

Informe final publicable de proyecto

Aportes para el consumo seguro de plantas medicinales a través de su caracterización botánica y fitoquímica, discriminando entre modos de cultivo agroecológico y convencional a través de perfiles de metabolitos secundarios como marcadores de autenticidad

Código de proyecto ANII: FCE_1_2021_1_167588

Fecha de cierre de proyecto: 02/11/2024

HEINZEN GONZALEZ, Horacio (Responsable Técnico - Científico)

ARCHONDO, Lucas (Investigador)

PORLEY, Guzman (Investigador)

ANGULO BENÍTEZ, Pierina (Investigador)

BESIL ARISMENDI, María Natalia (Investigador)

CESIO CESCONI, María Verónica (Investigador)

DA LUZ GRAÑA, Claudia Marisol (Investigador)

MIGUES BORGHINI, Ignacio (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIÓN LITORAL NORTE \\\

FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

Una planta medicinal (PM) debidamente identificada, debe sus propiedades farmacológicas a la presencia de metabolitos secundarios. En el presente proyecto se estudiaron muestras comerciales de las 4 plantas medicinales más consumidas in natura en Uruguay. Se adquirieron en farmacias, herboristerías y droguerías de todo el país 10 muestras de 5 lotes diferentes de cada una, correspondientes a diversos proveedores. Se estudiaron desde el punto de vista botánico y fitoquímico y se comprobó su ajuste a la normativa vigente en el país. Se generaron monografías para su rápida identificación botánica y desarrollaron metodologías analíticas para la evaluación cualitativa y cuantitativa de los marcadores fitoquímicos identitarios, que se postulan como responsables de la actividad farmacológica atribuida a cada una de ellas. Estas técnicas van desde técnicas simples de cromatografía en capa fina al uso de equipamiento analítico de última generación como cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas en tandem. Los resultados obtenidos para las muestras estudiadas de las 4 plantas mostraron que ninguna cumplía en su totalidad con la reglamentación vigente. El común denominador fue la proporción muy grande de materia extraña, la que puede clasificarse en dos tipos: aquella que está constituida por partes del vegetal que no están incluidas en la definición de "droga vegetal" estipulada en las farmacopeas y por lo tanto se considera una adulteración de las mismas. De manera adicional en el caso de Tilo se han observado especies de tilo que se consideran tóxicas para su consumo humano. Se han desarrollado metodologías analíticas al estado del arte que amplían el conocimiento sobre la composición química de las plantas estudiadas y se pueden observar las variaciones relativas en sus componentes, que podrían modular su acción farmacológica.

Del análisis cualitativo y cuantitativo de los marcadores fitoquímicos, se observa su presencia en todas las muestras analizadas excepto las de tilo que no cumplían con la descripción botánica, donde sí se observa el marcador característico. Se observa una gran variabilidad intralote e intraproveedor en el contenido de tales marcadores, para las cuatro plantas estudiadas.

El impacto del proyecto tiene dos vías: por un lado, el aporte al conocimiento en la composición y analítica de las cuatro plantas más consumidas en Uruguay y por otro muestra un estado de situación preocupante, de no ajuste a las reglamentaciones vigentes y en algunos casos, de potencial riesgo para la salud de los consumidores. Dado el elevado consumo de plantas medicinales en Uruguay, estos resultados son relevantes a los efectos de diseñar políticas adecuadas de control.

