



61159

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
FISICO-QUIMICAS Y NATURALES

SUTIL, S.B.
Toxicidad y Acción A

2005

61159



***TOXICIDAD Y ACCION ANTIHERPETICA DE
DERIVADOS OLEOSOS DE
Menthostachys verticillata. Griseb. (Epling)***

Mic. Sonia Beatriz SUTIL

Tesis para optar al Título
Magíster en Biotecnología

61159

Directora
Dra. Liliana Inés Sabini de Rivarola

Co-Director
Dr. Julio Alberto Zygadlo

Río Cuarto - 2005

0.116

61159

MFN:
Clasif:
T.394

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico
AE: Aceite esencial
ARN: ácido ribonucleico
CC₅₀: Concentración citotóxica cincuenta
CG: Cromatografía gaseosa
c.s.p.: cantidad suficiente para
DICC₅₀/ml: Dosis infectiva cultivo celular cincuenta por mililitro
DL₅₀: Dosis letal cincuenta
DMSO: Dimetilsulfóxido
ECP: Efecto citopático
EDTA: Ácido etilen diamino tetracético
EEC: Extracto etanólico crudo
°C: grado centígrado
g: gramo
h: hora
IVC: Índice de viabilidad celular
KDa: Kilo Dalton
MC: Medio de crecimiento
MCNC: Máxima concentración no citotóxica
MEM: Medio esencial mínimo
µg: microgramo
µl: microlitro
µm: micrómetro
mg: miligramo
min: minuto
ml: mililitro
MM: Medio de mantenimiento
m.o.i.: multiplicidad de infección
MP: Medio para placas
N/20: Normal veinte
OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Solución balanceada de fosfatos

p.i.: post infección

r.p.m.: revoluciones por minuto

SFB: Suero fetal bovino

UFP: Unidad formadora de placa

U.I.: Unidades internacionales

VHS: *Virus Herpes simplex*

VHS-1: *Virus Herpes simplex tipo 1*

VHS-2: *Virus Herpes simplex tipo 2*

vs.: versus

INDICE GENERAL**1. INTRODUCCIÓN**

1.1. VIRUS	1
1.1.1. Familia Herpesviridae	1
1.1.2. Virus <i>Herpes suis</i>	1
1.2. TERAPIA ANTIVIRAL.....	2
1.3. PLANTAS MEDICINALES	4
1.3.1. Cronología histórica de su utilización.....	4
1.3.2. Importancia de las plantas medicinales en el mundo.....	6
1.3.3. Caracterización de sus principios activos	7
1.3.3.a. Principios activos antivirales	7
1.3.4. Aceites esenciales	8
1.3.4.a. Características generales.....	8
1.3.4.b. Métodos de extracción y análisis	9
1.3.4.c. Modo de acción.....	11
1.3.4.d. Propiedades antimicrobianas.....	11
1.4. RIQUEZA FLORISTICA DE LA PROVINCIA DE CORDOBA: IMPORTANCIA DE SU ESTUDIO	12
1.5. <i>Minthostachys verticillata</i>	13
1.5.1. Descripción	13
1.5.2. Antecedentes antimicrobianos	14
1.6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
1.7. HIPOTESIS	17

2. OBJETIVOS

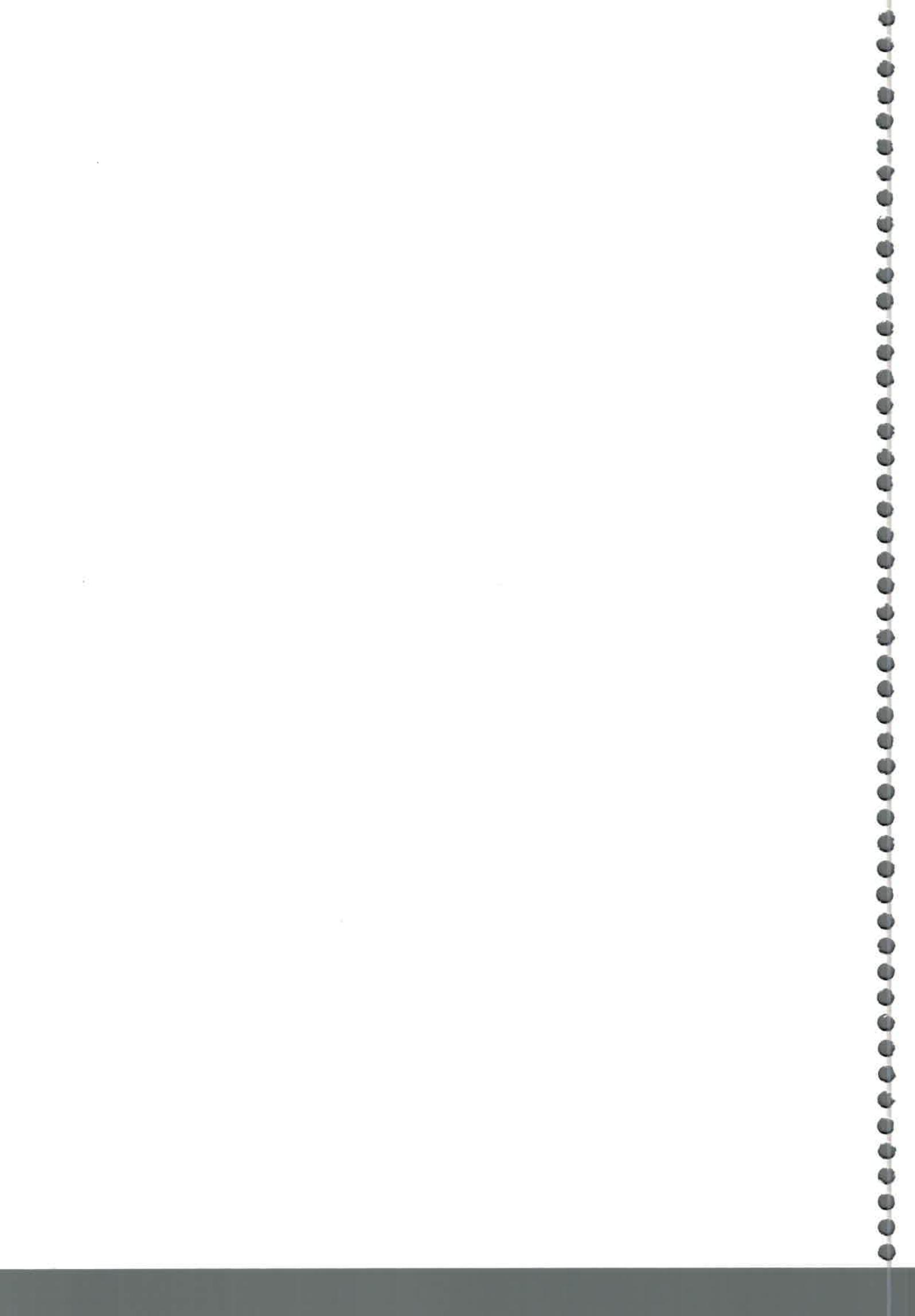
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	18

3. MATERIALES

3.1. DROGAS	19
3.2. SOLUCIONES	20
3.2.1. Solución de azul tripán al 0,5%	20

3.2.3. Solución balanceada de fosfatos (PBS).....	20
3.2.3. Solución de bicarbonato de sodio al 5%	20
3.2.4. Solución de cristal violeta.....	21
3.2.5. Solución de formol al 10%	21
3.2.6. Solución de glutamina.....	21
3.2.7. Solución de metil celulosa al 1,5%.....	21
3.2.8. Solución de penicilina – estreptomicina	22
3.2.9. Solución de rojo fenol al 0,5%.....	22
3.2.10. Solución de tripsina - EDTA 2X (solución stock).....	22
3.2.11. Solución de tripsina - EDTA 1X (solución de trabajo)	23
3.3. MEDIOS	23
3.3.1. Medio de Crecimiento (MC)	23
3.3.2. Medio de congelamiento celular.....	23
3.3.3. Medio de Mantenimiento (MM).....	23
3.3.4. Medio para Placa (MP)	23
3.3.5. Medio tioglicolato	24
3.3.6. Caldo Saboureaud Glucosado	24
3.3.7. Medio de crecimiento para larvas de <i>Artemia salina</i> (solución de sal marina al 3,3%).....	24
3.4. MATERIAL VEGETAL	25
3.5. CULTIVOS CELULARES	25
3.6. LARVAS DE <i>Artemia salina</i>	25
3.7. VIRUS	25
4. METODOS	
4.1. LINEAS CELULARES	26
4.1.1. Propagación y mantenimiento.....	26
4.1.2. Recuento celular	26
4.1.3. Conservación	26
4.2. VIRUS	27
4.2.1. Amplificación viral	27

