), se puede observar la ausencia del anillo de color púrpura violáceo en la interfase característico de la presencia de este grupo químico.

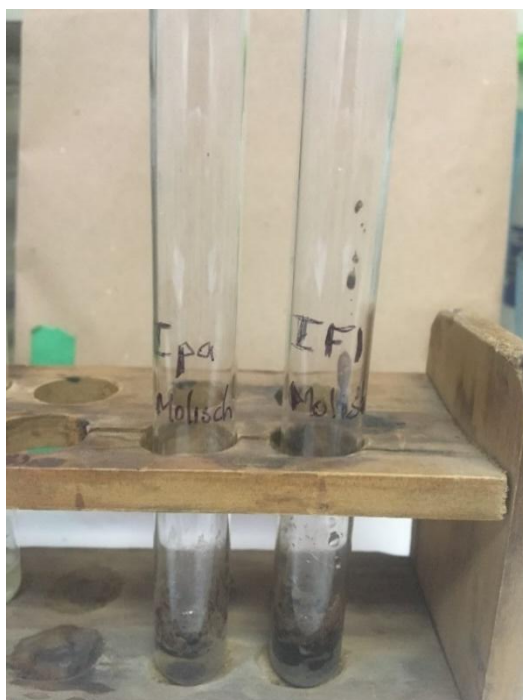


Figura 39. Resultados de la reacción de Molisch de la infusión de flores de El Bolsón (derecha), y de la infusión de partes aéreas de muestra comercial (izquierda), de *Humulus lupulus* (Cannabaceae).

4.3.3. FLAVONOIDES. REACCIÓN DE SHINODA

Los flavonoides resultaron ser uno de los principales constituyentes de las flores. Se puede observar en la **Figura 40 B**, que el resultado positivo para flavonoides fue más marcado en el extracto alcohólico e infusión de las inflorescencias, presentando una coloración rosa fuerte.

En cuanto a los extractos de las partes aéreas, la infusión de partes aéreas (Ipa) y el extracto de etanol de las partes aéreas (EOLpa) de muestra comercial, tal como se observa en la **Figura 40 A**, presentaron un color rosa muy tenue. El HCl concentrado en presencia del catalizador zinc metálico, genera hidrógeno naciente, el cual reduce el flavonoide produciendo el ión flavilio correspondiente, evidenciando una coloración desde rosa tenue a roja, la cual pasa a la fase amílca cuando se trata con alcohol amílico (Roger, 2013).

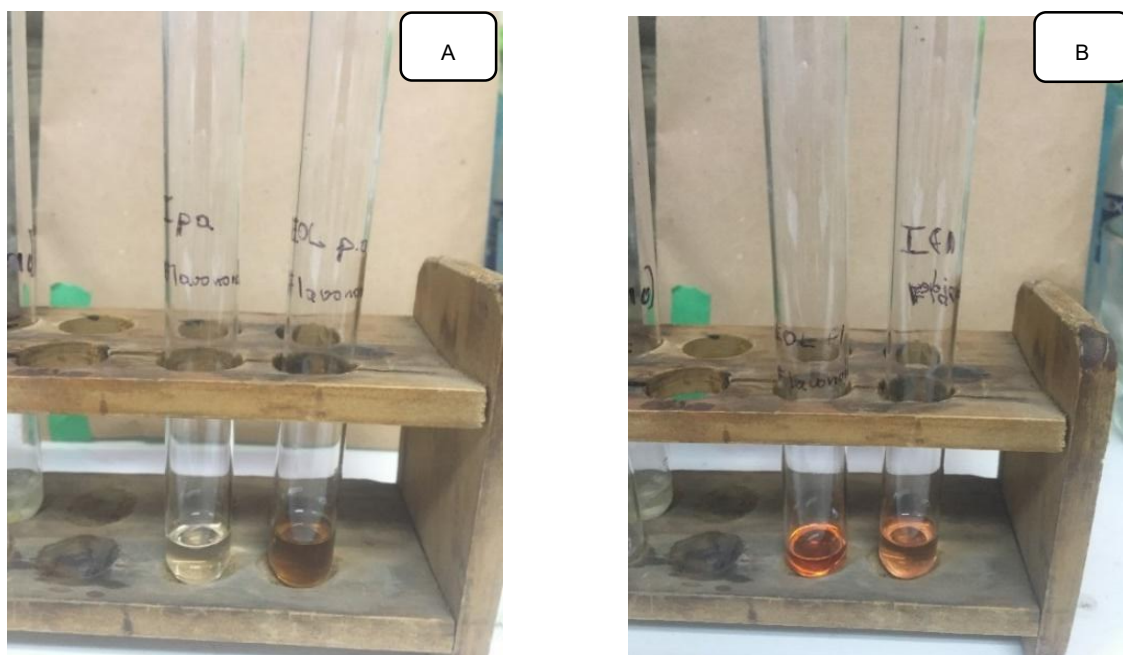


Figura 40. Resultados de la Reacción de Shinoda para Ipa y EOLpa (**A**) y EOLfl e Ifl (**B**), de *Humulus lupulus* (Cannabaceae).

4.3.4 HIDROXILOS FENÓLICOS. REACCIÓN CON FeCl_3 AL 1-2 %

El cloruro férrico reacciona con los hidroxilos fenólicos generando complejos de color amarillo, verde hasta verde grisáceo o azul negruzco (Roger, 2013). El reactivo forma complejos con los OH fenólicos originando compuestos coloreados, en donde si se trata de OH aislados el color evidenciado será amarillo. En cambio, sí en la muestra existen fenoles con OH adyacentes, el color

dependerá de cuántos OH son; si hubieran dos, el color será verde, verde grisáceo, y si fueran tres, será pardo oscuro, azul, negruzco (Roger, 2013).

Los resultados obtenidos en esta tesis se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados obtenidos a la reacción con FeCl_3 AL 1-2 % de los extractos alcohólicos de flores y partes aéreas e infusión de flores y partes aéreas.

EXTRACTO	Color / FeCl_3 AL 1-2 %
Extracto alcohólico flores	Negro
Extracto alcohólico partes aéreas.	Azul oscuro
Infusión flores	Azul oscuro
Infusión partes aéreas	Azul oscuro

El tricloruro de hierro al reaccionar con grupos fenólicos puede presentar la formación de compuestos coloreados, dado que los OH actúan como activadores del anillo bencénico, dando respuestas positivas en la presencia de coloraciones: verde, pardo oscuro al azul (Roger, 2013). *Los resultados fueron positivos para todos los extractos y se pudo determinar la presencia de polifenoles con tres oxidrilos adyacentes al presentar coloración negruzca.*

4.3.5 QUINONAS. REACCIÓN DE BORNTRÄGER

Como se indicó en la sección de metodología, también se prepararon otros extractos, además de las infusiones y los de etanol.

La determinación de quinonas se realizó sobre los extractos clorofórmicos de las partes aéreas y de las flores. La primer alícuota ensayada de cada extracto, como se observa en la **Figura 41**, resultó positiva para ambos extractos aunque muy tenue, ya que presentó una leve coloración amarilla en la fase acuosa. Este resultado al realizar la reacción de Bornträger directa, es indicativo de la presencia de antraquinonas libres aunque en cantidades muy bajas.

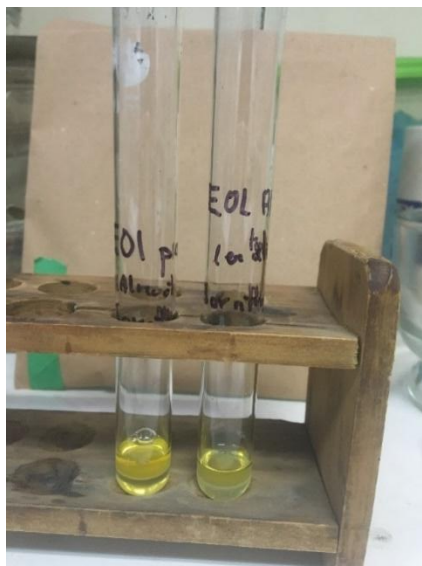


Figura 41. Resultados de la reacción directa de Bornträger para la primera alícuota de los extractos clorofórmicos de partes aéreas de muestra de la farmacia homeopática y flores provenientes de El Bolsón de *Humulus lupulus* (Cannabaceae).

A continuación, a fin de investigar la presencia de otros derivados de quinonas, se analizaron otras 2 alícuotas de cada extracto como se describió en la sección de metodologías de este trabajo de tesis, una para derivados reducidos de antraquinonas y la otra para dímeros y/o C-glicósidos.

En este caso la segunda alícuota, previo tratamiento con ácido nítrico antes de realizar la reacción de Bornträger, resultó negativa para ambos extractos, evidenciando la ausencia de derivados reducidos de antraquinonas. La **Figura 42** muestra los resultados obtenidos.

En cambio, en el tercer alícuota se observó para ambos extractos, resultado positivo evidenciado por la aparición de color rojo en la fase acuosa alcalina. Dado que el tratamiento previo a la reacción de Bornträger para esta alícuota, fue con cloruro férrico, ácido clorhídrico diluido y calor, el resultado observado demuestra la presencia de derivados de quinonas de tipo dímeros y/o C-glicósidos, tanto en partes aéreas como en flores. Los resultados se observan en la **Figura 43**.

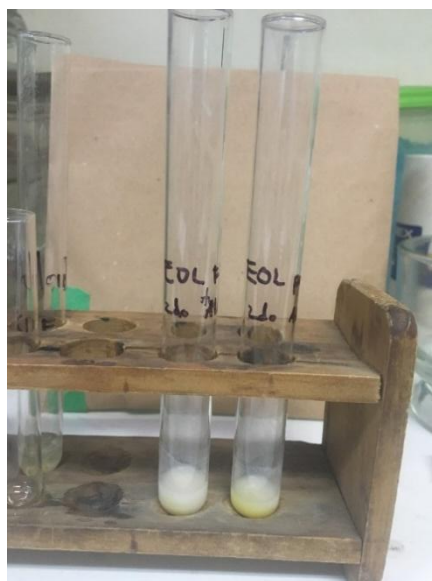


Figura 42. Resultados de la reacción de Bornträger para la segunda alícuota de los extractos clorofórmicos de partes aéreas de muestra de la farmacia homeopática y flores provenientes de El Bolsón de *Humulus lupulus* (Cannabaceae), previo tratamiento con ácido nítrico fumante.



Figura 43. Resultados de la reacción de Bornträger para la tercera alícuota de los extractos clorofórmicos de partes aéreas de muestra de la farmacia homeopática y flores provenientes de El Bolsón de *Humulus lupulus* (Cannabaceae), previo tratamiento por hidrólisis y/o degradación oxidativa.

4.3.6. ESTEROIDE / TRITERPENOS. LIEBERMANN-BURCHARD

La determinación se realizó sobre los extractos clorofórmicos de las partes aéreas (ECIpa) de la muestra comercial, y de las flores (ECIfi) provenientes de El Bolsón. Tal como se observa en la **Figura 44**, el extracto clorofórmico de partes aéreas resultó marcadamente positivo para esteroides, y el de flores fue positivo para triterpenos aunque con una coloración pardo amarillenta tenue.



Figura 44. Resultados de la reacción de Liebermann-Burchard para el extracto clorofórmico de las flores (ECIfi) provenientes de El Bolsón y de las partes aéreas (ECIpa) de la muestra comercial de *Humulus lupulus* (Cannabaceae).

4.3.7. ALCALOIDES. REACCIÓN CON EL REACTIVO DE DRAGENDORFF

El análisis de alcaloides y sustancias relacionadas mostró un resultado negativo para el extracto clorofórmico de flores. En cambio, el extracto clorofórmico de partes aéreas resultó positivo evidenciado por la formación de un precipitado pardo anaranjado, aunque tenue (**Figura 45**).

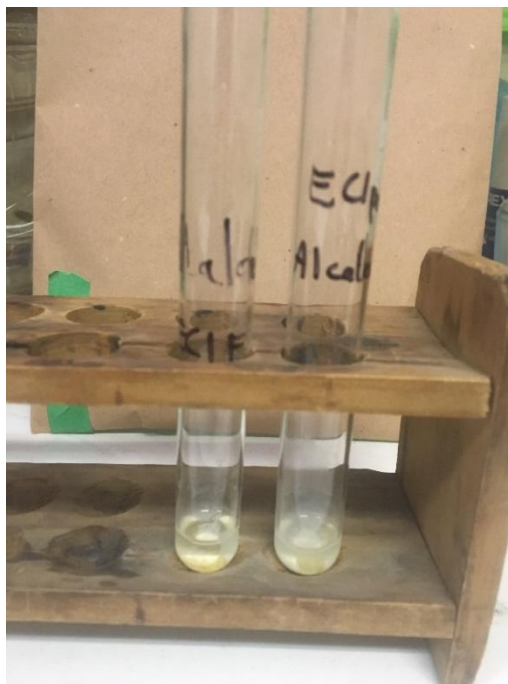


Figura 45. Resultados de la reacción de Dragendorff para los extractos de cloroformo de flores (ECIf) y de partes aéreas (ECIpa) de *Humulus lupulus* (Cannabaceae).

Para efectuar la reacción, una alícuota de cada extracto clorofórmico fue llevada a seco ya que la muestra debe estar libre de solvente orgánico para evitar que se redisuelva el precipitado que pudiera formarse. A continuación cada alícuota fue retomada en medio ácido con una solución de HCl diluido, a fin de formar los clorhidratos de los alcaloides que estuvieran presentes en los extractos. Estos clorhidratos formarán una sal doble con el reactivo de Drangendorff evidenciada por un precipitado, el cual es indicativo de resultado positivo. Si bien existen otros reactivos para este grupo de sustancias, se utilizó éste porque es el más sensible por lo que aún en presencia de cantidades muy bajas, permitirá ver el resultado.

En síntesis, tal como se observa en las **Tablas 3 y 4** el screening químico de las flores y de las partes aéreas permitió observar la presencia de una gran variabilidad de metabolitos, en donde hidratos de carbono, derivados fenólicos (flavonoides, polifenoles, quinonas), triterpenos, esteroides y alcaloides (sólo en las partes aéreas en este caso) resultaron ser los principales grupos químicos. En las Tablas se indica con – el resultado negativo y con +, el resultado positivo;

además a mayor cantidad de + significa mayor coloración lo cual evidencia más abundancia del grupo químico correspondiente.