Ciencias Médicas y de la Salud / Ciencias de la Salud / Salud Pública y Medioambiental / Calidad e inocuidad de plantas medicinales y especias

Palabras clave: cultivo de plantas medicinales convencionales y agroecológicas / autenticidad / metabolitos secundarios /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Las plantas medicinales y las especias (PM&E) se utilizan mundialmente desde los albores de la humanidad como ingredientes en alimentos, té y medicamentos por sus sabores, aromas y propiedades farmacológicas. La mayoría de las plantas medicinales y especias (PM&E) se comercializan como polvo, hojas, cortezas o raíces molidas, secas o frescas. Las tendencias actuales de los consumidores en pos de opciones naturales revitalizaron el uso de PM&E como alternativa terapéutica, aumentando el mercado exponencialmente en los últimos años. Pero siempre fueron un recurso terapéutico para sectores específicos de la población como comunidades indígenas o grupos sociales que, por su situación económica,

no pueden acceder a medicamentos de síntesis, por lo que el componente social no puede ser desconocido. El dilema es: ¿Medicina alternativa o medicina de los que no tienen alternativa?. Actualmente, su forma de uso se ha diversificado: como tales "in natura", como infusiones o tinturas, en fitoterápicos o productos farmacéuticos sofisticados, pero también en la industria cosmética, perfumera y culinaria. La globalización permitió acceder a PM&E de todo el mundo: salvajes, cultivadas de forma convencional y también agroecológicas. Encuestas muestran que entre el 65 y el 80% de la población prefiere consumirlas para tratamientos medicamentosos (Tripathy et al., 2015; Shaban et al., 2016). Generalmente el uso de PM&E se asocia a la idea de inocuidad y mayor seguridad dado su origen natural. La colecta de plantas tiene como inconveniente, la escasa caracterización botánica de la planta que lleva a confusión riesgosa sobre la autenticidad de la especie empleada: Es necesario completar la caracterización del vegetal para su uso seguro. La actividad farmacológica de las plantas se debe a los metabolitos secundarios que produce. Estos son compuestos químicos que la planta biosintetiza para adaptarse y vivir en su hábitat. Esta adecuación es dinámica y responde a las características particulares del ambiente: seco/húmedo, soleado/sombrío, frío/cálido. Las variaciones en la producción de metabolitos secundarios son la causa de la variabilidad de la eficacia de ellas. Las plantas no producen un único compuesto bioactivo, producen un conjunto de metabolitos llamados "fitocomplejo" (Alonso, 2003). Este fitocomplejo es responsable de la actividad terapéutica, que la modula, presentando diferencias con la actividad de la principal sustancia activa, como las observadas entre el opio y la morfina. El fitocomplejo es el perfil de metabolitos secundarios que la planta produce, característico de la especie, pero condicionado por el hábitat donde se encuentra. Así entornos agronómicos afectan potencialmente los niveles de los metabolitos secundarios: los antioxidantes en los cultivos de frutas y hortalizas (Vallverdú-Queralt, et al., 2011; López-Yerena, et al., 2019). El perfil de metabolitos es importante para la medicina herbal y las ciencias farmacéuticas (Chan, et al. 2007). Su caracterización analítica permite la identificación de marcadores bioactivos, para desarrollar nuevos agentes fitoterapéuticos y nutraceuticos (Pandey, et al., 2011). Los perfiles metabólicos, permiten seleccionar conjuntos de compuestos útiles como marcadores de autenticidad en PM&E (Mihailova, et al., 2021). La creciente demanda por PM&E, requiere una producción más intensiva, en lugar de la recolección tradicional, obligando a niveles mayores de producción, inversión y desarrollo en técnicas de cultivo para optimizar y maximizar rendimientos. Esto se logra con cultivos convencionales, donde se aplican productos químicos como fertilizantes y pesticidas para protegerlos de plagas y enfermedades (OMS, 2007; Tripathy et al., 2015). Hoy en día, solo un pequeño porcentaje de hierbas medicinales se recolectan de la naturaleza, la mayoría de ellas se cultivan (Kosalec et al., 2009), asegurándose así la homogeneidad y disponibilidad de la materia prima, pero no su inocuidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció criterios de calidad para obtener productos seguros y efectivos (OMS, 2007), donde sugiere seguir las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) para toda la cadena de producción. Las farmacopeas incluyen una sección para el análisis de residuos en plantas medicinales, pero esto es realizado esporádicamente. No existe regulación, para productos "over the counter, OTC", y el consumo es sin prescripción ni control médico. Conocer los residuos de pesticidas en las PM&E es importante pues asegura el consumo sin riesgos. Posiblemente los productos químicos utilizados no siempre estén autorizados para su uso en PM&E o, aún permitidos, pueden utilizarse indebidamente y éstos residuos pueden encontrarse en niveles superiores a los límites máximos de residuos. La OMS recomienda que todo país debe contar al menos con un laboratorio especializado en análisis de residuos de pesticidas en PM&E para asegurar su consumo seguro por la población. En Uruguay, el laboratorio del GACT de la UdelaR es el único que puede realizar estos análisis. El cultivo de plantas medicinales y/o aromáticas se puede realizar también con manejos agroecológicos/orgánico (Altieri, 1995). Generalmente ellos se perciben como más saludables y seguros que las convencionales. Los alimentos orgánicos tienen atributos sensoriales superiores, no contienen pesticidas o fertilizantes y si niveles elevados de nutrientes y fitoquímicos (Williams, 2002). Este mercado crece anualmente, (Hurtado-Barroso, 2019). A nivel mundial, la agricultura orgánica emplea 57,8 millones de hectáreas, con un mercado