4.2.2. Titulación viral	28
4.3. MATERIAL VEGETAL Y ACEITE ESENCIAL	28
4.3.1. Recolección.....	28
4.3.2. Preparación del material vegetal.....	29
4.3.3. Obtención del Aceite Esencial (AE)	29
4.3.4. Cromatografía Gaseosa (CG) del AE.....	30
4.3.5. Determinación de la densidad del AE	30
4.4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	30
4.4.1. Toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	31
4.4.1.a. Obtención de larvas de <i>Artemia salina</i>	31
4.4.1.b. Determinación de Dosis Letal 50% (DL ₅₀).....	31
4.4.2. Determinación de Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)	34
4.4.2.a. DMSO	34
4.4.2.b. Aceite esencial de <i>Minthostachys verticillata</i>	34
4.4.2.c. Componentes mayoritarios del AE utilizados en formas individual y combinada	37
4.4.3. Determinación de Concentración Citotóxica 50%	39
4.5. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE COMPONENTES MAYORITARIOS DEL AE DE <i>Minthostachys verticillata</i>	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1. LINEAS CELULARES	41
5.1.1. Propagación y mantenimiento.....	41
5.1.2. Conservación	42
5.2. VIRUS	43
5.2.1. Amplificación y titulación viral.....	43
5.3. ACEITE ESENCIAL DE <i>Minthostachys verticillata</i>	44
5.3.1. Obtención del aceite esencial	44
5.3.2. Cromatografía gaseosa del AE de <i>Minthostachys verticillata</i>	46
5.4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD DEL AE DE <i>M. verticillata</i> Y SUS COMPONENTES MAYORITARIOS	50



5.4.1. <i>Artemia salina</i>	51
5.4.1.a. Obtención de larvas de <i>Artemia salina</i>	51
5.4.1.b. Determinación de Dosis Letal 50% (DL ₅₀) del AE de <i>M. verticillata</i> y sus componentes mayoritarios	51
5.4.2. Determinación de Máxima Concentración No Citotóxica	54
5.4.2.a. Máxima Concentración No Citotóxica de DMSO.....	55
5.4.2.b. MCNC del AE de <i>M. verticillata</i>	56
5.4.2.c. MCNC de los componentes mayoritarios del AE, en formas individual y combinada	58
5.4.3. Determinación de Concentración Citotóxica 50%	68
5.5. DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL AE DE <i>M. verticillata</i> Y SUS COMPONENTES MAYORITARIOS	78
6. CONCLUSIONES	83
7. BIBLIOGRAFÍA	85

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentraciones en mg/ml, del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> y sus componentes puros, ensayados en su potencial tóxico sobre <i>Artemia salina</i>	33
Tabla 2: Concentraciones de DMSO, AE y los componentes mayoritarios de <i>M. verticillata</i> , ensayadas en células Vero y HEp-2, para la determinación de las MCNC de cada muestra.....	36
Tabla 3: Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de las diferentes mezclas entre pulegona – mentona – limoneno a la proporción encontrada en la planta, ensayadas en células Vero y HEp-2, para la determinación de sus MCNC.....	38
Tabla 4: Porcentajes de los compuestos identificados en el AE de <i>M. verticillata</i>	48
Tabla 5: DL50 del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> , sus principales componentes y combinaciones sobre <i>A. salina</i>	53
Tabla 6: Toxicidad del AE de <i>M. verticillata</i> y sus componentes mayoritarios sobre dos líneas celulares a las 72 h pos-tratamiento.....	61
Tabla 7: Combinación de los compuestos puros del AE de <i>M. verticillata</i>	63
Tabla 8: MCNC e Índice de Toxicidad de componentes puros, empleados en forma individual o combinados, en células Vero.....	64
Tabla 9: MCNC e Índice de Toxicidad de componentes puros, empleados en forma individual o en mezclas, en células HEp-2.....	66

Tabla 10: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEP-2 a diferentes concentraciones de pulegona.....	69
Tabla 11: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEP-2 a diferentes concentraciones de mentona.....	70
Tabla 12: Porcentajes de viabilidad de células HEP-2 a diferentes concentraciones de limoneno.....	71
Tabla 13: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEP-2 a diferentes concentraciones de pulegona – mentona (P-M).....	72
Tabla 14: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEP-2 a diferentes concentraciones de pulegona – limoneno (P-L).....	73
Tabla 15: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEP-2 a diferentes concentraciones de mentona – limoneno (M-L).....	74
Tabla 16: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEP-2 a diferentes concentraciones de pulegona – mentona – limoneno. (P-M-L).....	75
Tabla 17: Valores de citotoxicidad de los componentes mayoritarios del AE de <i>M. verticillata</i> , ensayados en formas individual y combinados en células HEP-2.....	77
Tabla 18: Actividad antiviral del AE de <i>M. verticillata</i> y sus componentes mayoritarios, solos y combinados, a su MCNC frente al virus Herpes suis tipo 1, cepa RC/79 en células Vero.....	79

INDICE DE FIGURAS

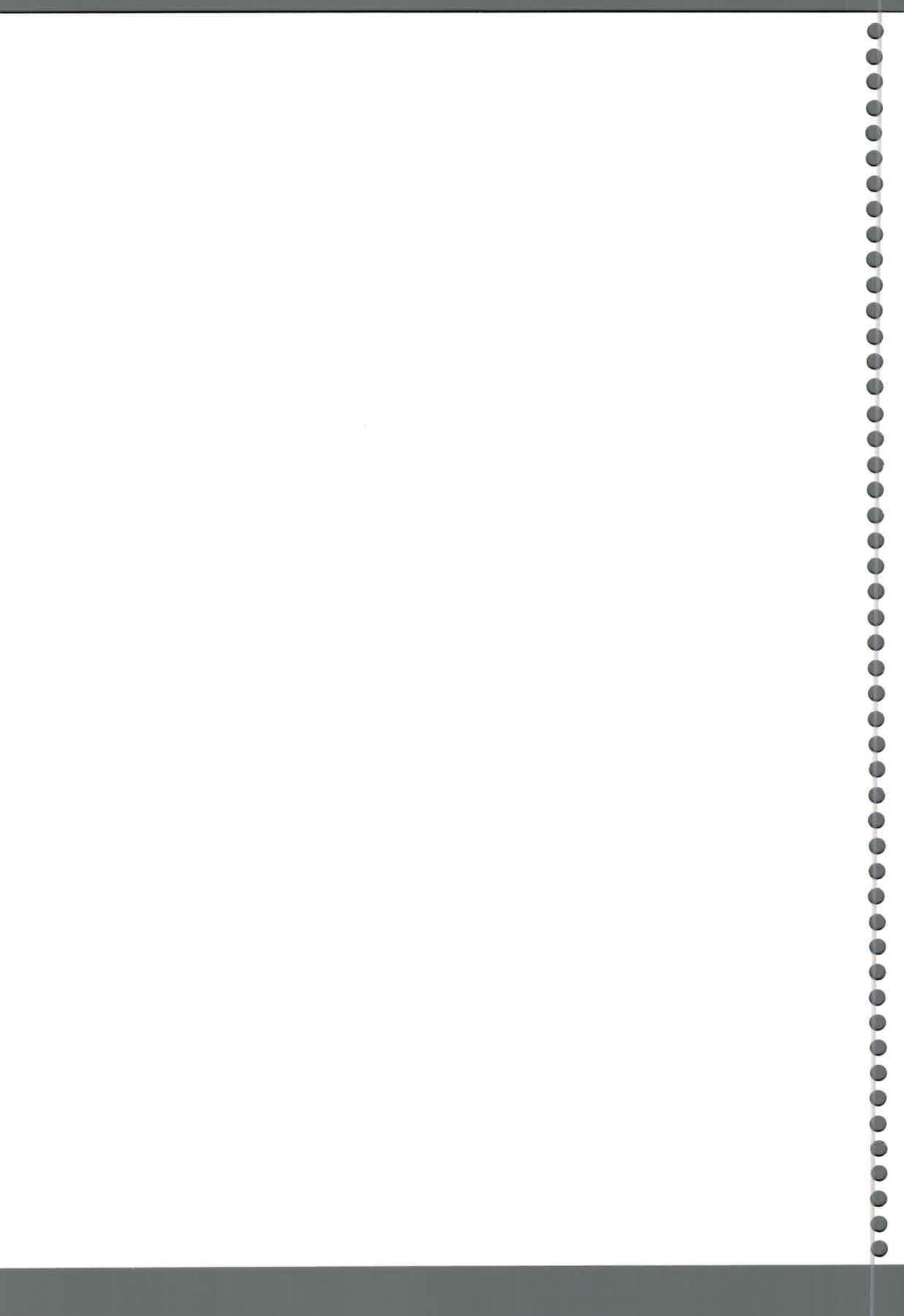
Figura 1: <i>Minthostachys verticillata</i>	14
Figura 2: Morfología normal de una monocapa de células Vero (20X).....	42
Figura 3: Morfología normal de una monocapa de células HEP-2 (20X).....	42
Figura 4: ECP producido por el virus <i>Herpes suis</i> tipo 1, cepa RC/79, en células Vero (20X).....	43
Figura 5: Placas de lisis producidas por el virus <i>Herpes suis</i> tipo 1, cepa RC/79, en células Vero.....	44
Figura 6: Perfil cromatográfico del AE de <i>M. verticillata</i> , obtenido por cromatografía gaseosa.....	47
Figura 7: Larvas de <i>Artemia salina</i> : a) control, b) tratadas con AE de <i>M. verticillata</i> a concentración tóxica.....	52
Figura 8: a) Efecto citotóxico de DMSO (10,92 mg/ml) sobre monocapa de células Vero, b) Morfología normal de una monocapa de células Vero (control celular) (20X).....	55
Figura 9: a) Efecto citotóxico de DMSO (18,20 mg/ml) sobre monocapa de células HEP-2, b) Morfología normal de una monocapa de células HEP-2 (control celular) (20X).....	56
Figura 10: Efecto citotóxico del AE de <i>M. verticillata</i> sobre monocapas de: a) células Vero (1.351 µg/ml), b) Células HEP-2 (1.158 µg/ml), (20X).....	57