Tabla 3. Resultados del screening fitoquímico de los extractos polares de *Humulus lupulus* (Cannabaceae).

Grupo químico	EOLpa	EOLfl	lpa	lfl
hidratos de carbono	-	-	-	-
Flavonoides	+++	++++	+	+++
OH fenólicos	++	+++	++	++

Tabla 4. Resultados del screening fitoquímico de los extractos clorofórmicos de *Humulus lupulus* (Cannabaceae).

Grupo químico	EClpa	ECIf
quinonas	++	++
esteroides	+++	+
Triterpenos	-	+
Alcaloides	+	-

4.4 RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS CROMATOGRÁFICOS

Considerando los resultados químicos generales obtenidos, así como los farmacológicos, seleccionamos para determinar los perfiles cromatográficos, aquellos extractos enriquecidos en metabolitos que guardan mayor relación con las actividades farmacológicas evidenciadas.

Los perfiles cromatográficos planares mostraron flavonoides y derivados en los extractos polares, mientras que los correspondientes a los extractos de cloroformo y éter etílico resultaron más complejos aun evidenciando además la presencia de terpenos volátiles.

Mediante cromatografía planar sobre Sílica Gel G60F₂₅₄, empleando como fase móvil acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético glacial - agua (100:11:11:26) y rutina como sustancia patrón, el cromatograma de los extractos de etanol y las infusiones de las partes aéreas y de las flores, revelado con luz UV (a 254 y 365 nm) y con el reactivo específico Natural Product seguido de Polietilenglicol (NP-PEG), mostró flavonoides y fenoles simples. La **Figura 46**, presenta el cromatograma obtenido revelado mediante luz UV a 254 nm (**A**), luz UV a 365 nm (**B**) y con NP-PEG (**C**).

La fase móvil empleada es adecuada como sistema de detección para la investigación de glucósidos flavonoides.

Luz 254nm. Todos los flavonoides provocan la extinción de la fluorescencia.

Luz 365nm. Dependiendo del tipo estructural, los flavonoides muestran una fluorescencia de color amarillo oscuro, verde o azul, que se intensifica y modifica mediante el uso de diversos reactivos en aerosol.

Reactivo de productos naturales (NP/PEG)

La fluorescencia intensa típica en UV-365, se produce inmediatamente al rociar el reactivo.

La adición de una solución de polietilenglicol reduce el límite de detección e intensifica el comportamiento de la fluorescencia, los mismos que dependen de la estructura química:

Flavonoles: quercetina, miricetina y sus glicósidos.	Naranja-amarillo
Kaempferol, isorhamnetina y sus glicósidos.	Amarillo-verde
Flavonas: luteolina y sus glicósidos	Naranja
Apigenina y sus glicósidos	Amarillo-verde

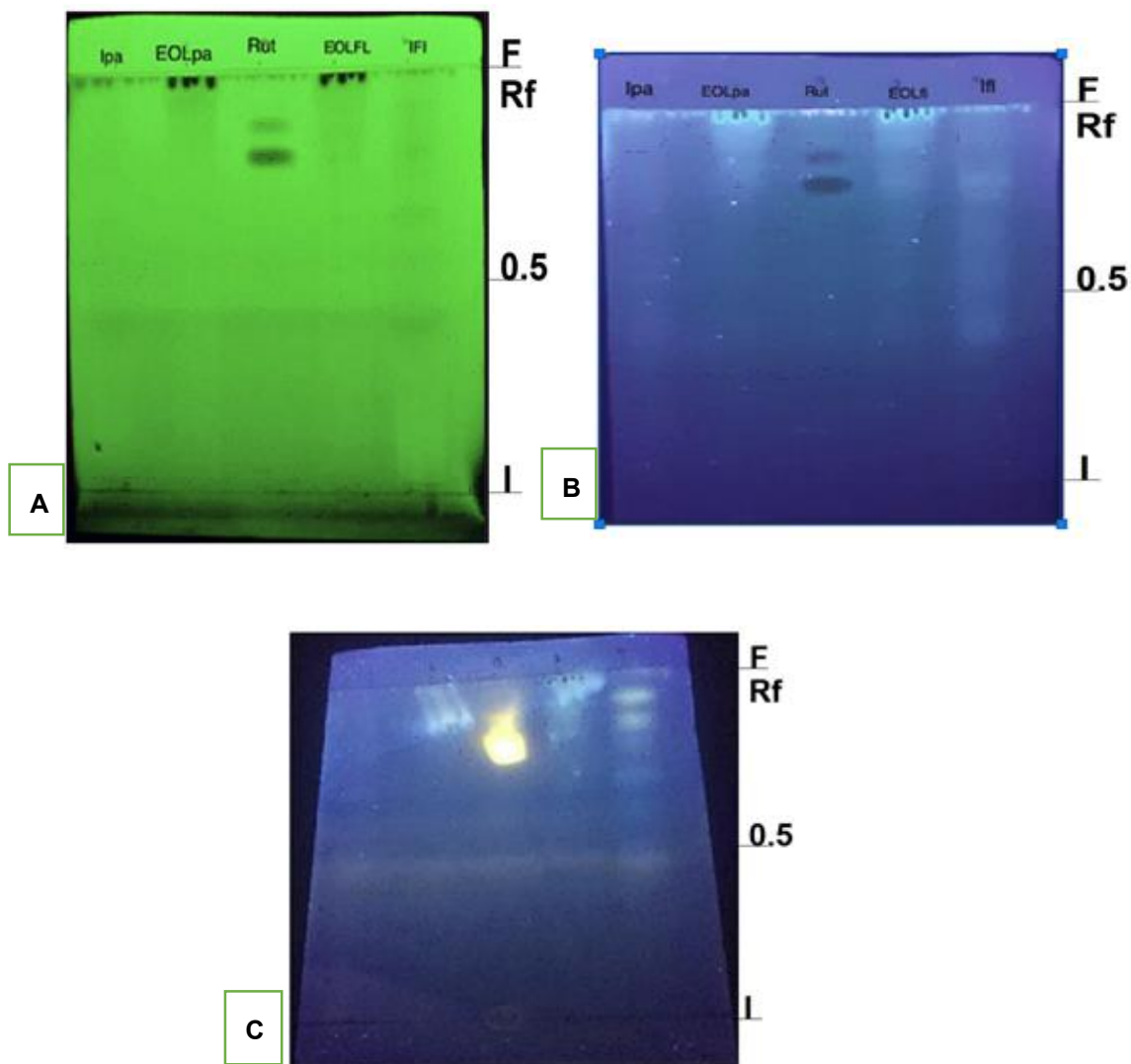


Figura 46. Cromatograma obtenido mediante cromatografía planar para los extractos etanólicos y las infusiones de partes aéreas de muestra comercial y de flores de El Bolsón de *Humulus lupulus* (Cannabaceae), revelado con luz UV a 254 nm (A), luz UV a 365 nm (B) y NP-PEG (C).

Para la identificación de los metabolitos, se realizaron los cálculos de R_f para cada sustancia separada de cada extracto y se compararon con el R_f de la rutina empleada como sustancia patrón y con R_f de compuestos descritos en bibliografía (Wagner y Bladt, 1996). Los resultados se muestran en la **Tabla 5**.

Para calcular los R_f , se aplicó la fórmula que se presenta más abajo a modo de ejemplo para el patrón rutina.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia (cm)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente (cm)}} = \frac{6,5}{8,3} = 0,78$$

Tabla 5. Resultados de la determinación de perfiles cromatográficos planares orientados a flavonoides, de los extractos polares de *Humulus lupulus* (Cannabaceae).

EXTRACTO ALCOHÓLICO DE PARTES AEREAS	
Compuesto probable	R_f / Color NP-PEG
rutina	0,72/naranja
glicósidos flavonoides	0,48/celeste
glicósidos flavonoides	0,35/naranja
EXTRACTO ALCOHÓLICO DE FLORES	
Compuesto probable	R_f / Color
rutina	0,72 / naranja
glicósidos flavonoides	0,48/celeste
glicósidos flavonoides	0,35/naranja
INFUSIÓN DE FLORES	
Compuesto probable	R_f /Color
Flavonoles	0,8/naranja
Glicósidos	0,75/naranja
Glicósidos	0,72 / naranja

Quercetina	0,68/morado
glucosidos secoiridooides	0,61 / celeste
glucosidos flavonoide	0,48/celeste
glucosidos flavonoides	0,58/púrpura
glucosidos flavonoides	0,5/púrpura
glucosidos flavonoides	0,35/naranja

Los extractos alcohólicos de partes aéreas del lúpulo adquirido en la farmacia homeopática de La Plata y las partes aéreas del lúpulo del Bolsón, contienen principalmente rutina fluorescente de color naranja R_f 0,7, y la presencia de hiperósido y ácido clorogénico azul con el reactivo NP/PEG UV-356. Los resultados fueron comparados con lo descrito en la Bibliografía de Wagner y Bladt.

En una comparación realizada con la especie *Menyanthidis foliun* descrita en la bibliografía de Wagner y Bladt, en el cual se utiliza la misma fase móvil y de detección de nuestra planta en estudio, se pudo observar la presencia de zonas azuladas brillantes en el rango R_f 0,6-0,8 que indica la presencia de glicósidos secoiridooides; y glucósidos flavonoides adicionales de color amarillo-marrón en el rango R_f 0,2-0,5.

Por otra parte, mediante cromatografía planar de adsorción sobre Sílica Gel G60F₂₅₄, empleando también la fase móvil acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético glacial - agua (100:11:11:26), los extractos de éter etílico, cloroformo y etanol de las flores, y los extractos de cloroformo y de etanol de las partes aéreas, revelados con vainillín sulfúrico, mostraron un perfil complejo. La **Figura 47** presenta el cromatograma obtenido observado a la luz UV a 254 nm (**A**) y a la luz UV a 365 nm (**B**), previo tratamiento con el revelador específico.

B

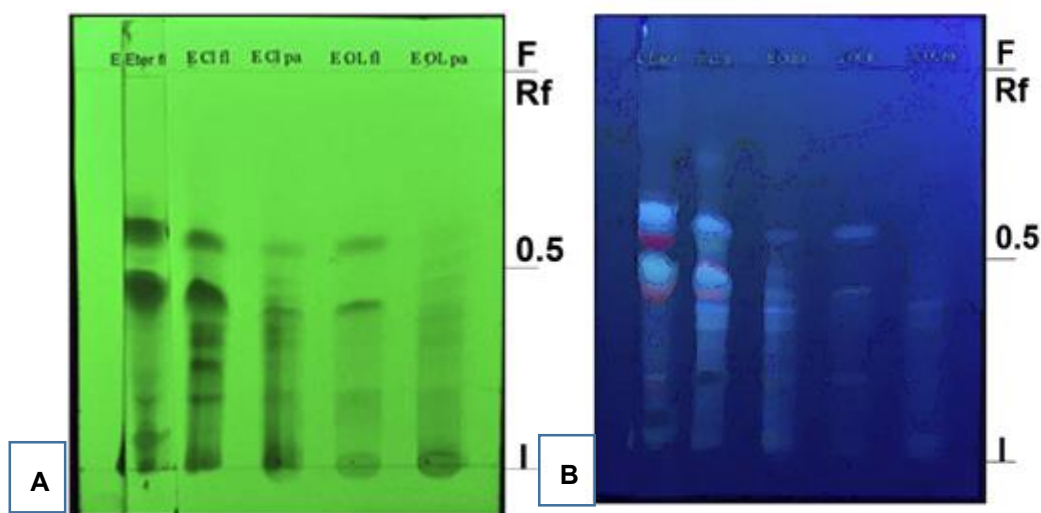


Figura 47. Cromatograma obtenido mediante cromatografía planar de adsorción para los extractos de éter etílico, cloroformo y etanol de las flores de lúpulo de El Bolsón, y los extractos de cloroformo y etanol de las partes aéreas de muestra comercial de *Humulus lupulus* (Cannabaceae), revelado con vainillín sulfúrico y observados a la luz UV a 254 nm (A) y a 365 nm (B).

Para la identificación de los metabolitos, se realizaron los cálculos de R_f para cada sustancia separada como se indicó en párrafos anteriores y se compararon con los descritos en bibliografía (Wagner y Bladt, 1996). La **Tabla 6** presenta los resultados obtenidos para todos los extractos.

Tabla 6. Resultados de la determinación de perfiles cromatográficos planares de los extractos de éter etílico, cloroformo y etanol de las flores de lúpulo de El Bolsón, y de cloroformo y etanol de partes aéreas de la muestra de la farmacia homeopática de *Humulus lupulus* (Cannabaceae).

EXTRACTO DE ETHER ETILICO DE FLORES	
Compuesto probable	R_f / color (vainillín sulfúrico – UV a 365 nm)
lupulona	0,25 / azul
humulona	0,50/azul
rutina	0,40/ amarillo
EXTRACTO CLOROFORMICO DE FLORES	
Compuesto probable	R_f / color (vainillín sulfúrico – UV a 365 nm)
lupulona	0,25 / azul
humulona	0,50 / azul
rutina	0,40 / amarillo
EXTRACTO CLOROFORMICO DE PARTES AEREAS	

Compuesto probable	Rf / color (vainillín sulfúrico – UV a 365 nm)
rutina	0,4 / amarillo
EXTRACTO DE ETANOL DE FLORES	
Compuesto probable	Rf / color (vainillín sulfúrico – UV a 365 nm)
rutina	0,25 / azul

El tratamiento con reactivo NP/PEG genera en UV-365nm fluorescencias predominantemente anaranjadas y amarillo verdosas para el tipo flavona y flavanol y una verde oscura para el tipo flavanona. Los ácidos fenolcarboxílicos, que se encuentran frecuentemente en los flavonoides, aparecen como zonas intensas de color azul claro.