valorado en 89,7 mil millones USD (IFOAM, 2018). Por poseer un valor agregado sustancial los productos orgánicos son objetivos de fraude. En los últimos años ha aumentado el número de fraudes de productos convencionales declarados como orgánicos (Mihailova, et al., 2021). En Uruguay, el área bajo certificación orgánica representa cerca del 5% de la superficie agrícola total, siendo los principales rubros: carne vacuna, hortalizas, miel y derivados, vinos, arroz, otros cereales, frutas, hierbas aromáticas y medicinales, leche, derivados, y conservas (INIA, 2007). Las diferencias de esta producción y el cultivo convencional, son: el manejo de la fertilidad del suelo, la rotación de cultivos, el control biológico, el uso de agroquímicos no sintéticos. (Williams, 2002). La biosíntesis fenólica en plantas se ve afectada por el modo de cultivo, condiciones medioambientales y el tipo de fertilización. Las PM&E, de producción orgánica tienen un contenido fenólico más alto que las convencionales pero con menor contenido de carotenoides. No es posible determinar el modo de cultivo centrándonos en un único compuesto "marcador". Es preferible caracterizar los perfiles metabólicos, y compararlos uno a uno. Así empleando modelos estadísticos multivariados, se establecen los metabolitos que distinguen entre modos de cultivo. Se plantea establecer una metodología para la caracterización global de las PM&E, desde su identificación botánica, sus modos de cultivo y la presencia de contaminantes. Se generará conocimiento básico que será relevante para la comprensión del metabolismo secundario con y sin aplicación de pesticidas. La evaluación conjunta de perfiles metabólicos y residuos de pesticidas era impensable años atrás. Los sistemas acoplados de técnicas cromatográficas y espectroscópicas de masas ultrasensibles y la resonancia nuclear magnética permiten la realización de ambos tipos de estudios. En las PM&Es los pesticidas se encuentran en concentraciones del orden de $\mu\text{g/kg}$ y los metabolitos secundarios en el rango de g/kg (Pérez-Parada et al., 2011). Utilizando las metodologías comúnmente empleadas para el análisis de residuos de pesticidas, los metabolitos secundarios como los carotenoides, aceites esenciales, alcaloides o polifenoles se extraen conjuntamente con los compuestos de interés por la similitud en sus propiedades fisicoquímicas. Los pesticidas en PM&E se determinan por diferentes métodos de extracción: sólido-líquido (SLE) (Martínez-Domínguez et al., 2014), micro y extracción en fase sólida (SPME y SPE) (Rodrigues et al., 2005; Martínez-Domínguez et al., 2014) (Tuzimski, 2011). La extracción utilizando el esquema QuEChERS (Anastassiades et al. (2003a, 2003b) demostró ser la más efectiva y eficiente en las plantas medicinales (Martínez-Domínguez et al., 2014; Páleníková y Hrouzková, 2016, Besil et al 2017). Además los sistemas instrumentales de última generación permiten identificar y cuantificar inequívocamente los contaminantes presentes a nivel de trazas. Se reportan residuos de pesticidas en hierbas medicinales: Chamomille (Abou-Arab y Abou Donia, 2001), Ginseng (Durgnat et al., 2005), Cilantro, Hinojo (Dogheim et al., 2004), y Alcachofa (Machado, et al., 2017). Para conocer los perfiles metabólicos pueden emplearse diferentes técnicas: el tamizaje fitoquímico, o técnicas sofisticadas como cromatografía, espectrometría de masas, espectrofotometría de infrarrojo y resonancia magnética nuclear. La incidencia del uso de fitohormonas en el contenido metabolitos secundarios en Caléndula se evaluó mediante el contenido de fenoles totales, y de flavonoides (Gadzovska, et al., 2007). Hay escasos reportes de estudios correlacionando los metabolitos secundarios, en PM&E con un manejo convencional o agroecológico. El análisis global de los metabolitos producidos en plantas medicinales utilizando cromatografía líquida y gaseosa acoplada cuadrupolos, tiempo de vuelo, u ORBITRAP es una excelente herramienta, como la Resonancia Nuclear Magnética (Lattanzio, et al., 2009; Xia, et al., 2018; Okada, et al., 2010; Mihailova, et al., 2021). El análisis multivariado resulta un enfoque eficaz para la evaluación integral de las plantas medicinales basándose en la diversidad de huellas dactilares de metabolitos (Okada, et al., 2010, Shyur, et al., 2013). Una ventaja de aplicar estos estudios es que se consideran los compuestos importantes farmacológicamente, y también los metabolitos menores. Particularmente, el análisis de componentes principales (PCA), el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y el de mapas de discriminación, se emplean para la clasificación y discriminación interespecie e intermodo de cultivo en PM&E (Xiao, et al., 2018).