Figura 11: Efecto citotóxico sobre monocapa Vero: a) Pulegona (340 µg/ml), (10X); b) Mentona (930 µg/ml), (32X); c) Limoneno (450 µg/ml) (10X).

..... 59

Figura 12: Efecto citotóxico sobre monocapa de células HEP-2: a) Pulegona (0,23 mg/ml), (20X); b) Mentona (0,93 mg/ml), (20X); c) Limoneno (5,83 mg/ml) (20X).

..... 60



INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1: CC ₅₀ de pulegona sobre células HEp-2.	69
Gráfico 2: CC ₅₀ de mentona sobre células HEp-2.	70
Gráfico 3: CC ₅₀ de limoneno sobre células HEp-2.	71
Gráfico 4: CC ₅₀ de la mezcla pulegona - mentona sobre células HEp-2.	72
Gráfico 5: CC ₅₀ de la mezcla pulegona - limoneno sobre células HEp-2.	73
Gráfico 6: CC ₅₀ de la mezcla mentona – limoneno sobre células HEp-2.	74
Gráfico 7: CC ₅₀ de la mezcla pulegona – mentona – limoneno sobre células HEp-2.	75



INTRODUCCION

1.1. VIRUS

1.1.1. Familia Herpesviridae

La familia Herpesviridae comprende más de 100 virus. Las características morfológicas de la partícula viral han constituido el criterio básico para agruparlos. Según las características biológicas, sus miembros se clasifican en tres subfamilias: Alfaherpesvirinae, Betaherpesvirinae y Gammaherpesvirinae.

La partícula viral consta de un "core" que se presenta como un carrete fibrilar en el que está enrollado el genoma viral. El ácido nucleico es ADN lineal doble cadena, con un rango de peso molecular entre 100 y 150 KDa. El virión presenta una cápside icosaédrica constituida por 162 capsómeros. Rodeando la cápside se encuentra el tegumento, constituido por material amorfo fibrilar. Externamente se encuentra la envoltura viral, constituida por una bicapa lipídica adquirida por gemación a través de la membrana nuclear y de la que se desprenden a modo de espículas las glicoproteínas de envoltura o peplómeros. El virión tiene un diámetro de 150 a 180 nm.

Son virus que replican en el núcleo de las células que parasitan e inducen infecciones latentes. Estas pueden reactivarse luego de meses o años de la primoinfección aguda; siendo las infecciones recurrentes, frecuentes y severas en los pacientes inmunodeprimidos, [Berría, M., 1998].

1.1.2. Virus *Herpes suis*

El virus *Herpes suis* pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia Alfaherpesvirinae. Los miembros que integran esta subfamilia se caracterizan por poseer un ciclo replicativo lítico de menos de 24 h de duración, rápida diseminación en cultivo, eficiente destrucción de las células infectadas y la habilidad de establecer latencia principalmente en las neuronas de los ganglios sensoriales del sistema nervioso, luego de una infección aguda, [De Cristóforo y col., 1996].

El virus *Herpes suis* es el agente causal de la enfermedad de Aujeszky, también conocida como pseudorrabia por su similitud con la rabia canina. En especies susceptibles de mamíferos y aves produce alteraciones en el sistema nervioso central, siendo el prurito uno de los síntomas más comunes en la zona

de infección primaria. La patología debida a este virus causa importantes pérdidas económicas en el ganado porcino, por lo que resulta de interés en virología veterinaria [Sabini, L., 1996].

Este agente viral debe su nombre a que es el único miembro de la familia que causa infección en porcinos, siendo éste su huésped natural. También se lo denomina *Herpes virus porcino* o *virus Aujeszky*.

Ubicados en la misma subfamilia se encuentran virus que provocan enfermedades importantes en humanos, como los *virus Herpes simplex tipo 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2)* y el *virus Varicela Zoster*, los cuales tienen una prevalencia cercana al 100% en la edad adulta. Estos inducen infecciones muchas veces asintomáticas o enfermedades menores, sin embargo en un porcentaje muy pequeño pueden producir patologías de extrema gravedad. La depresión inmunológica como consecuencia de los trasplantes y las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana generan la reactivación viral con posibilidad de alto grado de daño en el huésped y marcada tasa de mortalidad [Greenberg et al., 1987; De Cristófano y col., 1996].

1.2. TERAPIA ANTIVIRAL

Las enfermedades infecciosas virales constituyen un problema mundial debido a que los virus son resistentes a la quimioterapia existente. Actualmente hay sólo unas pocas drogas para el tratamiento de enfermedades virales, mientras que un número elevado de otras drogas está siendo investigado a nivel clínico [Vanden Berghe et al., 1986].

Siendo los virus estrictamente dependientes de los procesos metabólicos celulares, la mayoría posee limitados sistemas enzimáticos propios y estructuras específicas que puedan servir como blanco selectivo para una droga, que permita bloquear la síntesis viral, y detener la destrucción celular debido a la infección por este agente [Rastogi and Dhawan, 1990].

Resulta muy difícil encontrar sustancias con actividad antiviral efectiva de aplicación clínica. Para que una droga afecte selectivamente al agente patógeno, debe distinguir al invasor de las células propias del hospedador. Los

virus pueden replicarse solamente cuando invaden una célula y secuestran sus mecanismos de biosíntesis para fabricar nuevo material genético y proteínas virales. Dado que su ciclo de replicación está íntimamente relacionado con las funciones de la célula hospedadora, ofrecen entonces menos blancos vulnerables que le sean propios y que permitan un ataque selectivo.

Los virus *Herpes* continúan siendo una de las causas más comunes de infección viral en humanos y la frecuencia de episodios herpéticos recidivantes es cada vez mayor, debido al aumento de pacientes con inmunocompromiso [De Logu et al., 2000].

Las enfermedades herpéticas son tratadas generalmente con aciclovir, el cual es análogo de nucleósido. Este compuesto al ser fosforilado selectivamente por la timidita quinasa viral, actúa casi exclusivamente sobre la célula infectada. Otros antivirales, también análogos de nucleósidos son vidarabina, ganciclovir y azidotimidina. Sin embargo, los análogos de nucleósidos en muchos casos presentan como efecto secundario indeseado, una acción sobre la médula ósea produciendo neutropenia y/o anemia.

Vidaravina, posee además, efectos adversos gastrointestinales y neurológicos. Aciclovir es menos tóxico, sin embargo se ha aislado virus *Herpes simplex tipo 2*, resistente al aciclovir en pacientes con SIDA. Su empleo oral o parenteral sólo debiera ser considerado en casos especiales, debido a que el uso indiscriminado de la droga puede favorecer la selección de mutantes resistentes que, de infectar a pacientes inmunosuprimidos generará situaciones de difícil control [de Torres, R. y col., 1998].