El extracto de éter etílico de lúpulo muestra los derivados de floroglucina lupulona R_f 0,25 y humulona R_f 0,50 con fluorescencia azul claro en UV-365 nm (B), y con zonas oscuras muy marcadas en UV-254 nm (B) y como zonas amarillas después del agregado del reactivo Vainillin Sulfúrico (c). Ambos compuestos son inestables y se transforman en “ácidos amargos” y luego se encuentran en valores de R_f más bajos, también como zonas fluorescentes azules, extintoras y de color rojo anaranjado. Los datos obtenidos en este estudio coinciden con la cromatografía realizada a los conos de lúpulo, descritos en la bibliografía de Wagner y Bladt, 1996, en donde se analizó el extracto de etanólico y de éter de los conos frescos de lúpulo utilizando el mismo sistema solvente y de detección de nuestro estudio

A fin de analizar la composición de los extractos de éter etílico, cloroformo, etanol, agua (infusión) y aceite volátil de las flores, y de los extractos de cloroformo, etanol y agua (infusión) de las partes aéreas, en relación a los terpenos, se efectuó una cromatografía planar de adsorción sobre sílica Gel G60 F₂₅₄, empleando como fase móvil tolueno - acetato de etilo (97:3), mentol como sustancia patrón y vainillín sulfúrico como revelador. El cromatograma obtenido observado a la luz UV a 254 nm (**A**) y a la luz UV a 365 nm (**B**), previo tratamiento con el revelador, mostró un complejo perfil para los extractos de cloroformo de partes aéreas y de flores, y de éter etílico de flores, tal como se observa en la

Figura 47. En cambio, para el extracto de etanol de partes aéreas y para las infusiones, no se observaron resultados. La **Tabla 6** presenta los principales resultados del perfil cromatográfico planar.

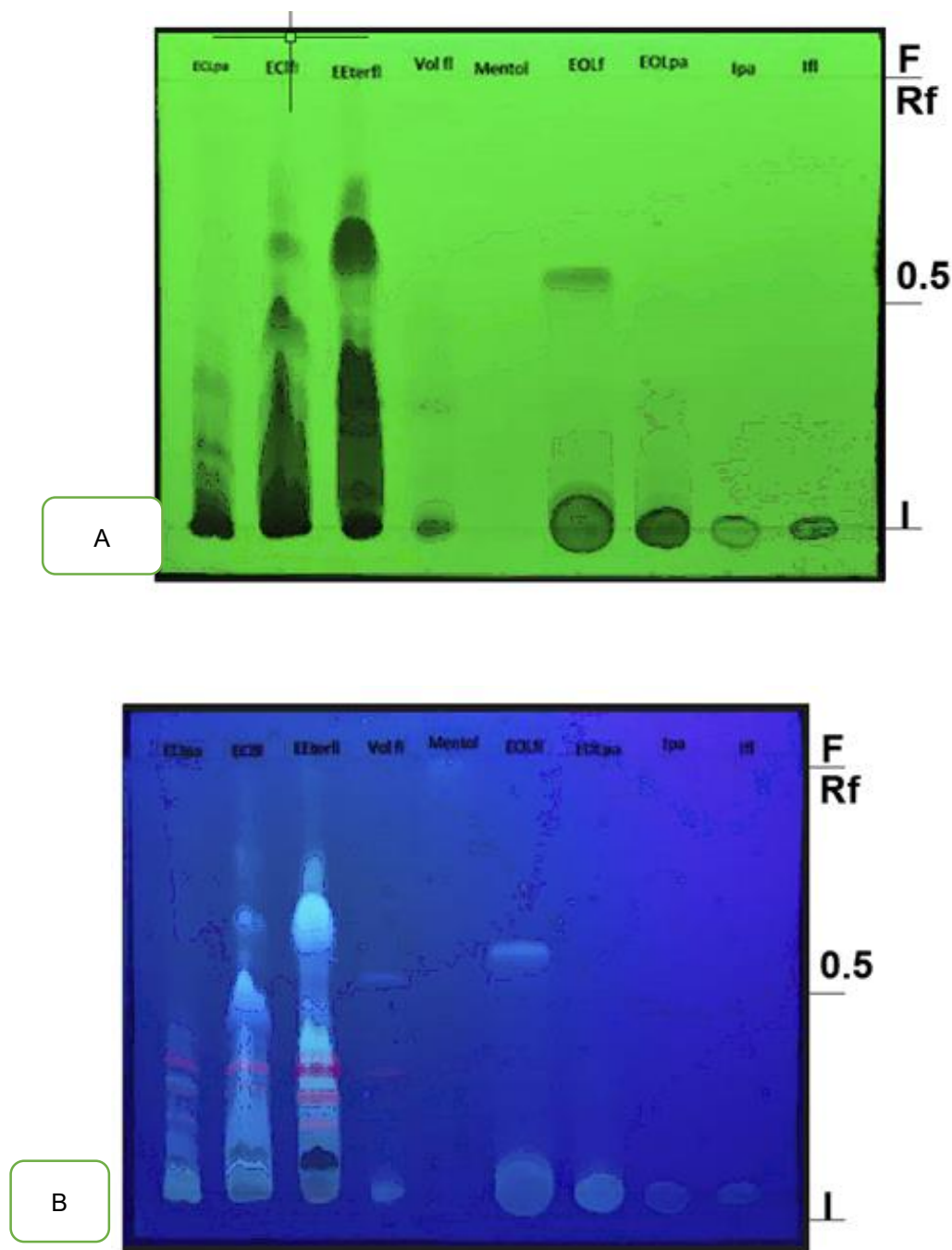


Figura 47. Cromatograma obtenido mediante cromatografía planar de adsorción para los extractos de éter etílico, cloroformo, etanol, infusión y aceite volátil de las flores de **lúpulo de El Bolsón**, y los extractos de cloroformo, etanol e infusión de las partes aéreas de *Humulus lupulus* (Cannabaceae), revelado con vainillín sulfúrico y observados a la luz UV a 254 nm (A) y a 365 nm (B).

Tabla 6. Resultados de la determinación de perfiles cromatográficos planares de los extractos de éter etílico, cloroformo, etanol, infusión y aceite volátil de las flores de lúpulo de El Bolsón, y de cloroformo, etanol e infusión de partes aéreas de *Humulus lupulus* procedente de la farmacia homeopática (Cannabaceae).

EXTRACTO CLOROFORMICO DE PARTES AEREAS	
Compuesto probable	Rf/Color (vainillín sulfúrico – UV a 365 nm)
Mentol	0,30 azul
EXTRACTO CLOROFORMICO DE FLORES	
Compuesto probable	Rf/Color (vainillín sulfúrico – UV a 365 nm)
Espatulenol	0,26 /violeta
Mentol	0,30 / azul
Cineol	0,42 azul
acetato de mentilo	0,75 azul
EXTRACTO ETER FLORES	
Compuesto probable	Rf/Color (vainillín sulfúrico – UV a 365 nm)
Terpenos alcohólicos	0,15 /azul
Lupulona	0,25 /verde azulado
Humuleno	0,5 / azul
VOLATILES	
Compuesto probable	Rf/Color (vainillín sulfúrico – UV a 365 nm)
Alfa-terpineol	0,25/azul
Mentol	0,30/azul
Citral	0,42/azul

Timol	0,5/azul
EXTRACTO ALCOHOLICO DE FLORES	
Compuesto probable	Rf/Color (vainillín sulfúrico - UV a 365 nm)
Isomentona	0,5/azul

Para evaluar la presencia de aceites esenciales como revelador se utilizó vainillín sulfúrico, en donde los compuestos de aceites esenciales muestran una fuerte coloración azul, verde, roja y marrón, pero ninguna fluorescencia bajo UV-355.

Después del tratamiento con el reactivo vainillín sulfúrico, los alcoholes monoterpénicos y sus ésteres, el cineol, el aldehído citral y citronelal muestran un color azul o azul violeta. Los derivados de fenilpropano safrol, anetol, miristicina, apiol y eugenol son de color marrón rojizo/violeta, mientras que el timol y el carvón son de rojo a rojo violeta; la piperitona muestra un color naranja típico.

Los compuestos comerciales de referencia a menudo muestran zonas adicionales al inicio o en el rango bajo de R_f , esto puede deberse a resinificación, productos de descomposición o impurezas eliminadas de forma incompleta. (Wagner y Bladt, 1996)

Los resultados del análisis cromatográfico de *Menta Piperitea* descrito por Walter y Bland, indica la presencia de mentol en el R_f 0,30, coincidiendo con el resultado de la sustancia de referencia utilizada, en donde también se pudieron determinar las bandas de color azul que indican la presencia de terpenos en los extractos EC|pa y Volátiles

En el extracto clorofórmico de flores se puede evidenciar en R_f 0,75, un prominente color azul que indica la presencia de acetato de metilo, resultado comparado con lo descrito en la Bibliografía de Walgner

En el extracto alcohólico de flores, presenta una intensa franja color rojo frambuesa en Rf 0,5, indicando la presencia de Timol, resultado que fue comparado con el cromatograma del aceite esencial de las semillas de comino; según lo descrito en la bibliografía de Walgner y Brant

En el extracto alcohólico de Rosmarini Folium, muestra con reactivo de vainillin sulfurico seis zonas principalmente azules en el rango de RF 0,25-0,45 con cineol como zona principal. Debido al origen vegetal, la cantidad de alcoholes terpénicos en el rango Rf por debajo del cineol.

4.5 RESULTADOS DEL ESTUDIO MEDIANTE CROMATOGRAFIA INSTRUMENTAL EMPLEANDO RP-HPLC-DAD

Como se describió en el apartado anterior, los perfiles cromatográficos planares mostraron flavonoides y derivados, fundamentalmente en los extractos de mayor polaridad, mientras que los extractos de cloroformo resultaron más complejos.

A fin de profundizar los estudios, se efectuaron análisis mediante RP-HPLC-DAD empleando el sistema descrito en el apartado de metodologías de este trabajo de tesis. Así fue posible identificar los principales flavonoides, destacándose derivados prenilados, flavonas e isoflavonas fundamentalmente en el extracto de etanol de 70° de las flores (**Figura 48**). Los otros extractos polares también contenían flavonoides prenilados y restos de isoflavonas.

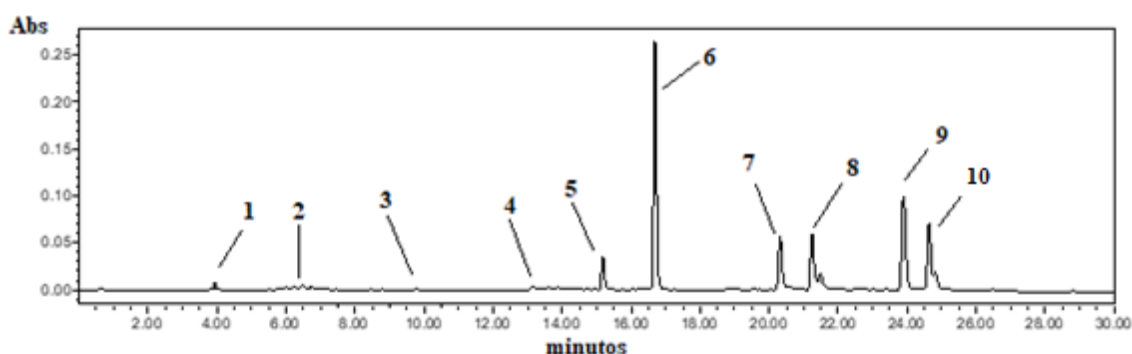
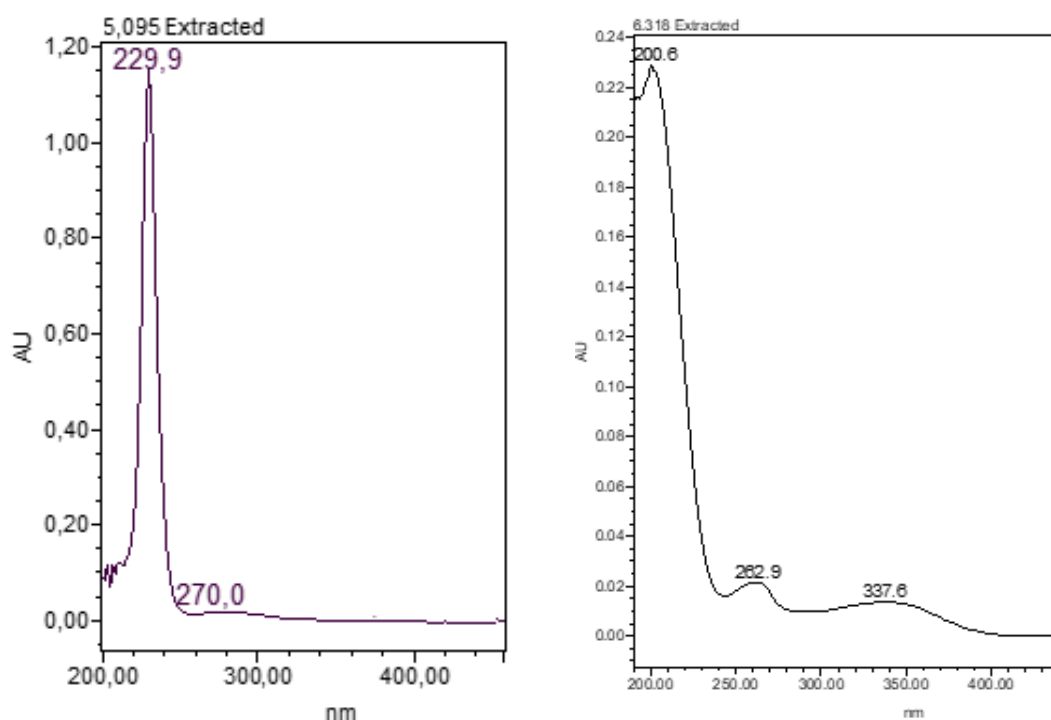


Figura 48. Cromatograma del extracto de etanol de 70° de las flores de *Humulus lupulus* (Cannabaceae) proveniente de El Bolsón, obtenido mediante RP-HPLC-DAD a 365 nm. (1. genistina, 2. flavona glicosilada, 3. daidzeína, 4. cohulupona, 5. fisetina, 6. xanthumol, 7. baicaleína, 8. 3',4'-dimetoxiflavona / xantomicro (trimetoxiflavona), 9. colupulona, 10. lupulona).