El presente proyecto tiene como objetivo aportar al consumo seguro de plantas medicinales a través de su

caracterización botánica y fitoquímica, discriminando entre modos de cultivo agroecológico y convencional a través de perfiles de metabolitos secundarios como marcadores de autenticidad,. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos.

1. Determinar las características botánicas para la identificación de las 6 especies más comercializadas en Uruguay de PM&E y sus posibles adulterantes
2. Desarrollar metodologías para determinar el perfil metabólico de los grupos de compuestos bioactivos en esas especies y sus posibles adulterantes
3. Aplicar las metodologías fitoquímicas desarrolladas para determinar el perfil metabólico de las especies bajo diferentes modos de cultivo
4. Identificar las diferencias entre especies cultivadas convencionales y orgánicas
5. Desarrollar flujos de trabajo para distinguir condiciones de cultivo
6. Desarrollar metodologías para la determinación de residuos de pesticidas en las especies en estudio
7. Diseñar un modelo de monografía para cada especie botánica, donde se incluya la información botánica, los marcadores fitoquímicos típicos, los indicadores del tipo de cultivo, la metodología analítica para residuos de pesticidas y los hallazgos más frecuentes.

Metodología/Diseño del estudio

A partir de los datos del relevamiento realizado por la QF. Rossina Figliolo, se trabajó en las plantas más consumidas en el país. Las muestras comerciales se adquirieron en plaza de proveedores locales. Se detectaron cooperativas nacionales de productores orgánicos y agroecológicos que potencialmente nos suministrarían muestras originales. Este contacto se perdió por lo que el objetivo específico 4 no se cumplió. Para la construcción de los perfiles se analizaron botánica y químicamente 10 muestras de cada uno de las 4 especies seleccionadas (marcela, caléndula, manzanilla, malva) para poder realizar un tratamiento estadístico adecuado. De las muestras a identificar se separó una parte para la herborización y la otra para análisis químico, fitoquímico y contenido de pesticidas reportados.