El desarrollo de la resistencia viral a través de los agentes antivirales intensificó la necesidad de compuestos nuevos y efectivos contra las infecciones virales. Las plantas medicinales tienen una variedad de constituyentes químicos, los cuales tienen la capacidad de inhibir la replicación de varios tipos de virus a ADN o ARN. Los compuestos de origen natural son de interés como posibles fuentes para controlar la infección viral [Vanden Berghe et al., 1986; Jassim and Naji, 2003].

Si bien se han obtenido resultados prometedores con nuevas drogas para la prevención y la terapia de infecciones experimentales a VHS, se necesitan

nuevas moléculas como herramienta alternativa para el tratamiento clínico de estas patologías [De Logu et al., 2000].

1.3. PLANTAS MEDICINALES

1.3.1. Cronología histórica de su utilización

El hombre hizo uso de las plantas medicinales desde el inicio de su historia en la tierra. En un primer momento lo hizo a través de la observación del comportamiento de los animales y en una segunda instancia por medio del desarrollo de una intuición primaria. Ello le valió reconocer las diferentes plantas y así por medio del error y el acierto llegó a saber cuales le servían como alimento, cuales como medicina, e incluso tener especial cuidado con aquellas que eran tóxicas [Golberg, H., en base de datos internet: www.plantasmedicinales.org/veter.htm].

La documentación escrita sobre el uso de plantas medicinales se remonta a la antigüedad. En el código de Hamurabi, realizado bajo la dirección del rey de Babilonia en el año 1700 a.C., se mencionan plantas tales como orozuz (*Glycyrrhiza glabra*), menta (*Mentha arvensis*) y beleño (*Hyoscyamus niger*), que aún hoy se siguen usando. En el año 1550 a.C., los egipcios grabaron en las paredes de sus templos y también en papiros, datos sobre enfermedades y sus curas con información de más de 700 fórmulas medicinales [Núñez y Cantero, 2000].

En Europa, y en especial durante la Edad Media, quienes ostentaban el saber y conocimiento de las plantas medicinales eran los clérigos, y quien practicase la curación invocando espíritus u oraciones sacrílegas, era castigado con la muerte. Prueba de ello fue la famosa caza de brujas que diezmó por entonces gran parte del conocimiento popular sobre hierbas. El hecho que ellas utilizaban ceremonialmente algunas plantas tóxicas o alucinógenas como la mandrágora, originó un descrédito y una repulsa hacia este tipo de práctica [Golberg, H., en base de datos internet: www.plantasmedicinales.org/veter.htm].

A través de las conquistas realizadas en América por españoles y portugueses entre los siglos XIV-XVIII, se llevaron a Europa muchas drogas que los nativos de América utilizaban para tratar sus enfermedades [Núñez y Cantero, 2000].

El tiempo fue trascurriendo y entre el conocimiento rescatado de las culturas amerindias sumado a la tradición herborista de los pueblos centroeuropeos, hubo un resurgir de la práctica fitoterápica que se mantuvo hasta fines del siglo XIX, en donde las escuelas Ecléctica (en Norteamérica) y la Antroposófica y Homeopática (en Centroeuropa) fueron firmes baluartes en pro de una medicina natural. Pero a partir de la Segunda Guerra Mundial y con el advenimiento de la síntesis química, la fitoterapia fue dejándose de lado, quedando solo su uso circunscripto a las diferentes comunidades que mantenían incólume esta tradición. Los medicamentos obtenidos por síntesis química comenzaron a tener, tanto en el ámbito farmacéutico como en el médico, una amplia aceptación, merced a una metodología de investigación basada en ensayos preclínicos, clínicos y toxicológicos que permitían llevar un producto final con todas las garantías necesarias para la salud de la población.

Sin embargo, y en especial a partir del desgraciado episodio ocurrido con la talidomida en la década del 50' (hecho que motivó la creación de los primeros Comités de Farmacovigilancia y que puso en el tapete la confiabilidad de las metodologías de investigación) comienza a resurgir la curiosidad e interés por parte de los investigadores hacia los productos naturales. A partir de la década del 60' el Instituto Nacional de la Salud norteamericano sale a la búsqueda de principios activos que sean útiles particularmente en Oncología, como así también en enfermedades infecciosas, digestivas e inmunitarias. La metodología de investigación puesta en los productos de síntesis comienza a ser introducida de igual modo en los productos naturales, avalado por los modernos métodos de biotecnología y biología molecular.

Así, asistimos a un mercado de crecimiento sostenido en la puesta de productos fitoterápicos con todos los controles que marquen la seguridad, eficacia y calidad de cada producto en cuestión.

De esta manera la OMS establece un nuevo concepto en salud: la Fitomedicina. Esta se define como aquella disciplina que emplea en terapéutica a las plantas medicinales desde un contexto científico, es decir, donde la droga vegetal (ya como un verdadero fitomedicamento) ha sido analizada bajo criterios de investigación inherentes a las diferentes fases de la metodología científica: fases preclínicas, clínicas, ensayos farmacológicos, toxicológicos, mutagénicos, etc. Asimismo su empleo deja tácito el conocimiento de su mecanismo de acción, receptores, interacciones medicamentosas, efectos adversos, tóxicos y contraindicaciones.

Tras una encuesta de 5 años sobre la salud en el Mundo, la OMS ha sugerido a los gobiernos que incorporen los aspectos favorables de la medicina tradicional, especialmente el uso de plantas medicinales, en los procedimientos del cuidado de la salud primaria [Andrei, G., 1988; Betancur-Galvis et al., 2002; Chiang et al., 2002; Ayisi and Nyadedzor, 2003; Ooi et al., 2004].

1.3.2. Importancia de las plantas medicinales en el mundo

En los países desarrollados el 25% de las drogas médicas, están basadas en la flora medicinal. En los países en desarrollo el 75% de la población aún depende de medicina con plantas. En el mercado mundial actual, el 35% de los productos medicinales tienen en su composición química principios activos de origen vegetal, ya sea de manera total, parcial o como producto de hemisíntesis. Estas drogas derivadas de los vegetales fueron originalmente descubiertas a través del estudio del folclore aborigen [Núñez y Cantero, 2000]. Como ejemplo de ello en Europa y Estados Unidos, muchos fitomedicamentos ocupan puestos de privilegio en ventas, tales como: el ginkgo, el hipérico, la cimicífuga, el ginseng, la equinácea, la valeriana, el sabal o palmito de la Florida.

Dentro del reino vegetal se conocen aproximadamente 250.000 especies, sólo el 1% de estas especies han sido estudiadas exhaustivamente en cuanto a su composición química y su uso terapéutico [Mongelli y col., 1995; Saggese, D., 1959]. Ello implica que aún queda mucho por investigar, siendo las plantas un valioso cofre que guarda uno de los más importantes tesoros del hombre: el

de la salud [Golberg, H., en base de datos internet: www.plantasmedicinales.org/veter.htm].

1.3.3. Caracterización de sus principios activos

Las Plantas Medicinales son vegetales con metabolitos (principios activos) que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial para el organismo vivo. Dentro de los aspectos benéficos es que pueden servir como drogas o medicamentos para aliviar la enfermedad o reestablecer la salud, confiriéndole a las plantas propiedades terapéuticas [Sagrera Ferrandiz, J., 1993].

Las hojas constituyen uno de los órganos más interesantes de las plantas medicinales, pues es en ellas donde se realiza la mayor parte de los procesos metabólicos. Sin embargo, todas las partes del vegetal pueden contener principios activos.

A partir de la literatura consultada, es posible establecer que numerosos son los trabajos que han investigado diferentes actividades biológicas (antibacteriana, antifúngica, antiviral, herbicida, pesticida, antidepresiva, anticancerígeno, antimalarial, entre otras) a partir de plantas medicinales [Zunino et al., 2003]. Sin embargo, es de destacar que en la mayoría de los casos dicha actividad es atribuida a un determinado grupo de compuestos químicos, mientras que escasos son los reportes en donde llegan a identificar la molécula química involucrada.

1.3.3.a. Principios activos antivirales

Según la bibliografía consultada, los principios activos con actividad antiviral son de naturaleza química variada, entre los que se encuentran flavonoides [Lin et al., 1999]; proteínas [Ahmad et al., 1996]; compuestos terpénicos [Sotanaphun et al., 1999; Armaka et al., 1999]; compuestos fenólicos [Serkedjieva and Ivancheva, 1999]; polisacáridos [Xu et al., 1999].