Para la identificación de los compuestos se emplearon estándares (rutina, quercetina, ácido gálico, isoflavonas, entre otros) y se compararon con los descriptos en bibliografía (Campos y Markham, 2007; Hsu *et al.*, 2019).

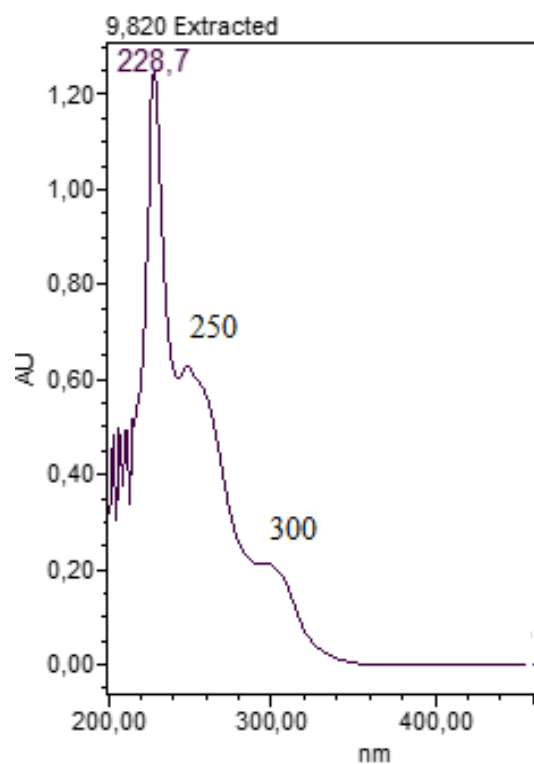
Mediante el empleo del detector DAD fue posible determinar los espectros de cada sustancia separada en la fase móvil. Los espectros fueron comparados con los de sustancias estándares y con los descriptos en bibliografía, pudiendo identificar los metabolitos por sus tiempos de retención, por los máximos de absorción y por la forma del espectro correspondiente.

A continuación se presentan los espectros obtenidos (**Figura 49**).

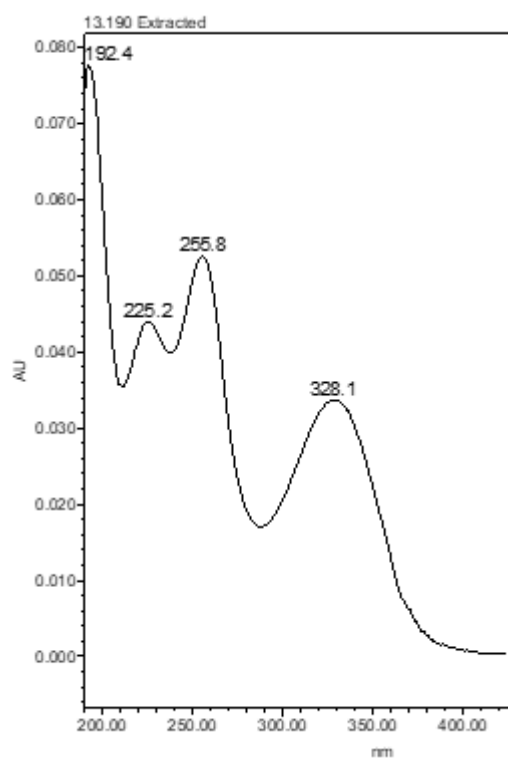


1. genistina (genisteína-7-O-glucósido)

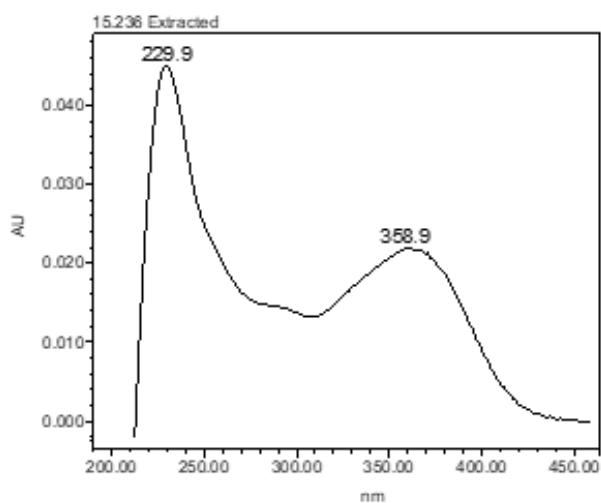
2. glicosilflavona



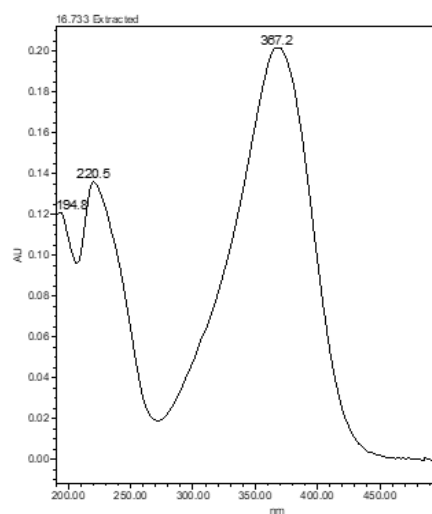
3. daidzeína



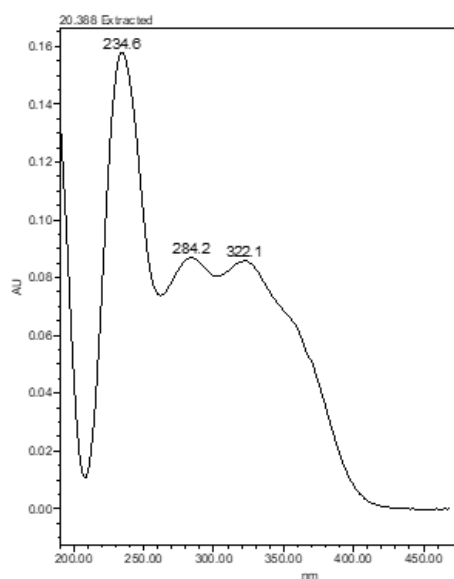
4. Cohulupona



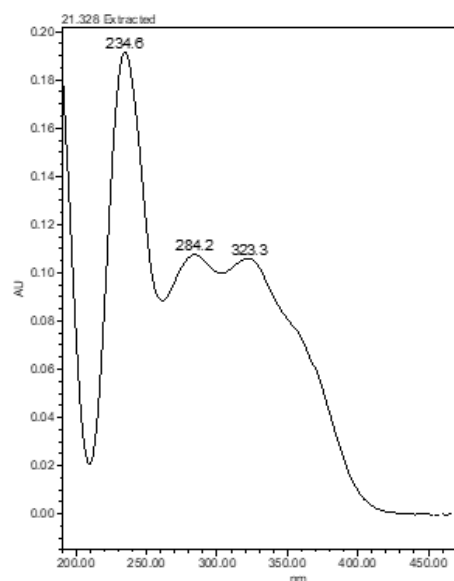
5. fisetina



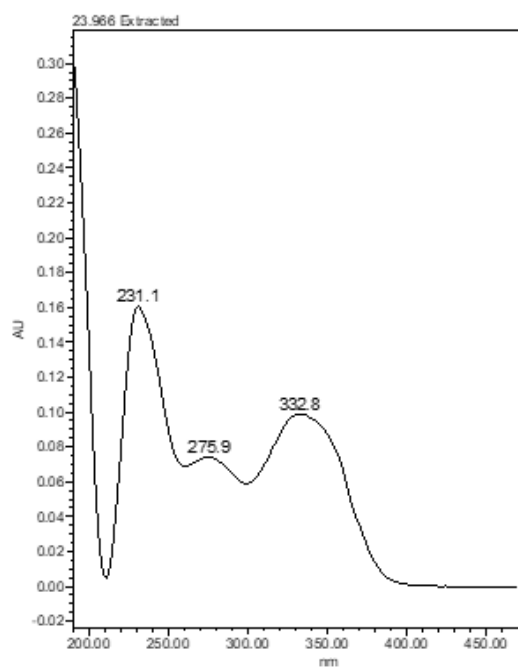
6. xanthohumol



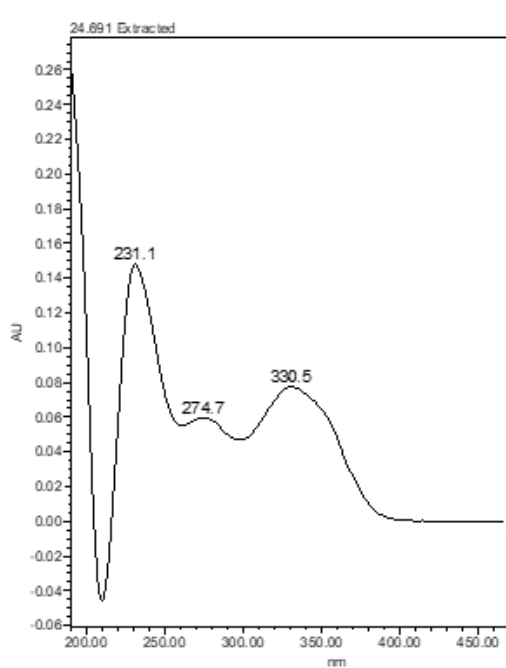
7. baicaleína



**8. 3',4'-dimetoxiflavona / xanthomicrol
(trimetoxiflavona)**



9. colupulona



10. lupulona

Figura 49. Espectros obtenidos mediante el detector de arreglo de diodos, en la fase móvil del sistema de RP-HPLC empleado, correspondientes a los metabolitos del extracto de etanol de 70° de las flores de *Humulus lupulus* (Cannabaceae) proveniente de El Bolsón.

4.6 RESULTADOS DEL ESTUDIO MEDIANTE CROMATOGRAFIA INSTRUMENTAL EMPLEANDO CG-MS

A partir de los resultados observados mediante cromatografía planar, para los extractos menos polares, se seleccionó el extracto de cloroformo para su análisis por cromatografía gaseosa empleando como detector un espectrómetro de masa (CG-MS), tal como se describió en la sección de metodologías de este trabajo de tesis.

El perfil cromatográfico obtenido evidenció la presencia de terpenos, derivados de ácidos grasos de cadena corta e hidrocarburos (**Figura 50**).

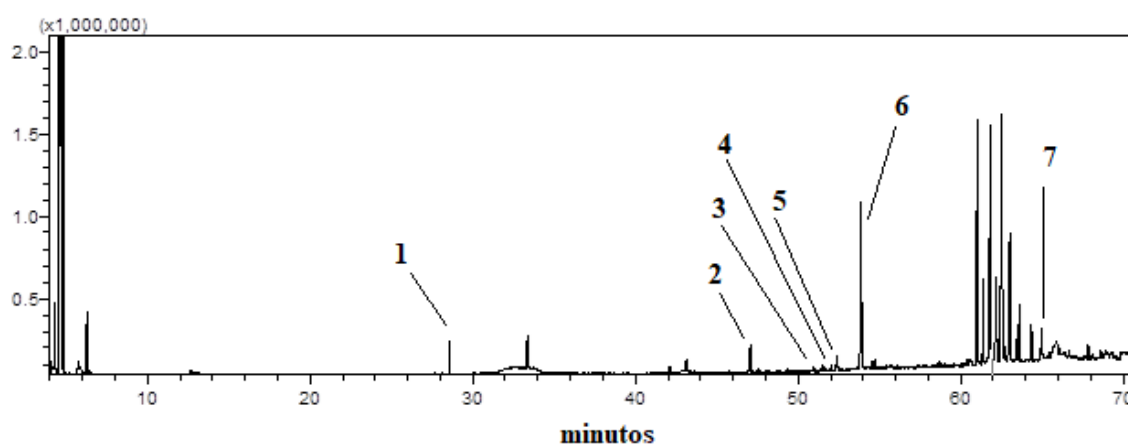
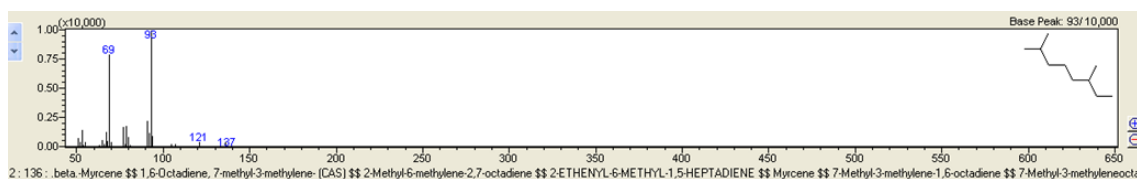


Figura 50. Cromatograma del extracto clorofórmico de flores de *Humulus lupulus* (Cannabaceae), obtenido mediante CG-MS. 1. β -mirceno, 2. triacetina, 3. *t*-cariofileno, 4. β -farneseno, 5. α -humuleno, 6. anhídrido caproico, 7. isochiapin B, entre 6 y 7 hidrocarburos.

La identificación de los compuestos se realizó mediante la biblioteca de espectros de masa tal como se indicó en la sección de metodologías de este trabajo de tesis y por comparación con estándares y bibliografía. La **Figura 51** muestra los espectros de masa obtenidos para cada uno de los metabolitos identificados.



5. DISCUSSION



5.1 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS

5.1.1 EFECTOS ANTIESPASMÓDICOS

En esta tesis se demostró que la tintura de lúpulo redujo la contracción en los 3 tipos de músculo liso visceral, intestino, vejiga y útero, demostrando acción antiespasmódica. La tintura de lúpulo inhibió las CCR de carbacol comportándose como antagonista no-competitivo en las tres preparaciones de músculo liso, intestino, útero y vejiga estudiadas. Este comportamiento no-competitivo sugiere que la tintura no actuó en el receptor muscarínico, sino en un sitio diferente. Además, la tintura de lúpulo también se comportó como antagonista no-competitivo de las CCR de Ca^{2+} en la vejiga aislada. Esto sugiere que los componentes de la tintura han inhibido el influjo de Ca^{2+} al músculo liso, o la activación de calmodulina, actuando en un sitio diferente al de unión del ión Ca^{2+} en su canal tipo L, que está ubicado del lado extracelular de las subunidades proteicas que forman el canal (Spedding, 1985). Esta inhibición no-competitiva es similar a la encontrada con verapamilo, que es un conocido bloqueante de los canales de Ca^{2+} y actúa inhibiendo un sitio diferente al de unión del Ca^{2+} , ubicado en el interior del canal, al que accede desde el espacio intracelular y lo bloquea en el estado inactivado dependiendo del voltaje y de la frecuencia (Ishii *et al.* 1985). En trabajos previos se demostró el mismo comportamiento de verapamilo en intestino aislado de rata (Blanco *et al.* 2013). Un análogo comportamiento antiespasmódico no-competitivo fue también encontrado con otros flavonoides como quercetina y vitexina, y con extractos de plantas ricos en flavonoides, que actúan como relajantes del músculo liso e inhibidores no-competitivos de los canales de Ca^{2+} (Ragone *et al.* 2007; Nigusse *et al.* 2019; Bernal-Ochoa *et al.* 2021).