2. Caracterización botánica Los análisis para la identificación botánica incluyeron observaciones macroscópicas y microscópicas. La observación macroscópica se realizó a ojo desnudo o con la ayuda de lupa. La observación microscópica se realizó bajo microscopio óptico o de luz polarizada según el caso. El análisis microscópico exige la elaboración de preparados temporales, que dependiendo del material de estudio se diafanizaron, fueron disociados levemente o se realizaron cortes histológicos a mano alzada con tinción de azul de toluidina. La identificación de la droga se realizó comparando los caracteres taxonómicos observados con las descripciones detalladas en las farmacopeas, literatura especializada ó con patrones vegetales guardados en el Herbario ARECHAVALETA de Facultad de Química. Este es un herbario con inscripción internacional y el reservorio de toda la información sobre especies medicinales de Uruguay. A partir de las referencias antes mencionadas, se elaboraron guías rápidas de identificación para cada hierba que ayudan en este proceso, listando los principales caracteres diagnósticos entre especies y adulterantes. Al detectarse adulteración/presencia de materiales extraños, se reportaron estos hallazgos. La adulteración vegetal detectada se analizó químicamente para la determinación del perfil cromatográfico de ésta, lo que fue realizado para el tilo. 3. Análisis químicos Se desarrolló un procedimiento novedoso, miniaturizado, que cumple con preceptos de la química Verde. Se realizaron tres réplicas genuinas de una sola extracción de cada muestra, el extracto se dividió para el estudio de perfiles y residuos de pesticidas Extracción: 2g de material vegetal seco se hidratan con agua y se extraen con 10mL de acetonitrilo. Se realiza el salting out con MgSO₄ y NaCl. La fase orgánica se separa en tres, para análisis de residuos, determinación de perfiles por (LoG)C-MS/MS y por NMR. 3.1. Análisis de residuos de pesticidas La primera parte del protocolo mencionado, corresponde al método para la detección de multirresiduos QuEChERS (quick, easy, cheap, rugged and safe). Se realizó la limpieza del extracto para evitar interferencias y

preservar el instrumental analítico, de acuerdo a las características fisicoquímicas y composición de los distintos especímenes, de acuerdo a la experiencia del grupo empleando absorbentes adecuados. Se optimizaron la precisión y exactitud para 100 pesticidas y esas condiciones optimizadas fueron validadas de acuerdo a la GUIA SANTE 2021, testeando además, linealidad, efecto matriz y reproducibilidad. El método validado será usado para evaluar el contenido de pesticidas en los materiales en estudio, cada muestra por duplicado en cada una de las tres réplicas.

3.2. Determinación de perfiles Las muestras fueron analizadas por TLC siguiendo técnicas farmacopeicas u otras desarrolladas específicamente y se amplió la caracterización de los polifenoles por LC-MS/MS en dos etapas: Se optimizaron las condiciones cromatográficas y se identificó a los metabolitos contra estándares por su espectro de masas o por estudios por MS2 empleando el sistema Qtrap 4000.

4. Tratamiento de datos

4.1 Los datos de residuos de pesticidas se trataron como es habitual.

4.2 Los perfiles de metabolitos secundarios se ordenan de acuerdo a su tiempo de retención cromatográfico y su peso molecular, en caso de compuestos desconocidos. Se cuantificó su proporción relativa en el extracto y en relación al material seco. Se testeó la homogeneidad de cada set de réplicas en las diferentes muestras y estas entre sí para generar. Con esos resultados se realizarán estudios multivariados como análisis de componentes principales.

5. Generación de monografías Los resultados de perfiles se compilan, los hallazgos para cada especie clasifican junto a las metodologías analíticas descritas para cada caso, indicando los marcadores de autenticidad.