1.3.4. Aceites esenciales

1.3.4.a. Características generales

Los aceites esenciales (AE) son fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas [Martínez, A., 2003, en base de datos internet: www.muiscas.udea.edu.co/~ff/esencias 2001b]. Estos se forman en tejidos especializados del vegetal y al crecer la planta son transportados a diferentes partes: hojas, raíces, semillas, tallos, flores y frutos.

Los AE son una mezcla compleja de compuestos, constituidos principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos, los cuales están formados por unidades de isopreno. Se estima que hay más de 1.000 monoterpenos y 3.000 estructuras sesquiterpénicas [Ciudad Banda, C., 2000]. En ciertas plantas, puede predominar uno de los constituyentes principales, mientras en otras hay un balance de varios componentes, donde los mismos individualmente representan distintos porcentajes del volumen total del aceite [Svoboda and Hampson, 1999].

Los AE se caracterizan por ser incoloros o amarillentos a temperatura normal, insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos apolares o en alcohol de alta graduación, lipofílicos y con un índice de refracción elevado. Su densidad suele ser inferior a la del agua. En la mayoría de las especies vegetales el contenido de AE no supera el 1%.

Las características organolépticas de los AE pueden estar dadas por los componentes mayoritarios. No obstante, la presencia de componentes trazas puede influenciar significativamente en el olor, el sabor y en las actividades biológicas del aceite.

En el vegetal los AE cumplirían varias funciones:

Atracción de agentes polinizadores (por su agradable aroma).

➤ Elementos de defensa frente al ataque de parásitos, animales herbívoros e insectos.

➤ Adaptación del vegetal ante condiciones de escasez hídrica.

- > Sustancias de reserva como dador de hidrogeniones en los procesos de óxido-reducción [Base de datos internet: www.plantasmedicinales.org/farmacognosia/sept2002/aceites_esenciales.htm]:

De acuerdo a manuscritos chinos y jeroglíficos egipcios, los sacerdotes usaron AE hace miles de años para curar enfermedades. Ellos son las formas más antiguas de medicina que conoce el hombre. Las investigaciones clínicas muestran por ejemplo que los AE de los inciensos contienen propiedades que estimulan en gran medida las actividades inmunes. La ciencia comienza ahora a investigar las sorprendentes sustancias curativas encontradas en los AE. Las investigaciones muestran que los mismos crean un medio ambiente en el cual las enfermedades bacterianas, virales y fúngicas no pueden vivir y comienzan a redescubrir estas sustancias que fueron usadas antiguamente [Baudoux, D., 2000].

1.3.4.b. Métodos de extracción y análisis

Los AE se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son:

- > Prensado: el material vegetal es exprimido para liberar el aceite. Este método es utilizado para obtener esencias de cítricos.
- > Destilación por arrastre con vapor de agua: la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado. La esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa.
- > Extracción con solventes volátiles: el vegetal seco y molido se pone en contacto con solventes tales como alcohol y cloroformo. Estos solventes solubilizan la esencia pero también otras sustancias como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura.
- > Enfleurage o método de enflorado: se utiliza en general para obtener aceites a partir de flores las cuales son puestas en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como

vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de AE y aceite vegetal la cual es separada posteriormente.

- Extracción con fluidos supercríticos: es de desarrollo más reciente. El material vegetal en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca dentro de una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo bióxido de carbono líquido), el aceite es así solubilizado y arrastrado. Luego el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, obteniéndose el aceite puro [Martínez, A., 2003, en base de datos internet: www.muiscas.udea.edu.co/~ff/esencias 2001b; Base de datos internet: www.naturesgift.com/extraction.htm].

Previo a la identificación de los componentes del AE, es necesario realizar el aislamiento de los mismos mediante la utilización de uno o varios métodos cromatográficos, tales como la cromatografía en columna y en capa fina. Sin embargo, actualmente hay técnicas de identificación más eficientes y rápidas como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y la cromatografía de gases (CG), así como también combinaciones CG-espectrometría de masa (EM), que permite obtener el espectro de masa de cada componente con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural.

Para el reconocimiento de los componentes de un AE no existe una prueba específica debido a la diversidad de grupos funcionales que pueden estar presentes. Existen unos pocos procedimientos experimentales que permiten reconocer algunos de ellos por su coloración con diferentes reactivos, su absorción de luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm y su relación de frente (Rf) en cromatografía en capa fina.

Cuando existen dudas de tal caracterización se recurre a métodos espectrales como el Infrarrojo, UV y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [Domínguez, X., 1973].

1.3.4.c. Modo de acción

Los aceites volátiles, inhalados o aplicados sobre la piel, actúan reaccionando con la parte lipídica de la membrana celular, modificando la actividad de los canales de iones calcio. En ciertas dosis, los aceites volátiles saturan las membranas y muestran efectos similares al de las anestésicas locales. Pueden interactuar con las membranas celulares pudiendo influir sobre sus enzimas, sobre sustancias transportadoras, canales de iones y receptores [Svoboda and Hampson, 1999].

Se han observado los efectos de los AE sobre el transporte intestinal [Beesley et al., 1996], sobre la penetración en la piel [Abdullah et al., 1996], sobre las fibras musculares esqueléticas [Fogaca et al., 1997] y las propiedades analgésicas [Aydin et al., 1996], entre otras.

Los componentes de las fragancias son absorbidas por inhalación y son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica e interactuar con receptores en el Sistema Nervioso Central [Svoboda and Hampson, 1999].

1.3.4.d. Propiedades antimicrobianas

Deans y Ritchie, (1987) examinaron 50 AE en su actividad antibacteriana contra 25 géneros de bacterias, usando la técnica de difusión en agar. En otras investigaciones también se ha comprobado que los AE redujeron el crecimiento de los microorganismos, dependiendo de la concentración de la muestra oleosa y de su composición química [Tassou et al., 1995; Fyfe et al., 1998].

El conocimiento de los componentes bioactivos de los AE frente a bacterias, virus y hongos parece cobrar relevancia [Mevy et al., 2002; Ricci et al., 2005].

Los grupos moleculares con alta actividad antibacteriana son también activos contra hongos. Sin embargo, los tratamientos deben realizarse por períodos más prolongados. Numerosas e importantes investigaciones reconocen la actividad antifúngica de los alcoholes y lactonas sesquiterpénicas [Pellecuer et al., 1974; Pullecuer et al., 1976; Larrondo et al., 1995; Mangena, T., 1999].

El sinergismo pudo ser demostrado entre componentes de muchos AE cuando se evaluó su actividad antimicrobiana *in vitro*. Así, los estudios de *Gill y col.*, (2002) y *Mourey y Canillac*, (2002), han demostrado incluso que dicha actividad sinérgica puede ser ejercida por componentes minoritarios del aceite.

Con relación a los virus puede decirse que son altamente sensibles a las moléculas aromáticas, y algunas patologías virales severas pueden mostrar un inmenso mejoramiento siguiendo su uso. Células normales de pacientes bajo tratamiento con sustancias aromáticas parecen haber adquirido una resistencia especial a la penetración viral [*Franchomme and Péroël*, 1990].

1.4. RIQUEZA FLORISTICA DE LA PROVINCIA DE CORDOBA: IMPORTANCIA DE SU ESTUDIO

En el sur de la provincia de Córdoba crecen alrededor de 373 plantas vasculares con actividad farmacológica potencial, las cuales tienen uso comprobado en la región. La industria alimenticia, farmacéutica y cosmética utilizan principalmente tomillo, peperina, poleo y carqueja, las cuales se recolectan directamente de las poblaciones nativas. Esta actividad se realiza sin un manejo apropiado y por lo tanto constituye una actividad depredadora más que una explotación racional. En la región mencionada, la tasa de extracción de algunas especies medicinales es muy alta y podría poner en peligro a un grupo en particular, constituido por peperina, poleo, tomillo, cola de caballo, ambay, marcela y carqueja [*Bocco y Grosso*, 1994; *Zygodlo and Juliani*, 2003].

Si bien los principios activos pueden estar presentes en todos los órganos de la planta, la base de datos refiere que los órganos de las plantas medicinales más utilizados son las hojas y los tallos, probablemente por ser los lugares donde se registra mayor actividad metabólica. Si la recolección se realizara correctamente, la cosecha de estos órganos no implicaría grandes riesgos para la sobrevivencia de las plantas, pero lamentablemente muchas veces y en especial en las hierbas, la planta se extrae completa representando un riesgo severo para la población [*Núñez y Cantero*, 2000]. El cultivo de las

plantas medicinales se presenta como una alternativa, pues provee además un recurso económico para los pobladores [Base de datos internet: www.herbotecnia.com.ar/aut-peperina.html].