Esta actividad antiespasmódica podría deberse a la presencia de los flavonoides encontrados en el extracto de lúpulo, los que además tienen propiedades antioxidantes y en consecuencia se postulan como preventivos de enfermedades cardiovasculares e intestinales (Chadwick *et al.* 2006). De hecho,

se describió actividad antioxidante en el lúpulo, atribuida a los múltiples polifenoles que posee (Bolton *et al.* 2019). En estudios previos se determinó una mayor presencia de flavonoides en las inflorescencias que en las partes aéreas de la planta; además en el extracto etanólico se evidenció mayor proporción que en la decocción (Bolton *et al.* 2019; Astray *et al.* 2020). En esta tesis se puso en evidencia la presencia de flavonoides en el extracto etanólico de las inflorescencias, y la composición fue determinada en los perfiles cromatográficos planares y mediante el análisis por HPLC de la tintura de lúpulo, la cual resultó similar a la demostrada previamente por otros autores (Kao y Wu, 2013). Dentro de los principios amargos del lúpulo, los derivados flavonoides prenilados representan los componentes mayoritarios. El xantohumol, la lupulona y la colupulona se identificaron en el cromatograma obtenido mediante RP-HPLC-DAD, a partir de la comparación de los espectros correspondientes con los de estándares y con lo descrito en la bibliografía (Hsu y Kao 2019; Kao y Wu, 2013).

Los flavonoides prenilados como el xantohumol tienen propiedades antioxidantes e inhiben la peroxidación lipídica (Bolton *et al.*, 2019; Kontek, 2021). Aunque el xantohumol ha sido descrito como el componente principal del lúpulo, se considera que el efecto del extracto de lúpulo puede ser superior al de este metabolito debido al sinergismo con otros componentes que se determinaron en el extracto. El xantohumol se metaboliza mediante isoenzimas CYP450 a metabolitos como 8-fenilnaringenina (8-PN), que fue descrito como poseedor de actividad estrogénica (Bolton *et al.*, 2019). Además, recientemente se ha encontrado que el xantohumol y los beta-ácidos lupulona y colupulona exhiben actividad antimicrobiana y antiinflamatoria en un modelo de infección intestinal en rata por *Clostridium difficile* (Sleha *et al.*, 2021). Por otra parte, se encontró que el xantohumol carece de efecto sobre la microbiota intestinal (Hanske *et al.*, 2005). Sin embargo, no se había descrito previamente el efecto de xantohumol o del lúpulo sobre la motilidad intestinal o de otras vísceras, tema abordado en esta Tesis.

Otros componentes encontrados en el extracto, como los beta-ácidos cohulupona, colupulona y lupulona, demostraron efectos benéficos derivados de su acción antioxidante potente y de su efecto reductor de la expresión de la

enzima NO-sintasa inducible (iNOS) en situaciones inflamatorias (Karabin *et al.*, 2016). Además, se demostró la presencia de glicosil-flavona y dimetoxi- y trimetoxi-flavonas mediante el HPLC-DAD. Estos polifenoles también tienen actividad antioxidante y activan a la NO-sintasa endotelial (eNOS) por lo cual resultaron ser vasodilatadores (Karabin *et al.*, 2016). Otro flavonoide encontrado, baicaleína, actúa como potente captador de radicales libres e inhibidor de la xantina-oxidasa, potencialmente mejorando situaciones de estrés oxidativo (Huang *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2017). Por otro lado, se encontró en el lúpulo al flavonoide fisetina, que demostró tener muchas actividades biológicas, tales como ser anti-oxidante, antiinflamatorio, antitumorigénico, y neuroprotector, además de reducir la pérdida de masa ósea (Yamaura *et al.*, 2022).

Las isoflavonas genisteína y daidzeína fueron reportadas como relajantes del músculo liso, tanto gastrointestinal (Zhang *et al.*, 2014) como prostático (Huang *et al.*, 2022) y vascular (Speroni *et al.*, 2007). En todos los casos, el mecanismo se asoció a la inhibición no-competitiva de las CCR de diversos agonistas, y de las CCR de calcio, y en algunos casos a la activación de canales de potasio. Por otra parte, el isómero de 8-fenilnaringenina, (2S)-8-PN, es un bien conocido y potente compuesto estrogénico derivado del lúpulo, que ha mostrado ser un vasodilatador por bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo L (Sekiguchi *et al.*, 2018). Por lo tanto, todos estos componentes del extracto de lúpulo pueden haber contribuido al sinergismo como antiespasmódicos.

Los efectos de la tintura de lúpulo en el intestino delgado consistentes en la inhibición de la contracción mediada por carbacol ocurrieron a una concentración inhibitoria al 50 % (CI₅₀: $82,4 \pm 21,8$ µg de lúpulo/ml o $22,6 \pm 6,0$ µg de extracto seco/ml) similar a la encontrada en el útero (CI₅₀: $70,0 \pm 20,0$ µg de lúpulo/ml o $19,2 \pm 5,5$ µg de extracto seco/ml). Por otra parte, en la vejiga se observó una ligeramente mayor sensibilidad de la contracción muscarínica a la inhibición por tintura de lúpulo (CI₅₀ $45,6 \pm 13,0$ µg de lúpulo/ml o $12,5 \pm 3,6$ µg de extracto seco/ml). Sin embargo, se observó menor sensibilidad en la CCR de Ca^{2+} en la vejiga (CI₅₀ $313,8 \pm 43,8$ µg lúpulo/ml o $86,0 \pm 12,0$ µg extracto seco/ml). Este comportamiento podría sugerir que en la vejiga participan más de un mecanismo antiespasmódico, frente al sinergismo entre diversos

componentes, en diversos sitios de interferencia, siendo uno de ellos los canales de Ca^{2+} .

Estos resultados de la tesis dan base científica al uso tradicional del lúpulo reportado en Medlineplus (2021) para tratar calambres intestinales y vejiga hiperactiva.

5.1.2 EFECTOS CENTRALES

En los últimos años se ha centrado el interés en el uso del lúpulo por sus características biológicas y sus componentes fitoquímicos útiles para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.

Recientemente se ha descrito que el xantohumol en dosis de 10 a 20 mg/kg vía i.p. demostró un comportamiento antidepresivo en un modelo de neuroinflamación por lipopolisacáridos en ratones (Rahman *et al.*, 2021). Además, se ha indicado que el lúpulo tiene propiedades sedantes dependientes del contenido de polifenoles, lo cual a su vez varía con la época y condiciones de colección y con la variedad de la planta. Por ello, diferentes variedades tienen diverso grado de acción sedante, así como difieren en el contenido de flavonoides. Se ha indicado que la humulona se enlaza y activa al receptor GABA-A, que es un canal de cloruro que al activarse genera hiperpolarización neuronal, mientras el xantohumol se une para generar acción antioxidante (Meissner *et al.* 2006). Sobre el receptor GABA-A también actúan las benzodiazepinas, como reguladores alostéricos positivos, generando desde ansiolisis a sedación. En lúpulo fueron descritos los flavonoides 2S-naringenina y rutina, y las flavonas glicosil-flavona, dimetoxi- y trimetoxi-flavonas, que pueden interactuar con el receptor GABA-A, produciendo sedación, y ansiolisis, y mostraron efectos sedantes in vivo (Jäger y Saaby, 2011).

En esta tesis se demuestra que el extracto acuoso del lúpulo proveniente de la Patagonia (cultivado para saborizar la cerveza) no modificó significativamente la locomoción espontánea ni las exploraciones de ratones en el test de campo abierto (Figs. 25). A diferencia de ello, diazepam a dosis de 1 mg/kg redujo significativamente la exploración espontánea y mostró tendencia a

reducir la locomoción espontánea. En cambio, la tintura (extracto alcohólico) del lúpulo proveniente de las afueras de La Plata no modificó la movilidad espontánea, pero sí redujo la exploración espontánea de los ratones en el test de campo abierto, a las dosis de 100 y 330 mg lúpulo/kg, similar al efecto de diazepam 1 mg/kg (Figs. 23 y 24). Esto refleja una leve actividad sedante en la tintura de lúpulo, afectando más la capacidad exploratoria que la movilidad espontánea.

Por otra parte, en el test de supresión de alimento se demostró una actividad ansiolítica sólo en la dosis de 33 mg/kg de la tintura de lúpulo de la Patagonia, comparable a la de Diazepam 1 mg/kg (Fig. 26). Sin embargo, el efecto no fue evidente en la dosis de 100 mg/kg. Una posibilidad es que los diversos componentes tengan acciones contrapuestas a dosis más altas.

Sin embargo, cuando se ensayó el extracto acuoso (decocción) de los conos de lúpulo colectado en La Plata en el test del laberinto en cruz elevado, no se encontró un efecto ansiolítico significativo a las dosis de 25 y 33 mg/kg (Fig. 27).

Dichos resultados sugieren que el lúpulo ensayado, sea comercial o colectado, que se usa tanto con fines alimenticios como terapéuticos, exhibe una leve acción ansiolítica y sedante (reduciendo más la exploración que la movilidad espontánea) cuando se extrae con medio alcohólico por maceración. En cambio, el extracto acuoso del lúpulo no exhibió dichos efectos. El hecho de que estos efectos sean leves, y que afecten la exploración, pero no la locomoción, podría tener ventajas si estos resultados se extrapolaran al humano, evitando efectos de somnolencia diurnos. De todas formas, esta consecuencia debería ser evaluada en estudios clínicos de lúpulo. Hasta el momento, hay pocos estudios clínicos que evalúen estas propiedades. Uno de ellos, realizado con 35 voluntarios sanos jóvenes con leve depresión, ansiedad y estrés, en un diseño de estudio clínico controlado, doble ciego y cruzado, que recibieron 0,4 gramos de extracto seco de lúpulo por día durante 1 mes, demostró mejoría en los síntomas (Kyrou *et al.*, 2017). Esto acuerda con la recomendación de lúpulo por

la Comisión E Germana como tratamiento para trastornos de ansiedad e inquietud.

Se puede concluir que la extracción en medio alcohólico en frío ha sido más eficiente para obtener mayor cantidad de flavonoides e incluso pequeñas cantidades de los terpenos del aceite esencial, los cuales explicarían la actividad ansiolítica o sedante suave.

5.2 ESTUDIOS DE LA (MORFOLOGÍA VEGETAL)

El presente trabajo describe los caracteres epidérmicos y anatómicos de hoja y bractéola de lúpulo. En farmacobotánica, el tejido epidérmico es de gran interés en el campo de las plantas medicinales, ya que ayuda en la detección y control de calidad, evitando adulteraciones o confusión con otras especies de plantas similares.

Al obtener un material vegetal clarificado mediante la técnica de diafanización, se pudieron observar las principales características del tejido epidérmico de la especie en estudio. Por ejemplo, forma y disposición de células epidérmicas y estomas, presencia de pelos o tricomas (eglandulares y glandulares), y presencia de otras inclusiones celulares (pelos cistolíticos con carbonato de calcio).

Los caracteres morfológicos y anatómicos ayudan en la diferenciación taxonómica entre las especies de la misma familia. *Humulus lupulus*, pertenece a la familia de las Cannabaceae al igual que el género *Cannabis*, los cuales pueden diferenciarse, entre otros por los siguientes caracteres:

Cannabis – Planta herbácea erecta, hojas palmatinervadas, compuestas, peciolas sin dos hileras de pelo.

Humulus – Planta herbácea voluble, hojas simples, palmado-lobadas, peciolas con 2 hileras de pelos.

Estas observaciones se corresponden con lo descrito por Dawson (1967) en la Flora de la Provincia de Buenos Aires.

En cuanto a las características de las células epidérmicas en vista frontal, en la familia Cannabaceae son usualmente poligonales o irregulares; las células de la epidermis del lúpulo son de forma poligonal con paredes anticlinales rectas, característica que coincide con lo descrito por E. Small (2011).

En las figuras 32 y 33, se puede observar se puede observar nervaduras (o venas) donde se destaca por su tinción el xilema, especialmente sus elementos de conducción en filas, con separación de estas filas por células del parénquima.

La epidermis de lúpulo, a ambas superficies foliares, en vista frontal, presenta tricomas unicelulares y tricomas glandulares, y una cutícula estriada. Las células epidérmicas poseen paredes rectas a ligeramente onduladas en la epidermis de haz o adaxial, con presencia de cistolitos. En el envés o cara abaxial se identificaron células epidérmicas con paredes anticlinales sinuosas y estomas anomocíticos.

Con respecto a los estomas, éstos son evidencia de valore y sistemáticos tanto en plantas actuales como en fósiles (Upchurch, 1984a,b; Kong, 2001) Las características de los estomas identificados y descriptos en esta tesis podrían ser insumos para investigaciones taxonómicas y evolutivas en plantas actuales y fosiles. *Humulus lupulus* presenta estomas anomocíticos tal como lo reportado por Vaccarini *et. al* (2021) para el género *Cannabis*.

La importancia de realizar un estudio morfoanatómico de la planta de lúpulo, previo a los análisis farmacológicos y fitoquímicos radica en que se ha identificado en Argentina a la especie *Humulus scandens*, cuyos aspectos ecológicos son similares a *Humulus lupulus*, sin embargo la principal diferencia es la ausencia de glándulas de lupulina. La especie *Humulus scandens*, es mencionada como especie introducida y es conocida por su capacidad alergénica (Ky *et al.* (2013) y Chen *et al.* (2012), por lo que al no poseer glándulas de lupulina y ser alergénica no es apta para la elaboración de cerveza.