Resultados, análisis y discusión

Los resultados pueden compilarse en tres grandes secciones. Primeramente, se desarrollaron cartillas de identificación botánica de las plantas en estudio. En particular, dados los antecedentes de trabajos previos, donde el caso de *Tilia* sp. fue especialmente desafiante ya que existen varias especies de Tillo que no están autorizadas a su uso y por lo tanto su expendio, el trabajo se centró en comprobar el ajuste a la definición de droga de los ejemplares estudiados a partir de las cartillas elaboradas. La definición de *Malva* es confusa ya que distintas farmacopeas tienen diferentes definiciones de la droga. Por lo tanto, no fue posible usar un único criterio para la aceptación como genuinas las muestras. *Calendula*, *manzanilla* y *marcela* cumplan con la definición de droga. Un segundo ítem fue el estudio de la adecuación del material dispensado como planta medicinal a la normativa vigente. Se constataron varias irregularidades en cuanto a su presentación, fundamentalmente en el peso de droga vegetal y en la presencia de materia extraña fundamentalmente. El segundo aspecto fue el desarrollo de metodología analítica específica por cromatografía y la aplicación de los métodos farmacopeicos para identificar los marcadores característicos de cada especie. En todos los casos se analizaron 50 muestras por especie vegetal. Las muestras presentaron diferencias marcadas en el contenido de marcador fitoquímico, que es un indicador de la calidad del producto medicinal. El tercer aspecto fue el estudio de la presencia de residuos de pesticidas en las muestras comerciales que se analizaron. Se validaron metodologías analíticas desarrolladas de residuos de pesticidas para las cuatro plantas. Se encontró 2,4D en muestras de *marcela*, por debajo de los límites máximos aceptables por la legislación. Estos resultados se han publicado y presentado en reuniones nacionales y regionales.

Conclusiones y recomendaciones

Se desarrollaron metodologías generales para la identificación y el análisis de plantas medicinales expandidas in natura, así como para el estudio de residuos de pesticidas.

Se constató un apartamiento general de la normativa vigente en las muestras comerciales de los especímenes estudiados, fundamentalmente en materia extraña y contenido de droga vegetal, lo que apunta a la falta de control de calidad e higiene del producto que se expende en la mayoría de los casos.

Se observo una variacion muy importante entre proveedores en la calidad del producto ofrecido a la venta.

Recomendacion:

Se constata en general un incumplimiento de los productos estudiados de la normativa vigente, por lo que aparece como necesario un control mas estricto del material que se comercializa por parte de las autoridades competentes

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Póster	Control de calidad en productos naturales : estudio de muestras comerciales de marcela	Porley Santana, Guzman Migue, Ignacio Figliolo Mederos, Rossina Besil Arismendi, Maria Natalia Cesio, Verónica Heinzen, Horacio		https://hdl.handle.net/20.500.12008/49578	Finalizado
Póster	Aportes al control de calidad en hierbas medicinales in natura: determinación de residuos de pesticidas y LARHD en Achyrocline spp.	Cheveste, Camila Figliolo, Rossina Cesio, Verónica Heinzen, Horacio Besil, Natalia		https://hdl.handle.net/20.500.12008/49568	Finalizado
Póster	Control de calidad preliminar de Matricaria chamomilla L. in natura	Figliolo, Rossina Besil, Natalia Martínez, Gastón Cesio, Verónica		https://hdl.handle.net/20.500.12008/49569	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Póster	Análisis de muestras comerciales de malva expendidas en Uruguay	Porley Santana, Guzman Miguez, Ignacio Figliolo Mederos, Rossina Besil Arismendi, Maria Natalia Cesio, Verónica Heinzen, Horacio		https://hdl.handle.net/20.500.12008/49570	Finalizado
Póster	¿Qué tilo consumimos? Control de calidad macroscópico e identificación botánica de especies de Tilia spp comercializadas en Uruguay	Figliolo, Rossina Cesio, Verónica da Luz, Claudia Heinzen, Horacio Besil, Natalia		https://hdl.handle.net/20.500.12008/49575	Finalizado
Artículo científico	Control de calidad preliminar de hierbas in natura comercializadas en Uruguay. Casos de estudio: manzanilla, marcela y tilo	Figliolo, Rossina Besil, Natalia Da Luz-Graña, Claudia Martínez, Gastón Porley, Guzmán		https://hdl.handle.net/20.500.12008/49597	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
		Migues Borghini, Ignacio Cesio, Verónica Heinzen, Horacio			