1.5. *Minthostachys verticillata*

1.5.1. Descripción

La especie *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling pertenece a la familia Lamiaceae (Labiadas), vulgarmente se la conoce como peperina. El origen etiológico de su nombre proviene del latín *minthos* = menta y *stachys* = hierba semejante al puerro.

Es un arbusto muy aromático, pubescente de 0,50 a 1,50 m de altura que crece en forma de mata. Posee hojas aovadas, de base por lo general redondeada, de 2 - 3 cm de largo por 1 - 2 cm de ancho, con bordes aserrados y pecíolos de 5 - 10 mm. Las flores son de color blanco y se ubican en las axilas de las hojas en cimas de 4 inflorescencias por nudo, con pedúnculos cortos de hasta 10 mm de largo. Su crecimiento es perenne, florece en primavera y fructifica en verano. En la Figura 1 se pueden observar las características anteriormente descriptas.



Figura 1: *Minthostachys verticillata*.

En América, *M. verticillata*, se distribuye geográficamente desde Colombia y Venezuela por Brasil, Ecuador, Perú y Bolivia hasta Argentina. Se la encuentra en el centro y norte de nuestro país, más precisamente en las provincias de Córdoba, San Luis, Catamarca, Tucumán, Salta y Jujuy, generalmente bajo la sombra de los molles (*Lithraea molleoides*) [Base de datos internet: www.herbotecnia.com.ar/aut-peperina.html].

De la planta se emplean las flores, hojas y tallos. Los usos de la peperina incluyen desde infusiones hasta licores. Es utilizada para indigestiones, dolores abdominales, diarreas, vómitos, y se le atribuye a su AE propiedades estimulantes, digestivas, carminativas, vulnerarias, antiespasmódicas y antirreumáticas [Ratera y Ratera, 1980; Toursarkissian, M., 1980].

1.5.2. Antecedentes antimicrobianos

Los primeros estudios de las propiedades antimicrobianas de *M. verticillata* fueron realizados por De Feo y col., (1998). En sus ensayos mostraron que *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* resultaron ser las

más sensibles. También fue evaluado el aceite esencial de dicha especie vegetal por *Oliva y col., (2001)* demostrando que ejerce inhibición de microorganismos contaminantes de alimentos.

Zanon y col., (1999) en sus ensayos con extracto etanólico, reportaron actividad contra el virus *Herpes suis tipo 1, cepa RC/79* de 8 especies vegetales de las 13 estudiadas, entre las cuales *M. verticillata* produjo una reducción de la producción viral de 4 unidades logarítmicas, este extracto además ejerció actividad virucidal frente al mismo virus con sólo 45 min de tratamiento.

Zabala, E., (2002) probó la actividad antiviral del extracto etanólico y del AE de *M. verticillata* a su máxima concentración no citotóxica (MCNC) sobre el virus *Herpes suis tipo 1, cepa RC/79* y obtuvo valores de inhibición viral próximos al 99 y 94,40%, respectivamente. También determinó que el AE manifiesta su actividad antiviral durante todo el ciclo de replicación viral, mientras que el extracto etanólico sólo la ejerce en el interior de la célula y en estadios tempranos de la replicación viral.

Más recientemente, *Torres, C., (2004)* informó actividad antifúngica, frente a patógenos causales de micosis superficiales y oportunistas a partir de diferentes fracciones de *M. verticillata*, entre las que se encuentra su AE.

1.6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de la disponibilidad de antivirales o de análogos semisintéticos clínicamente útiles, aún continúa siendo indispensable la investigación en la búsqueda de nuevos agentes anti-infectivos. Particularmente es importante, desde un contexto viral, en función a que el armamento antiviral es pequeño y limitado al tratamiento de pocos virus, especialmente debido a la naturaleza del agente viral infeccioso que depende de la célula que parasita para su multiplicación y supervivencia.

El desarrollo de la resistencia viral, como consecuencia del uso excesivo de antivirales, intensificó la necesidad de compuestos nuevos y efectivos contra las infecciones virales. Las plantas medicinales presentan una alternativa ya que las mismas tienen una variedad de constituyentes químicos, los cuales tienen la capacidad de inhibir la replicación de varios tipos de virus a ADN o ARN.

Acyclovir y viradabina han sido utilizados con éxito en el tratamiento de infecciones herpéticas. Sin embargo, cada vez es más frecuente el aislamiento de cepas virales resistentes, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos [De Cristóforo y col., 1996]. El éxito relativo alcanzado usando extractos de plantas o hierbas medicinales de varias especies que son capaces de actuar terapéuticamente en varias infecciones virales ha aumentado el optimismo acerca del futuro de agentes fito-antivirales.

Las preparaciones herbáceas aún continúan siendo usadas extensivamente por la población mundial. De allí la necesidad, desde el punto de vista científico, de establecer una relación entre la composición química y su actividad terapéutica y biológica.

De la amplia y variada gama de plantas medicinales y aromáticas que ofrecen las serranías cordobesas, *Minthostachys verticillata* se destaca como típica de la región. Distintas fracciones derivadas de este vegetal han mostrado ejercer acción antiviral evidente *in vitro*, destacándose el AE. Sin embargo, la actividad antiviral de sus componentes mayoritarios solos y combinados no ha sido aún estudiada.

1.7. HIPOTESIS

Hipótesis 1: El AE de *Minthostachys verticillata* y sus componentes principales ejercen acción tóxica sobre células eucariotas.

Hipótesis 2: El AE de *Minthostachys verticillata* y sus componentes principales ejercen acción antiherpética *in vitro*.

Hipótesis 3: No existe relación entre las concentraciones de los derivados oleosos de *Minthostachys verticillata* que ejercen acción tóxica respecto de las concentraciones que ejercen acción antiviral.

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiherpética del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* y de sus componentes mayoritarios.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- > Obtener el aceite esencial (AE) de *M. verticillata* mediante hidrodestilación.
- > Analizar el AE por cromatografía gaseosa.
- > Estandarizar el cultivo de *Artemia salina*.
- > Propagar y mantener las líneas celulares Vero y HEp-2.
- > Producir y titular masa crítica de virus.
- > Determinar citotoxicidad del diluyente de las muestras.
- > Determinar valores de toxicidad del AE de *M. verticillata* y sus componentes mayoritarios, en formas individual y combinada, mediante Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC) y Concentración Citotóxica 50% (CC₅₀) sobre cultivos celulares y Dosis Letal 50% (DL₅₀) sobre *Artemia salina*.
- > Estudiar actividad antiviral del AE de *M. verticillata* y de sus componentes mayoritarios.
- > Evaluar sinergismo y/o antagonismo entre los componentes mayoritarios del AE sobre las acciones tóxica y antiviral.

MATERIALES

3.1. DROGAS

Las marcas comerciales de las drogas empleadas en el presente trabajo fueron Sigma, Merck, Carlo Erba o Mallinckrodt, excepto especificación.

Acido etilén diamino tetracético (EDTA)

α - pineno

Azul tripán

β - pineno

Bicarbonato de sodio (CO_3HNa_2)

Caldo tioglicolato, Difco

Caldo Saboureaud Glucosado

Cineol

Cloruro de potasio (ClK)

Cloruro de sodio (ClNa)

Cristal violeta

Dextrosa

Diclorometano (CH_2Cl_2)

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Etanol

Fenol

Formol

Fosfato biácido de potasio ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$)

Fosfato monoácido de sodio ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$)

Hidróxido de sodio

L - Glutamina

Limoneno

Medio Esencial Mínimo de Eagle - Earle (MEM)

Mentona

Metil celulosa

Penicilina G sódica

Pulegona

Rojo fenol
Sal marina; Grandiet
Suero fetal bovino (SFB); Natacor
Sulfato de estreptomicina
Tripsina 1:250; Difco

3.2. SOLUCIONES

3.2.1. Solución de azul tripán al 0,5%

Azul tripán 0,5 g
Agua bidestilada 100 ml

Se disolvió por agitación y se conservó en frascos color caramelo a 4°C.

3.2.2. Solución balanceada de fosfatos (PBS)

ClNa 8 g
ClK 0,2 g
 $\text{PO}_4\text{HNa}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,44 g
 $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 g
Agua bidestilada 1.000 ml

Se disolvieron las drogas con agitador magnético. La solución obtenida se fraccionó en volúmenes de 100 ml y esterilizó a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 30 min. Se conservó a 4°C.