Los compuestos fenólicos del lúpulo, a diferencia del aceite esencial, no son sintetizados y almacenados exclusivamente en los tricomas (Durello, *et al.* 2019), también se encuentran en las brácteas y en el eje central de la inflorescencia, con excepción de los prenilflavonoides (xantohumol, isoxantohumol y compuestos relacionados), que se encuentran principalmente en las glándulas lupulinas (Roberts y Wilson, 2006).

En esta tesis se realizó el estudio principalmente en las hojas y flores de lúpulo ya que son los órganos de las plantas más sensibles a los cambios ambientales, según lo mencionado por los autores Altamirano y Yajia (2017). El tejido epidérmico es de interés en el campo de las plantas medicinales en especial en la detección y control de la calidad farmacobotánica. En el caso de nuestra especie en estudio fue de vital importancia determinar las diferencias en especial la morfología y anatomía de órganos foliares con géneros dentro de la misma especie, ya que como se mencionó anteriormente existen en Argentina especies introducidas con capacidades alergógena y alucinógena.

Según lo indicado Campos (2021), en un estudio sobre la densidad de tricomas en lúpulo, nos indica que los datos obtenidos en los estudios anatómicos son de importancia relevante ya que existe una correlación entre la cantidad de tricomas en las brácteas de lúpulo con el contenido de aceite esencial, y la densidad de tricomas en las flores esta relacionado con el contenido de compuestos fenólicos.

Watson y Dallwitz (1992) describieron las especies de la familia Cannabaceae como plantas mesofíticas, hierbas o lianas, laticíferas, cuando estén presentes, con o sin contenido coloreado, resinoso o no resinoso. anual o perenne.

5.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICOS

En la revisión bibliográfica se ha indicado que los principales compuestos químicos identificados en las inflorescencias femeninas de lúpulo, son los terpenos, los ácidos amargos y los flavonoides prenilados. Respecto a los terpenos, éstos representan el 0,3-1,0 % del total de la inflorescencia.

Según lo indicado en la bibliografía de Wagner y Bladt, el tratamiento con el reactivo NP/PEG con luz UV-356NM, genera fluorescencias predominantemente naranja y amarillo-verde para el tipo flavona y flavonol y una verde oscura para el tipo flavanona. Los ácidos fenolcarboxílicos, que se encuentran frecuentemente en los flavonoides, aparecen como zonas intensas de color azul claro. Las fluorescencias anaranjadas o amarillo verdosas en UV-365 nm, después del tratamiento con NP/PEG, están relacionadas con el patrón de sustitución específico en el anillo B: dos grupos hidroxilo adyacentes en el anillo B (por ejemplo, quercetina) dan lugar a una fluorescencia naranja, mientras que un único hidroxilo libre grupo (p. ej. kaempferol) produce una fluorescencia de color amarillo verdoso; lo indicado por los autores coincide con nuestros resultados en donde se demostró la presencia de quercetina, flavonas, flavonoles, principalmente en los extractos alcohólicos de inflorescencias provenientes del Bolsón, que en todos los casos demostraron contener más cantidad de compuestos químicos

En los extractos de cloroformo, tanto de partes aéreas como de las flores, se detectaron quinonas, fundamentalmente dímeros. Ambos extractos fueron positivos también para esteroides; además el de partes aéreas mostró triterpenos. Los alcaloides se observaron, aunque muy tenues, en el extracto clorofórmico de partes aéreas.

Algunos estudios han demostrado la actividad sedante de los componentes del aceite esencial de lúpulo. Si bien se considera que las bajas concentraciones en las que suelen estar presentes no serían suficientes para explicar por sí solos la actividad, en los extractos etanólicos por maceración aparecen en mayor proporción que en el acuoso, pudiendo explicar el efecto leve ansiolítico/sedante visto. Otros componentes característicos del aceite esencial de lúpulo son el monoterpeno mirceno y los sesquiterpenos E-caryophyleno y

humuleno, lo cual fue descrito por Gonzalez Zorsano *et al* (2013) y coincide con los resultados de nuestro estudio efectuado con los extractos clorofórmicos de las flores mediante CG-MS, para determinar el perfil cromatográfico de terpenos, en donde fue posible evidenciar principalmente la presencia de β -mirceno, triacetina, *t*-cariofileno, β -farneseno, α -humuleno, anhídrido caproico e isochiapin B.

Los resultados obtenidos mediante el sistema cromatográfico planar de partición orientado a flavonoides (CP) realizado a los extractos alcohólicos de flores de lúpulo de El Bolsón y de partes aéreas de lúpulo de la farmacia homeopática de la Plata, así como las infusiones de lúpulo, y usando como sustancia patrón la rutina, evidenciaron como resultado la presencia de rutina en los extractos EOLpa Eplfl e lf. Estos resultados coincidieron con lo detallado en la bibliografía de Wagner y Bladt (1996), en donde se indica que el extracto metanólico de lúpulo contiene principalmente rutina que se puede evidenciar en su color naranja fluorescente y un Rf de 0,7. Los resultados se presentaron en la **Figura 45** de este estudio.

En reportes previos se demostró actividad sedante y ansiolítica para rutina, ya que este flavonol puede interactuar con el receptor GABA-A, produciendo efecto de sedación, ansiolítico o anticonvulsivo (Jäger y Saaby, 2011).

El sistema cromatográfico planar en capa fina orientado a terpenos volátiles aplicado al análisis del extracto de éter etílico de flores (fl) de lúpulo de El Bolsón, de extractos clorofórmicos de pa de lúpulo comercial y fl de El Bolsón, de extractos alcohólicos de pa y fl e infusiones de pa y fl, utilizado como sustancia patrón el mentol, evidenció la presencia de humulona y rutina (flavonoide). Estos resultados coincidieron con lo indicado en la bibliografía (Wagner y Bladt).

El sistema cromatográfico planar en capa fina orientado a flavonoides (TLC), utilizado para los extractos de etanol e infusiones de lúpulo, empleando como sustancia patrón la rutina, reveló los siguientes resultados en el extracto etanólico: rutina, fluorescente de color naranja (Rf 0,7), resultado que fue evidenciado en la infusión y en el extracto alcohólico de flores de El Bolsón y en

el extracto alcohólico de partes aéreas de lúpulo comercial, resultados que fueron comparados con la bibliografía de Wagner y Bladt (1996).

La actividad antioxidante atribuida al lúpulo, es resultado de los metabolitos de naturaleza fenólica detectados mediante los sistemas cromatográficos empleados, los cuales fueron más destacados en las inflorescencias que en otras partes de la planta, y más abundantes en el extracto etanólico que en la infusión.

El humuleno, también conocido como cariofileno es un sesquiterpeno que deriva del difosfato de farnesilo (FPP). Se encontró por primera vez en los aceites esenciales de *Humulus lupulus*, del cual deriva su nombre (Tinseth, 1993). La concentración de humuleno varía entre variedades pudiendo llegar a representar hasta el 40 % del aceite esencial (Katsiotis *et al.*, 1989). Los múltiples epóxidos producidos en el proceso de elaboración de la cerveza y los productos derivados de su hidrólisis son los productores del “aroma a lúpulo” en la cerveza, también relacionado como herbáceo, europeo y especiado (Yange *et al.*, 1993). En nuestro estudio se pudo evidenciar el terpeno en el extracto de éter etílico de las inflorescencias provenientes del Bolsón.

En una publicación realizada por el autor Aoshima (2006) indica la presencia de dos componentes aromáticos que se encuentran en el lúpulo como son el mircenol y xantohumol, ambos con efecto sedante.

Por otra parte, el análisis por HPLC-DAD del polvo de inflorescencias de lúpulo variedad *Cascade* proveniente de El Bolsón mostró la presencia de β ácidos amargos (cohulupona, colupulona y lupulona). El flavonoide prenilado más abundante, xantohumol, fue identificado, lo cual acuerda con otros trabajos (Karabin *et al.*, 2016; Kao y Wu, 2013). A diferencia de otros trabajos, la muestra no mostró α ácidos, y esto podría deberse a dos factores. En primer lugar, en esta Tesis se utilizó un Sistema de HPLC-DAD y fase móvil orientados a la detección de polifenoles (Hsu y Kao, 2019; Campos y Markham, 2007). Esto fue debido a la hipótesis inicial de que las isoflavonas y flavonoides serían los responsables de efectos antiespasmódicos y sedantes. Este sistema de HPLC es diferente del sistema comúnmente empleado para caracterizar los ácidos

amargos, que son los compuestos aromáticos en la elaboración de cerveza (Buckee, 1985). En segundo lugar, el tiempo de almacenamiento o el hecho de mantenerlo a temperatura ambiente mayor a 4°C puede favorecer la pérdida de los alfa-ácidos (Rutnik *et al.*, 2023). Por otra parte, mediante HPLC-DAD se identificaron dos isoflavonas, genisteína y daizeína, sea como agliconas y como el glicósido genistina. Sin embargo, la baja señal de HPLC sugiere que la cantidad de isoflavonas sería muy pequeña.

En un ensayo realizado en el año 2013 por Franco *et al.*, para determinar los efectos de la cerveza, conteniendo lúpulo (*Humulus lupulus*), sobre la capacidad antioxidante en orina. Se concluye que los ácidos amargos que componen el lúpulo modulan el aminoácido GABA (principal neurotransmisor inhibidor del sistema nervioso central), de acuerdo con Benkherouf *et al.* (2020). Al mismo tiempo, el terpenoide mircenol y el xantohumol en la cerveza con lúpulo mejoran su efecto sedante. Estos resultados se han podido ratificar con los resultados obtenidos en este estudio en donde se evidenció la presencia de terpenos en los perfiles cromatográficos planares de los extractos de éter etílico, cloroformo, etanol, infusión y aceite volátil de las flores de lúpulo de El Bolsón. Así mismo los resultados de los estudios del sistema nervioso central con el extracto alcohólico del lúpulo proveniente de La Plata redujo la exploración espontánea de los ratones en el test de campo abierto, a las dosis de 100 y 330 mg lúpulo/kg, similar al efecto de diazepam 1 mg/kg. Ello refleja una leve actividad sedante en la tintura de lúpulo.

Varios estudios realizados en poblaciones con altos niveles de estrés, muestran que el consumo de bebidas no alcohólicas con lúpulo en la cena incrementa los niveles de antioxidantes que fueron medidos en la orina (Franco *et al.*, 2013). Estos resultados han sido atribuidos al polifenol xantohumol que ha demostrado una prevención al daño hepático agudo (Pinto, 2012). En el presente estudio, mediante el empleo del detector DAD fue posible identificar la presencia de xantohumol en las flores de lúpulo provenientes de El Bolsón.

La cantidad de aceite volátil obtenido por destilación al vapor de lúpulo, así como la cantidad de los componentes del aceite, depende del origen de la

planta y del momento de cosecha, por lo que se pudo observar la mayor cantidad de compuestos químicos en las flores de lúpulo provenientes del Bolsón.

Las glándulas de color amarillo que se encuentran en las inflorescencias del lúpulo se conocen como lupulina, que depende estrictamente de las rutas de síntesis de metabolitos especializados, ya que tiene en su composición mayoritaria: terpenos: linalool, mirceno y α -humuleno; compuestos fenólicos: humulonas (ácidos α) y lupulonas (ácidos β); y flavonoides: xantohumol (FARAG et al., 2012).

En el estudio de especies vegetales medicinales se ha identificado que las propiedades de las plantas pueden provenir de cualquiera de sus partes, en donde se producen y/o acumulan los metabolitos secundarios. En el caso de nuestra especie en estudio se identificaron sustancias químicas en mayor cantidad en los conos de lúpulo, resultados que podrían ser asociados a la presencia de lupulina presente en las flores femeninas de lúpulo, ya que según lo mencionado por el autor SIMÕES *et al.* 2000, en donde indica que las colecciones de diferentes ambientes y diferentes épocas del año reflejan directamente en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides así como en el contenido de otros compuestos del metabolismo secundario del organismo productor y estos se producen en condiciones de estrés.

6. *CONCLUSIONES*



Con base en los resultados obtenidos a través de los experimentos realizados, es importante considerar el potencial biológico observado en la especie *Humulus lupulus*.

En esta tesis se estudiaron las propiedades del lúpulo a nivel del músculo liso, y se demostró un efecto antiespasmódico en el intestino, el útero y la vejiga aislados de rata, asociado al antagonismo no competitivo de la contracción muscarínica y a la inhibición no competitiva del influjo de Ca^{+2} . Por HPLC se demostró que la tintura de lúpulo contenía flavonoides prenilados, como xanthohumol y β -ácidos, flavonoides e isoflavonas que podrían explicar al menos en parte, los efectos antiespasmódicos.

Además, la tintura de flores del lúpulo cultivado, sea en Patagonia o La Plata, presenta leve efecto inhibidor de la exploración espontánea de ratones (a dosis de 100 y 330 mg lúpulo/kg) y un efecto ansiolítico a la dosis de 33 mg lúpulo/kg. La presencia de flavonoides rutina y naringenina, de flavanonas, mircenol y humulona explicaría dicho efecto. Sin embargo, ese efecto se perdió en el extracto acuoso de lúpulo obtenido por decocción, por lo cual la alta temperatura afectaría a dichos compuestos.

Estos estudios realizados en animales de laboratorio dan soporte científico al descripto uso terapéutico tradicional y benéfico de la tintura de lúpulo como antiespasmódico para situaciones de cólico intestinal o uterino y de vejiga hiperactiva, o en casos de dismenorrea. Además, estos resultados dan base científica preclínica al descripto uso del lúpulo como ansiolítico o sedante suave. No obstante, se requieren estudios clínicos para demostrar su eficacia.

Los factores ambientales contribuyen en gran medida a la formación de metabolitos secundarios que constituyen los componentes activos de muchas plantas. En particular se ha determinado que factores como la ubicación geográfica, el clima y los aspectos agronómicos, afectan principalmente la composición volátil del lúpulo (Ceh *et al.*, 2007; International Hops Growers Convention, 2019; Kishimoto *et al.*, 2008; Mozný *et al.*, 2009). Lo indicado por los autores constituyen una referencia para explicar la cantidad de metabolitos encontrados en los conos de lúpulo que son provenientes del sur de la Argentina,

específicamente de El Bolsón, en donde el lúpulo se expone a largas horas de claridad, que según su fisiología requiere para florecer, siendo éstas condiciones climáticas propias del sur de Argentina. En varios ensayos con otras especies forestales se ha realizado el intento de producir artificialmente las condiciones climáticas para su desarrollo, dando como resultado una marcada diferencia en su composición química, especialmente en referencia a los constituyentes activos.