Referencias bibliográficas

- [1] M. F. O. y R. P. Joao Cleverson Gasparetto, Cleverson Antonio Ferreira Martins, Sirlei Sayomi Hayashi, "Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine," *Pharm. and Pharmacol.*, vol. 64, pp. 172–189, 2011, [Online]. Available: 10.1111/j.2042-7158.2011.01383x
- [2] A. E. y A. E. C. Carlos F. CHICLANA, "Topical antiinflammatory activity of *Malva sylvestris* L. (Malvaceae) on carragenin-induced edema in rats," *Lat. Am. J. Pharm.*, vol. 28, no. 2, pp. 275–278, 2008.
- [3] M. F. O. Arthur S. Prudente, Alliete M.V.Loddi, Marcia R. Duarte, Adair R.S. Santos, Marcia T. Pochapski, Moacir G. Pizzolatti, Sirlei S. Hayashi, Francinete R. Campos, Roberto Pontarolo, Fabio A. Santos, Daniela A. Cabrini, "Pre-clinical anti-inflammatory aspects of a cuisine and medicinal millennial herb: *Malva sylvestris* L.," *ELSEVIER*, vol. 58, pp. 324–331, 2013.
- [4] C. Europea, *Farmacopea Europea* 10.0, 10th ed. 2021.
- [5] CHAT GPT, "Malvidina en malva," 2023. chat.openai.com/c/c3a2aa94-11a2-437a-8e7c-cfcee58e42e5
- [6] Ministerio de salud publica, "Decreto 403/16." Montevideo, Uruguay, p. 44, 2016. [Online]. Available: impo.com.uy/diariooficial/2016/12/29/8
- [7] S. B. Hildebert Wagner, *PLANT DRUG ANALYSIS*. Springer-Verlag Berlin, 1996.
- [8] V. C. and N. S. Marine Lambert, Emmanuelle Meudec, Arnaud Verbaere, Gerard Mazerolles, Jeremie Wirth, Gilles Masson, "A high-throughput UHPLC-QqQ-MS Method for Polyphenol profiling in Rose Wines," *Molecules*, vol. 20, pp. 7890–7914, 2015, doi: 10.3390/molecules20057890.
- [9] R. H. R. Camila Ramos Pinto Samapio, Lua Maria Crespo Anastacio, Thais Martins Guimaraes de Francisco, "Anthocyanins and phenolic compounds in five ripening stages of *Byrsonima ligustrifolia* after extraction optimization," *J. food Nutr. Res.*, vol. 54, no. 4, pp. 365–378, 2015.
- [10] G. C. Ahmed M. Mustafa, Simone Angeloni, Doaa Abouelenein, Laura Acquaticci, Jianbo Xiao, Gianni Sagratini, Filippo Maggi, Sauro Vittori, "A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 36 polyphenols in blueberry, strawberry and their commercial products and determination of antioxidant activity," *ELSEVIER*, 2022.
- [11] C.-Q. D. Xin-Ke Zhang, Si-Yu Li, Xu Zhao, Qiui-Hong Pan, Ying Shi, "HPLC-MS/MS-based targeted metabolomic method for profiling of malvidin derivatives in dry red wines," *ELSEVIER*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109226>.

Licenciamiento

Reconocimiento-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-SA)