3.2.3. Solución de bicarbonato de sodio al 5%

CO_3HNa 5 g
Agua bidestilada c.s.p. 100 ml

Se disolvió por agitación y se fraccionó en tubos de ensayo. Se esterilizó en autoclave a $\frac{3}{4}$ atmósfera, durante 20 min. Se conservó a 4°C.

3.2.4. Solución de cristal violeta

Cristal violeta	10 g
Fenol	20 g
Etanol	100 ml
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

Se maceró el colorante con fenol, se agregó de a poco el etanol y se llevó a volumen final con agua destilada. Se dejó madurar a 37°C durante 48 h en oscuridad. Se filtró con papel Whattman N° 2 y se conservó en frascos color caramelo, a temperatura ambiente hasta su uso.

3.2.5. Solución de formol al 10%

Formol	10 ml
Agua corriente	90 ml

Esta solución se preparó en el momento de su uso.

3.2.6. Solución de glutamina

L - Glutamina	3 g
CINa	0,85 g
Agua bidestilada c.s.p.	100 ml

Se disolvió en baño termostatzado a 37°C. Se esterilizó por filtración con membrana de 0,22 μ m de diámetro de poro. Se fraccionó en volúmenes de 20 ml y se realizaron controles de esterilidad. Se conservó a -20°C.

3.2.7. Solución de metil celulosa al 1,5%

Metil celulosa	1,5 g
Agua bidestilada c.s.p.	100 ml

Se preparó la solución e inmediatamente se esterilizó en autoclave a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 25 min. Se conservó a 4°C hasta su uso.

3.2.8. Solución de penicilina - estreptomicina

Penicilina G sódica	2.000.000 U.I.
Sulfato de estreptomicina	1 g
Agua bidestilada estéril c.s.p. ..	100 ml

La solución se esterilizó por filtración usando membrana de 0,22 μm de diámetro de poro. Se fraccionó en volúmenes de 5 - 10 ml y se controló su esterilidad. Se conservó a -20°C .

3.2.9. Solución de rojo fenol al 0,5%

Rojo fenol	1 g
Solución de OHNa N/20	50 ml
Agua bidestilada c.s.p.	200 ml

Se maceró el rojo fenol en mortero con un volumen pequeño de solución de OHNa N/20 hasta formar una pasta, se continuó agregando OHNa N/20 por gota hasta obtener una solución completa que mantuvo su color rojo intenso. Una vez disuelto, se completó el volumen final con agua bidestilada. Se fraccionó en frascos color caramelo y esterilizó a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 25 min. Se conservó a 4°C .

3.2.10. Solución de tripsina - EDTA 2X (solución stock)

CINa	16 g
CIK	0,8 g
Dextrosa	2 g
CO_3HNa	1,16 g
Tripsina	1,5 g
EDTA	0,4 g
Agua bidestilada c.s.p.	1.000 ml

Cada una de las drogas se disolvieron por agitación magnética, luego se adicionó 4 ml de solución de rojo fenol al 0,5%. Se ajustó el valor de pH a 7,4 con solución de bicarbonato de sodio al 5%. Se esterilizó por filtración utilizando membrana de 0,22 μm de diámetro de poro. La solución se fraccionó en volúmenes de 50 - 100 ml y se controló su esterilidad. Se conservó a -20°C .

3.2.11. Solución de tripsina - EDTA 1X (solución de trabajo)

Se mezcló igual volumen de solución tripsina - EDTA 2X, con agua bidestilada estéril. Se fraccionó y controló su esterilidad. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.3. MEDIOS

3.3.1. Medio de Crecimiento (MC)

Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) en solución salina balanceada de Earle, suplementado con 8% de suero fetal bovino (SFB) inactivado, 30 µg/ml de glutamina, 100 U.I. de penicilina, 0,5 g de sulfato de estreptomycin y solución de bicarbonato de sodio al 5% hasta pH 7,2 - 7,4. Se realizaron controles de esterilidad y se conservó a 4°C hasta su uso.

3.3.2. Medio de congelamiento celular

MEM 1X, suplementado con 20% de SFB inactivado, 30 µg/ml de glutamina, 100 U.I. de penicilina, 0,5 g de sulfato de estreptomycin, bicarbonato de sodio al 5% y 7% de dimetilsulfóxido (DMSO). Se realizaron controles de esterilidad y se conservó a 4°C hasta su uso.

3.3.3. Medio de Mantenimiento (MM)

Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) en solución salina balanceada de Earle, suplementado con 2% de SFB inactivado, 30 µg/ml de glutamina, 100 U.I. de penicilina, 0,5 g de sulfato de estreptomycin y solución de bicarbonato de sodio al 5% hasta pH 7,2 - 7,4. Se realizaron controles de esterilidad y se conservó a 4°C hasta su uso.

3.3.4. Medio para Placa (MP)

Solución a: MEM 2X, suplementado con 4% de SFB, 60 µg/ml de glutamina, 200 U.I. de penicilina, 1 g de sulfato de estreptomycin y bicarbonato de sodio al 5% hasta pH 7,4 - 7,8.

Solución b: metil celulosa al 1,5%.

Ambas soluciones se conservaron a 4°C. En el momento de su uso, se mezclaron volúmenes iguales, y se ajustó el pH a 7,2 - 7,4.

3.3.5. Medio tioglicolato

Caldo tioglicolato 29 g
 Agua bidestilada c.s.p. 1.000 ml

Este medio se fraccionó en tubos de ensayo, a razón de 2,5 ml por tubo. Se esterilizó a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 20 min. Se conservó a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su uso.

Este medio fue empleado para confirmar ausencia de bacterias en las soluciones y medios previamente esterilizados.

3.3.6. Caldo Saboureaud Glucosado

Peptona 10 g
 Glucosa 20 g
 Agua destilada c.s.p. 1.000 ml

Una vez disueltas las drogas, se ajustó el pH a 5,6. El medio se esterilizó a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 20 min y se conservó a 4°C hasta su uso.

Este medio fue empleado para confirmar ausencia de hongos en las soluciones y medios previamente esterilizados.

3.3.7. Medio de crecimiento para larvas de *Artemia salina* (solución de sal marina al 3,3%)

Sal marina 3,3 g
 Agua corriente 100 ml

Se agitó hasta disolución total y se conservó a 4°C hasta su uso.

3.4. MATERIAL VEGETAL

Minthostachys verticillata fue recolectada en las serranías de Santa Rosa de Calamuchita, provincia de Córdoba, en el mes de abril. El vegetal fue clasificado taxonómicamente por docentes del área Botánica Sistemática, Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). Un ejemplar se conservó en el Herbario de dicha Universidad y se registró bajo el número de exsicata RCV-1955 (RCV: Río Cuarto Vasculares). Como material vegetal se utilizaron hojas verdes y talluelos.

3.5. CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron las líneas celulares Vero (riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) y HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana) desarrolladas en monocapa sobre superficie de vidrio o plástico. La línea celular Vero se adquirió en la Asociación Banco Argentino de Células de la ciudad de Pergamino, provincia de Buenos Aires, y la línea HEp-2 fue cedida por docentes del Departamento de Biología Molecular, UNRC.

3.6. LARVAS DE *Artemia salina*

Huevos de este crustáceo fueron adquiridos comercialmente en un acuario de la ciudad de Río Cuarto.

3.7. VIRUS

Se empleó el virus *Herpes suis tipo 1*, cepa RC/79, aislado en Río Cuarto en el año 1979 en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo, a partir de un macerado de sistema nervioso central de cerdos afectados durante un brote epidémico [Ambrogi y col., 1981]. Este virus fue sometido a 10 pasajes sucesivos en cultivo de células Vero hasta obtener un título de 10^8 Dosis Infecciosa Cultivo Celular cincuenta por mililitro (DICC₅₀/ml). Una alícuota de esta suspensión viral se conservó por períodos prolongados a -45°C , mientras que otra fue conservada a 4°C y mantenida por pasajes sucesivos en monocapa de células Vero.

METODOS

4.1. LINEAS CELULARES

4.1.1. Propagación y mantenimiento

Monocapas de células Vero o HEp-2, desarrolladas en frascos de cultivo, se lavaron con PBS (ver apartado 3.2.2) libre de iones calcio y magnesio. Las células se dispersaron con solución de tripsina - EDTA 1X (ver apartado 3.2.11) y el número de células viables se determinó por el método de exclusión al azul tripán (ver apartado 3.2.1) en cámara de Neubauer [Mongini y Waldner, 1996]. Posteriormente, se agregó MC (ver apartado 3.3.1) hasta obtener una concentración celular aproximada de 3×10^5 células viables/ml. La suspensión celular se homogeneizó y distribuyó en frascos de cultivo estériles. Las células fueron incubadas a 37°C durante 48 - 72 h, para permitir la formación de una monocapa confluyente [Vanella, J., 1964].