En este estudio fue posible identificar los principales grupos químicos y metabolitos en los conos de lúpulo que incluyen terpenos y ácidos amargos. También se identificaron los principales glicósidos de flavonoles, fundamentalmente del kaempferol y la quercetina (sobre todo rutina).

Además, se identificaron algunos terpenoides en el aceite esencial, principalmente el humuleno y el mirceno. Los compuestos mencionados anteriormente han sido descriptos como compuestos cruciales para la calidad de los lúpulos utilizados en la industria cervecera, ya que contribuyen a la estabilidad de la espuma y a la actividad antibacteriana.

En lo que refiere a las micrografías botánicas se pudo determinar en la muestra del herbario; así como en la muestra de La Plata, tricomas unicelulares y tricomas glandulares que utiliza como sujeción o soporte, característicos de la especie *Humulus lupulus*.

En resumen, esta Tesis ha logrado caracterizar la morfología y micrografía del *Humulus lupulus*, su fitoquímica mayoritaria en flavonoides prenilados, como xantohumol y β -ácidos, además de flavonoides e isoflavonas, y la acción antiespasmódica visceral (asociada a interferencia con el influjo de calcio al músculo liso) y ansiolítica y sedante suave, explicables por sinergismo entre varios de sus componentes.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agehara S, DelCastillo C, Gallardo M, Wang W, Rechcigl J. 2021. How to Install Twines in a Hopyard. HS1418, 8/2021

Aggarwal D, Upadhyay SK, Singh R, Tuli HS. 2021. Recent patents on therapeutic activities of xanthohumol: a prenylated chalconoid from hops (*Humulus lupulus* L.). Pharm Pat Anal. 10(1):37-49. [doi:10.4155/ppa-2020-0026](https://doi.org/10.4155/ppa-2020-0026)

Arambarri A. 2018. La técnica de clarificación 5-5-5, un método natural para el tratamiento de material vegetal. Bol. Soc. Argent. Bot. 53 (4): 579-586. doi.org/10.31055/1851.2372.v53.n4.21980

Astray G, Gullón P, Gullón B, Munekata P, Lorenzo J. 2020 *Humulus lupulus* L. as a natural source of functional biomolecules. J. Appl. Sci. 10: 5074.

Behre K. 1999. The history of beer additives in Europe-A review. Vegetation History and Archaeobotany. 8(1):35-48. [doi:10.1007/BF02042841](https://doi.org/10.1007/BF02042841)

Benkherouf AY, Eerola K, Soini SL, Uusi-Oukari M. 2020. Humulone modulation of GABA-A receptors and its role in hops sleep-promoting activity. Front Neurosci. 14; 14:594708. [doi:10.3389/fnins.2020.594708](https://doi.org/10.3389/fnins.2020.594708)

Bernal-Ochoa A, Colareda G, Matera S, Ragone M, Isolabella S, Filip R, et al. 2021. Intestinal/uterine antispasmodics, sedative effects of *Fuchsia magellanica* leaves' and flowers' extracts and their flavonolic components. Phytomed Plus. 1:100060. doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100060

Blanco M, Colareda G, Van Baren C, Bandoni A, Ringuelet J, Consolini A. 2013. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two chemotypes of *Lippia alba*. Journal of Ethnopharmacology 149: 803-809. [doi:10.1016/j.jep.2013.08.007](https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.007)

Bolton J, Dunlap T, Hajirahimkhan A, Mbachu O, Chen SN, Chadwick L, et al. 2019. The multiple biological targets of hops and bioactive compounds. Chem Res Toxicol. 32(2):222-33. doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00345

Buckee CK. 1985. Estimation of a-, p- and iso-a-acids in hops, hop products and beer using high performance liquid chromatography J. Inst. Brew. 91:143-147.

Campos M, Markham K. 2007. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids. Coimbra University Press. [doi:10.14195/978-989-26-0480-0](https://doi.org/10.14195/978-989-26-0480-0)

Campos Olivia. 2021. Anatomia, histoquímica y densidad de tricomas de variedades de *Humulus lupulus* sobre manejo orgánico y convencional. 59p

Carretero E, Dalmasso A, Duplancic A, Alcalá J. 2018. *Humulus scandens* (Loureiro) Merrill (*Cannabaceae*), invasora emergente en el centro-oeste de Argentina. Multequina. 27 (1).

Castroviejo B. 2011. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Flora Ibérica

Čeh B, Kač M, Košir IJ, Abram V. 2007. Relationships between Xanthohumol and Polyphenol Content in Hop Leaves and Hop Cones with Regard to Water Supply and Cultivar. Int J Mol Sci. 8(9):989–1000.

Chadwick LR, Nikolic D, Burdette JE, Overk CR, Bolton JL, van Breemen RB, Fröhlich R, Fong HH, Farnsworth NR, Pauli GF. 2004. Estrogens and congeners from spent hops (*Humulus lupulus*). J Nat Prod. 67(12):2024-2032. [doi:10.1021/np049783i](https://doi.org/10.1021/np049783i)

Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR. 2006. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. Phytomedicine. 13(1-2):119-31. [doi:10.1016/j.phymed.2004.07.006](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.07.006)

Colareda GA, Matera SI, Bayley M, Ragone MI, Flores ML, Córdoba OL, Consolini AE. 2021. *Lepidium meyenii* (maca) and soy isoflavones reduce cardiac stunning of ischemia-reperfusion in rats by mitochondrial mechanisms. J Tradit Complement Med. 11(6):471-480. [doi:10.1016/j.jtcme.2021.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.03.004)

Colgate EC, Miranda CL, Stevens JF, Bray TM, Ho E. 2007. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops, induces apoptosis and inhibits NF-kappaB

activation in prostate epithelial cells. Cancer Lett. 246(1-2):201-9.
[doi:10.1016/j.canlet.2006.02.015](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.02.015)

Consolini AE, Ragone MI. 2017. Farmacodinamia general e Interacciones medicamentosas. Mecanismos de acción y metodologías de estudio experimental. EDULP. 1°ED, 2017. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/67056>

Darios ES, Seitz B, Watts SW. 2012. Smooth muscle pharmacology in the isolated virgin and pregnant rat uterus and cervix. J Pharmacol Exp Ther. 341(3):587-96. [doi:10.1124/jpet.111.191031](https://doi.org/10.1124/jpet.111.191031)

Diel P, Thomae R, Caldarelli A, Zierau O, Kolba S, Schmidt S, Schwab P, Metz P, Vollmer G. 2004. Regulation of gene expression by 8-prenylnaringenin in uterus and liver of Wistar rats. Planta Medica 70, 39-44

Dizzeo de Stritmatter C. 1973. Nueva técnica de diafanización. Boletín de la sociedad argentina de botánica 15:126-129.

Dodds K. 2017. Hops: a guide for new growers. 1°ED. Department of Primary Industries. <https://www.dpi.nsw.gov>

Durello, D. R et al . 2019. Quimica do Lupulo. Quimica Nova. v. XY, p. 1-20

Eri S, Khoo BK, Lech J, Hartman TG. 2000. Direct thermal desorption-gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus*) essential oils in support of varietal characterization. J Agric Food Chem. 48(4):1140-9. [doi:10.1021/jf9911850](https://doi.org/10.1021/jf9911850)

Farnsworth N. 2008. A Database of World Literature of Natural Products. Program for Collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences. College of Pharmacy. University of Illinois at Chicago.

Farag, M. A. et al. 2012. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. In: Metabolomics. 8. Ed Berlim, p 492-507.

Franco L., Bravo R., Galan C., Sanchez C., Rodriguez A.B., Barrigs C., Cubero J., 2013. Effects of beer, Hops (*Humulus lupulus*) on total antioxidant capacity in URINE of stressed subjects,

Gavilánez Buñay TC, Colareda GA, Ragone MI, Bonilla M, Rojano BA, Schinella GR, Consolini AE. 2018. Intestinal, urinary and uterine antispasmodic effects of isoespintanol, metabolite from *Oxandra xylopioides* leaves. *Phytomedicine*. 51:20-28. [doi:10.1016/j.phymed.2018.06.001](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.06.001)

González E, Quintela J, De la Fuente García E, Garre A, Azkoiti S, Escolar M. 2013. Efecto farmacológico de los diferentes compuestos activos del lúpulo sobre los primeros síntomas físicos y emocionales en la etapa previa a la menopausia. *Rev Esp Nutr Comunitaria*. 19, 37-43. ISSN: 1135-3074

Grieve M. 1971. *A Modern Herbal*. Dover Publications. 1-358.

Hamada K, Sasaki Y, Taniguchi N, Fukui H, Miyatsuka Y, Kimura Y, Ukai Y, Yoshikuni Y, Kimura K. 1997. Anticholinergic and calcium antagonistic activities of NS-21 contribute to the inhibition of rat urinary bladder contractions. *Gen Pharmacol*. 29(5):771-8. [doi:10.1016/s0306-3623\(97\)00259-0](https://doi.org/10.1016/s0306-3623(97)00259-0)

Hanske L, Hussong R, Frank N, Gerhäuser C, Blaut M, Braune A. 2005. Xanthohumol does not affect the composition of rat intestinal microbiota. *Mol Nutr Food Res*. 49(9):868-73. [doi:10.1002/mnfr.200500048](https://doi.org/10.1002/mnfr.200500048)

Harborne J. 1991. *A guide to Modern Techniques of Plant: Análisis. Phytochemical Methods*. 2°ED. London: Chapman and Hall.135

Hazeifa M, Taj Eldin I, Ahmed E, Hassan A, Sirag N. 2013. Effects of methanolic extract of yohimbe bark (*Pausinystalia yohimbe*) on isolated rabbit aortic strip and rat uterus. *Health*. 5(6). [doi:10.4236/health.2013.56135](https://doi.org/10.4236/health.2013.56135)

Holmgren P, Holmgren A, Barnett C. 1990. *Index herbariorum. The herbaria of the world*. 8°ED. New York Botanical Gardens: Bronx, New York.

Hsu YY, Kao TH. 2019. Evaluation of prenylflavonoids and hop bitter acids in surplus yeast. *J Food Sci Technol*. 56(4):1939-1953. [doi:10.1007/s13197-019-03660-6](https://doi.org/10.1007/s13197-019-03660-6)

Huang R, Liu Y, Hu S, Tamalunas A, Waidelich R, Strittmatter F, Stief CG, Hennenberg M. 2022. Inhibition of alpha(1)-Adrenergic, Non-Adrenergic and Neurogenic Human Prostate Smooth Muscle Contraction and of Stromal Cell Growth by the Isoflavones Genistein and Daidzein. *Nutrients*. 14(23):4943.

Huang Y, Tsang SY, Yao X, Chen ZY. 2005. Biological properties of baicalein in cardiovascular system. *Current Drug Targets – Cardiovasc. & Hematol. Disord*. 5(2): 177-184.

Ishii K, Taira N, Yanagisawa T. 1985. Differential antagonism by Bay k 8644, a dihydropyridine calcium agonist, of the negative inotropic effects of nifedipine, verapamil, diltiazem and manganese ions in canine ventricular muscle. *Br J Pharmacol*. 84(2):577-84. [doi:10.1111/j.1476-5381.1985.tb12943.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1985.tb12943.x)

Jäger A, K., Saaby L. 2011. Flavonoids and the CNS. *Molecules* (Basel, Switzerland). 16,2 1471-85. [doi:10.3390/molecules16021471](https://doi.org/10.3390/molecules16021471)

Jung YH, Hong SI, Ma SX, Hwang JY, Kim JS, Lee JH, Seo JY, Lee SY, Jang CG. 2014. Strain differences in the chronic mild stress animal model of depression and anxiety in mice. *Biomol Ther* (Seoul). 22(5):453-9. [doi:10.4062/biomolther.2014.058](https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.058)

Kitchen, I. 1984. Textbook of in vitro practical pharmacology. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Kao TH, Wu GY. 2013. Simultaneous determination of prenylflavonoid and hop bitter acid in beer lee by HPLC-DAD-MS. *J Agric Food Chem*. 141:1218-26. doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.032

Karabín M, Hudcová T, Jelinek L, Dostálek P. 2016. Biologically active compounds from hops and prospects for their use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15: 542-567.

Katsiotis S, Langezaal C, Scheffer J, Verpoorte R. 1989. Comparative study of the essential oils from hops of various *Humulus lupulus*. J Flavour and Fragrance. 4, 187-91. doi.org/10.1002/ffj.2730040407

Kawabata K, Mukai R, Ishisaka A. 2015. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. Food Funct. 6(5):1399-417. [doi:10.1039/c4fo01178c](https://doi.org/10.1039/c4fo01178c)

Kneen, R. (2003). Small Scale & Organic Hops Production. Left Fields, British Columbia.<http://cesonoma.ucanr.edu/files/238645.pdf>

Kong H. 2001. Comparative morphology of leaf epidermis in the Chloranthaceae. Botanical Journal of the Linnean Society.36, 279-94.

Kontek B, Jedrejek D, Oleszek W, Olas B. 2021. Antiradical and antioxidant activity in vitro of hops-derived extracts rich in bitter acids and xanthohumol. Ind Crops Prod. 161:113208. doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113208

Ky J, Han S, Choi J, Lee H, Lee C, Park J. 2013. Allergenicity of Recombinant ProÀ lins From Japanese Hop, *Humulus japonicus*. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 23 (5): 345-350.

Kyrou I, Christou A, Panagiotakos D, Stefanaki C, Skenderi K, Katsana K, Tsigos C. 2017. Effects of a hops (*Humulus lupulus* L.) dry extract supplement on self-reported depression, anxiety and stress levels in apparently healthy young adults: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover pilot study. Hormones (Athens). 16(2):171-180. doi: 10.14310/horm.2002.1738.

Lawless J. 1995. The illustrated encyclopedia of essential oils: The complete guide to the use of oils in Aromatherapy and Herbalism. Element Books, Ltd., Dorset. UK.

Leskobor L. 1978. El Lúpulo. Su cultivo y procesamiento. 3ªED. Hemisferio Sur

Liang W, Huang X, Chen W. 2017. The effects of baicalin and baicalein on cerebral ischemia: a review. Aging and Disease 8(6): 850-867.

Liu J, Burdette JE, Xu H, Gu C, van Breemen RB, Bhat KP, Booth N, Constantinou AI, Pezzuto JM, Fong HH, Farnsworth NR, Bolton JL. 2001. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. J Agric Food Chem. 49(5): 2472-2479. [doi:10.1021/jf0014157](https://doi.org/10.1021/jf0014157)

Livingstone E, Livingstone S. 1970. Pharmacological experiments on isolated preparations. 2ªED. Department of Pharmacology. University of Edinburgh

Magadán M, Nadal J, Valladares J, Piñeiro J, Fernández J, García JM. 2011. Guía del cultivo del lúpulo. Lúpulo Tecnología de Galicia. Sociedad Cooperativa Gallega. <http://www.lutega.com/pdf/guiacultivo.pdf>

Marcelina R, Williams N. 2011. Volatile components of aroma hops (*Humulus lupulus* L.) commonly used in beer brewing. Department of Chemistry University of Alabama, Huntsville

Martínez E, 2018. *Cannabaceae Endlicher*. Flora Urbana del centro-oeste de Argentina. Multequina. 27, 5-6.

Mc Hale N, Hollywood M, Sergeant G, Thornbury K 2006. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. J Physiol; 570(Pt 1):23-8. [doi:10.1113/jphysiol.2005.098376](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.098376)

Mc Cormack, E.; Velasquez, L.; Delk, N.; Braam, J. (2006). Touch Responsive Behaviors and Gene Expression in Plants. Communication in plants. <http://bioc.rice.edu/~braam/pubs/McCormack.2006.cpy.pdf>

MedlinePlus Suplementos (2021). Lúpulo. <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/natural/856.html>. Revisado en agosto de 2021.

Meissner O, Häberlein H. 2006. Influence of xanthohumol on the binding behavior of GABAA receptors and their lateral mobility at hippocampal neurons. Planta Med. 72(7):656-8. [doi:10.1055/s-2006-931609](https://doi.org/10.1055/s-2006-931609)

Metcalf C, Chalk L. 1979. Anatomy of the Dicotyledons, 2ªED. Clarendon Press, Oxford. 1 (2)

Miller R. 1958. Morphology of *Humulus lupulus*. I. Developmental Anatomy of the Primary Root. American Journal of Botany. 45(5): 418-31. doi.org/10.1002/j.1537-2197.1958.tb13146.x

Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D. 1999. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus*) and beer. J Clin Endocrinol Metab. 84(6):2249-52. [doi:10.1210/jcem.84.6.5887](https://doi.org/10.1210/jcem.84.6.5887)

Moir M. 2000. Hops, A Millennium Review. Journal of the American Society of Brewing Chemists. 58:4,131-146. [doi:10.1094/ASBCJ-58-0131](https://doi.org/10.1094/ASBCJ-58-0131)

Murakami A, Darby P, Javornik B, Pais M, Seigner E, Lutz A, Svoboda P. 2006. Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus* L. Hereditary. 97 (1), 66-74. [doi:10.1038/sj.hdy.6800839](https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800839)

Neira D, Andrada A, Paéz V, Rodríguez A, Ríos N, Matínez O, Hernández M. 2017. Anatomical, Histochemical and Cytogenetic Features of *Doryopteris triphylla* (*Pteridaceae*). J of Plant Sciences. 8 (4). [doi:10.4236/ajps.2017.84061](https://doi.org/10.4236/ajps.2017.84061)

Nievas Walter, Villarreal Patricia, Rosati Alfredo, Rodriguez Andrea. 2021. El cultivo del lupulo: aspectos agroambientales y económicos para el Alto Valle del río Negro. Buenos Aires: Ediciones INTA; Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle.

Nigusse T, Zhang L, Wang R, Wang XN, Li J, Liu C. 2019. Flavonoids in a crude extract of *Catha edulis* inhibit rat intestinal contraction via blocking Ca²⁺ channels. Neurogastroenterol Motil. 31:e13602. doi.org/10.1111/nmo.13602

Nota del Diario La Nación, 2020: Donde nace la cerveza: el encanto desconocido de los campos de lúpulo. En: <https://www.lanacion.com.ar/lifestyle/donde-nace-la-cerveza-el-encanto-desconocido-de-los-campos-de-lupulo-nid2071590/>, revisado el 13 de julio de 2024.

Overk C, Yao P, Chadwick L, Nikolic D, Sun Y, Cuendet M, Deng Y, Hedayat A, Pauli G, Farnsworth N, van Breemen R, Bolton J, 2008. Comparison of the in

vitro estrogenic activities of compounds from hops (*Humulus lupulus*) and red clover (*Trifolium pratense*). J Agricultural and Food Chemistry. 53, 6246-625

Petkov GV. 2014. Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 307(6):R571-84. [doi:10.1152/ajpregu.00142.2014](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00142.2014)

Pinto C, Duque AI, Rodríguez-Galdón B, Cestero JJ, Macías P. 2012. Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. Food Chem Toxicol.

Pinto Vitorino G, Toledo I, Córdoba O, Flores M, Cabrera J. 2004. Análisis fitoquímico de *Colliguaya integerrima* (Hook.) Gill. et Hook. (Euphorbiaceae), una planta de la Patagonia, Argentina. Acta Farm. Bon. 23 (4): 459-465.

Powo A. 2024. Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet. <http://www.plantsoftheworldonline.org/>

Ragone MI, Sella M, Conforti P, Volonté MG, Consolini AE. 2007. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. J Ethnopharmacol. 113(2):258-266. [doi:10.1016/j.jep.2007.06.003](https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.003)

Rahman SU, Ali T, Hao Q, He K, Li W, Ullah N, Zhang Z, Jiang Y, Li S. 2021. Xanthohumol Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Depressive Like Behavior in Mice: Involvement of NF- κ B/Nrf2 Signaling Pathways. Neurochem Res. 46(12):3135-3148. [doi:10.1007/s11064-021-03396-w](https://doi.org/10.1007/s11064-021-03396-w)

Rang H., Dale M., Ritter J., Flower R. 2008. Farmacología. 6: 54-65. ISBN: 978-0-443-06911-6.

Roger R. 2013. Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. Rev Farmaciencia. 1(2).

Rondina R, Coussio JD, 1989. Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas. Rev Invest. 20(2). Agropec. Serie 2. Biología y Producción Vegetal. 6(2):352-66

Roberts, T. R.; Wilson, R. J.H. Hop analysis. In: Priest, F.G e Stewart, G.G. Handbook brewing. 2. Ed. Florida: CRC Press, 2006. P.181-278.

Rutnik K, Ocvirk M, Košir IJ, 2023. The stability of hop (*Humulus lupulus* L.) resins during long-period storage. Plants 12(4):936.

Salter S, Brownie S. 2010. Treating primary insomnia - the efficacy of valerian and hops. Aust Fam Physician. 39(6):433-7. PMID: 20628685

Sangiovannia E, Fumagallia M, Santagostinib L, Forinoc M, Piazza S, Colombo E, Tagliatalata-Scafati O, Fico G, Dell'Agli M. 2019. A bio-guided assessment of the anti-inflammatory activity of hop extracts (*Humulus lupulus* L. cv. Cascade) in human gastric epithelial cells. J of Functional Foods. 57: 95–102

Sekiguchi F, Fujita T, Deguchi T, Yamaoka S, Tomochika K, Tsubota M, Ono S, Horaguchi Y, Ichii M, Ichikawa M, Ueno Y, Koike N, Tanino T, Nguyen HD, Okada T, Nishikawa H, Yoshida S, Ohkubo T, Toyooka N, Murata K, Matsuda H, Kawabata A. 2018. Blockade of T-type calcium channels by 6-prenylnaringenin, a hop component, alleviates neuropathic and visceral pain in mice. Neuropharmacology.138:232-244. [doi:10.1016/j.neuropharm.2018.06.020](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.06.020)

Simões, C.M.O.; Schenkel, e.p.; Gosmann, G; Mello, J.C.P.; Mentz, I.a.; Petrovick, P.R. (Orgs.). Farmacognosia, da planta ao medicamento. 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/Ed. da UFSC, 2000.

Sirrine S, Othwell R, Goldy N, Arque M, Brown D. 2010. Sustainable hop production in the great lakes region. Michigan state university extension. Extension bulletin e-3083. <https://www.uvm.edu/sites/default/files/media/sirrine-sustainable-hop-production-in-the-great-lakes-region.pdf>

Small E. 2011. A numerical analysis of morphogeographic groups of cultivars of *Humulus lupulus* L. based on samples of hops. Can J Bot. 59(3):311-324. [doi:10.1139/b81-044](https://doi.org/10.1139/b81-044)

Small, E., 1978. A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*. Syst. Bot. 3: 37-76

Smith R, McClure M, Smith M, Abel P, Bradley M. 2007. The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 5:411. <http://www.rbej.com/content/5/1/41>

Spedding M. 1985. Competitive interactions between Bay K 8644 and nifedipine in K⁺ depolarized smooth muscle: a passive role for Ca²⁺? *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 328(4):464-6. [doi:10.1007/BF00692917](https://doi.org/10.1007/BF00692917)

Speroni F, Rebolledo A, Salemme S, Añón MC, Tanzi F, Milesi V. 2007. Genistein inhibits contractile force, intracellular Ca²⁺ increase and Ca²⁺ oscillations induced by serotonin in rat aortic smooth muscle. *J Physiol Biochem*. 63(2):143-51.

Stashenko Elena E, 2009. Aceites esenciales. Universidad Industrial de Santander. Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales

Sun S, Wang X, Yuan A, Liu J, Li Z, Xie D, Zhang H, Luo W, Xu H, Liu J, Nie C, Zhang H. 2022. Chemical constituents and bioactivities of hops (*Humulus lupulus* L.) and their effects on beer-related microorganisms. *Food and Energy Security*. 11.10.1002/fes3.367. doi.org/10.1002/fes3.367

Tinseth G. 1993. Hop Aroma and Flavor. *Brewing Techniques*. <http://realbeer.com/hops/aroma.html>

Trochine A, González S, Burini J, Cavallini L, Gastaldi B, Reiner G, Silva C, Van Baren C, Di Leo P, Retta D, Bandoni A, Libkind D. 2020. Chemical characterization of the two major hop varieties produced in Patagonia (Argentina) for the brewing industry. *Pag 95-102*. doi.org/10.23763/BrSc20-08trochine

Upchurch G. 1984a. Cuticle evolution in early cretaceous angiosperms from the Potomac group of Virginia and Maryland. *Ann Missiuri Bot. Gard*. 71, 522-550

Upchurch G. 1984b. Cuticular anatomy of angiosperm leaves from the lower cretaceous Potomac group I. Zone I Leaves. *Amer. J. Bot*. 71, 192-202

Vaccarini C, Mercado MI, Ponessa GI, Sedan D, Andrinolo D. 2021. Morfoanatomía foliar de tres variedades Argentinas terapéuticas de Cannabis. XXXVIII Jornadas argentinas de Botánica. Libro de resúmenes

Wagner H, Bladt S. 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2°ED

Wasowski C, Marder M. 2011. Central nervous system activities of two diterpenes isolated from *Aloysia virgata*. *Phytomedicine*. 15;18(5):393-401. [doi:10.1016/j.phymed.2010.08.017](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.08.017)

Watson L, Dallwitz M. 1992. The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. <http://www.worldcat.org/title/families-of-flowering-plants-descriptionsillustrations-identification-and-information-retrieval/oclc/34189020>

Wildfind. N Atulrich M Ehr E Rleben (2020). Kultur des hopfens.<https://www.wildfind.com/artikel/kultur-des-hopfens>

Wikinski, S. (2017). Psicofarmacología: farmacodinamia y modelos experimentales. En: "Farmacodinamia general e Interacciones medicamentosas. Mecanismos de acción y metodologías de estudio experimental". Consolini AE, Ragone MI, Editorial EDULP, ISBN 978-950-34-1572-6. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/67056>

Yamaura K, Nelson AL, Nishimura H, Rutledge JC, Ravuri SK, Bahney Ch, Philippon MJ, Huard J. 2022. The effects of fisetin on bone and cartilage: A systematic review. *Pharmacol. Res.* 185: 106504.

Yang S, Yu G, Liu N, Su M, He J, Shang H, Zhang H, Zhu Y, Li G. 1993. *Bilimbataia sichuanensis*. The Paleobiology Database.1-246

Zanoli P, Zavatti M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol.* 116(3): 383-396. [doi:10.1016/j.jep.2008.01.011](https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011)

Zarlavsky G. 2014. Histología vegetal: técnicas simples y complejas. Sociedad Argentina de Botánica. pag 2-66.

Zorzano E., Quintela Fernández J.C., de la Fuente García E., Garre Contreras A., Azkoiti Ibáñez S., Escolar Jurado M., 2013. Efecto farmacológico de los diferentes compuestos activos de lupulo sobre los primeros síntomas físicos y emocionales en la etapa previa a la menopausia. Revista Española de Nutrición Comunitaria, vol 19, pag 37-43.

Zaixing, Ch., Meng S., Yang J., Nie H., Jiang H., Hu H., Meng F., 2012. Humulus scandens Chemical Constituents Determination and Pharmacological Action Research. Medicinal Chemistry 2: 29-32.

Zhang LX, Li HF, Wang LD, Jin S, Dou XC, Tian ZF, Ma Q. 2014 Resveratrol and genistein inhibition of rat isolated gastrointestinal contractions and related mechanisms. World J Gastroenterol. 20(41):15335-42.

Zhou Z, Bartholomew B. 2003. *Cannabaceae*. Flora of China, 5: 74-75. <http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume05/Cannabaceae.pdf>

Zuloaga O, Morrone O, Belgrano J. 2008. Catálogo de las plantas vasculares del cono sur (Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 107: 983. <http://www.darwin.edu.ar>