Para el mantenimiento de las líneas celulares, las monocapas fueron incubadas a 28°C luego de reemplazar el MC por MM (ver apartado 3.3.3).

Todas las soluciones y medios empleados fueron precalentados a 37°C.

4.1.2. Recuento celular

El recuento de células viables presentes en una monocapa fue determinado en cámara de Neubauer por exclusión al azul tripán [Mongini y Waldner, 1996]. El procedimiento de rutina exigió despegar las células con solución de tripsina - EDTA 1X, resuspenderlas en un pequeño volumen de MC y mezclar una parte de esta suspensión con una parte de solución de azul tripán al 0,5%, para luego contarlas en la cámara cuenta glóbulos.

4.1.3. Conservación

Para conservar las células por períodos prolongados de tiempo, el cultivo se lavó con PBS y dispersó con solución de tripsina - EDTA 1X. La suspensión celular fue diluida en medio de congelamiento (ver apartado 3.3.2) a una concentración de 5×10^6 células viables/ml. Posteriormente se distribuyó en

criotubos a razón de 1 ml y se llevó a un congelador de tasa controlada de frío para especímenes biológicos, a base de metanol, cuyo programa de enfriado es de 0,3°C/min con punto de partida de 5°C hasta -80°C (Biocool 3-380). Posteriormente se transfirieron para su conservación a termo de nitrógeno líquido (-196°C).

Cuando se requirió el uso de estas células, las mismas se descongelaron, colocando los criotubos en baño termostatzado a 37°C. Su contenido se diluyó en MC y se sembró en forma habitual. A las 24 h se hizo recambio del medio por MC nuevo, con el propósito de eliminar el dimetilsulfóxido (DMSO) contenido en el medio de congelamiento.

4.2. VIRUS

4.2.1. Amplificación viral

Para obtener una suspensión adecuada de virus *Herpes suis tipo 1*, cepa RC/79 se infectaron células Vero a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,5. Luego, los cultivos infectados se incubaron durante 90 min a 37°C, con rotación suave cada 15 - 20 min para permitir una distribución homogénea del inóculo sobre la monocapa. Transcurrido ese período, se descartó el virus remanente no adsorbido y el cultivo se cubrió con MM precalentado a 37°C. Paralelamente se dejaron como controles celulares monocapas no infectadas y bañadas con MM.

Cuando alrededor del 90% de la monocapa presentó efecto citopático (ECP) se procedió a realizar dos ciclos de congelado y descongelado para facilitar la liberación de las partículas virales retenidas intracelularmente. Luego, la suspensión se centrifugó a 3.000 r.p.m. por 15 min. El sobrenadante se fraccionó y conservó a -80°C por tiempos prolongados, mientras que una alícuota se mantuvo a 4°C para su titulación y posterior empleo en los ensayos de actividad antiviral.

4.2.2 Titulación viral

La suspensión viral se cuantificó por el método de formación de placas de lisis [Dulbecco, R., 1962]. Para ello, células Vero desarrolladas en policubetas de 24 pocillos, fueron infectadas por duplicado con 0,2 ml de diluciones virales seriadas factor 10 en MM. Transcurrido el período de adsorción viral (90 min a 37°C) se descartó el inóculo remanente y los cultivos se cubrieron con 1 ml de medio para placas (MP) (ver apartado 3.3.4). Se incluyeron controles celulares que consistieron en monocapas no infectadas y bañadas con MP. Luego de incubar a 37°C durante 48 - 72 h, los cultivos infectados y los controles se fijaron con solución de formol al 10% (ver apartado 3.2.5) y las placas de lisis se revelaron con solución de cristal violeta al 1% (ver apartado 3.2.4).

El título viral, expresado en UFP/ml, se calculó según la fórmula siguiente:

$$\text{Título (UFP/ml)} = \frac{n}{v \times d}$$

siendo: n = número promedio de placas de lisis
 v = volumen del inóculo viral
 d = dilución viral

4.3. MATERIAL VEGETAL Y ACEITE ESENCIAL

4.3.1. Recolección

La colecta se realizó en el faldeo de las sierras y preferentemente en los lugares donde se presentaba en forma más abundante. Se dejaron ejemplares que garantizaran su preservación ecológica. La recolección se efectuó realizando siempre un corte en el tallo para permitir la regeneración y perpetuación de la especie, de acuerdo a las pautas sugeridas por la OMS [UICN, OMS and WWF, 1993].

El traslado de los vegetales al laboratorio fue realizado en bolsas de plástico negras y sometidas inmediatamente a su preparación.

4.3.2. Preparación del material vegetal

A partir del material vegetal cosechado en Santa Rosa de Calamuchita se seleccionaron aquellas partes de la planta que no mostraron ninguna alteración morfológica visible ni indicios de enfermedades por patógenos. Se lavaron con abundante agua corriente, luego con agua destilada y se secaron al aire en un ambiente cerrado, para evitar la putrefacción y el polvo ambiental. El producto obtenido fue conservado en frascos de vidrio estériles a -35°C hasta su utilización.

4.3.3. Obtención del Aceite Esencial

Se colocaron 60 g del material vegetal molido en el interior de una columna extractora, la que contenía una rejilla en su parte inferior. Este sistema se ubicó sobre un balón de 1 litro de capacidad, conteniendo agua destilada hasta la mitad. Un calentador eléctrico generó calor hasta la ebullición del agua. Los vapores de agua arrastraron los componentes volátiles de la muestra vegetal, al atravesar el interior de la columna. El AE fue condensado, y luego separado de la fase acuosa por decantación. Posteriormente, fue centrifugado durante 15 min a 3.000 r.p.m. para separarlo totalmente de la fase acuosa. La metodología descrita responde a las especificaciones dadas por *Miti y Sinisa, (2000)* y *Moraes y col., (2002)*.

El AE se fraccionó en tubos Eppendorf, a razón de 500 μl por tubo, y conservó a -35°C hasta el momento de su uso.

4.3.4. Cromatografía Gaseosa

Los componentes mayoritarios del AE de *Minthostachys verticillata* se identificaron por cromatografía gaseosa (CG). Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 serie 2, equipado con detector de

ionización de llama (FID, T_{detec} 350°C), integrador HP-3396 y una columna HP-INNOWAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Como gas transportador se empleó N_2 , con una velocidad de flujo de 1 ml/min. El inyector fue Split: a un volumen de inyección de 1 μl puro, en el caso del AE, y 1 μl de la dilución al 1% en diclorometano, en el caso de los compuestos patrones. La temperatura de inyección fue de 250°C. La temperatura del horno fue determinada mediante dos rampas de temperatura: a) 60°C (tiempo = cero), con un incremento de 2°C/min hasta llegar a 140°C; b) 140°C (tiempo = cero), con un incremento de 6°C/min hasta los 250°C, manteniéndolo a esa temperatura durante 20 min.

Los componentes principales del AE fueron identificados mediante comparación de los tiempos de retención con los correspondientes a los componentes puros: α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, limoneno, mentona y pulegona, inyectados en idénticas condiciones.

La cuantificación se realizó midiendo el área correspondiente a cada uno de los picos detectados en el cromatograma de la muestra [Mimica - Dukié et al., 1991; Hayashi et al., 1995; Miti and Sinisa, 2000].

4.3.5. Determinación de la densidad del AE

La densidad del AE de *M. verticillata* fue determinada por repetidas mediciones del peso de 1 ml de la muestra oleosa, en balanza analítica de alta precisión con 4 dígitos decimales menores que el gramo.

4.4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Se determinó la toxicidad de las siguientes muestras:

AE de *M. verticillata*.

- > Los componentes mayoritarios del AE: pulegona, mentona y limoneno, en forma individual, identificados por CG.

- > Pulegona, mentona y limoneno, mezclados en todas las combinaciones posibles, según las proporciones registradas en el cromatograma.

Debido a la inmiscibilidad del AE en MM, se requirió utilizar como agente solubilizante dimetil sulfóxido (DMSO) (CH_3SOCH_3). La literatura indica que la concentración de DMSO no debe superar el 1% v/v cuando es aplicado sobre monocapas celulares [Vanden Berghe and Vlietinck, 1991]. Por lo tanto, el DMSO necesariamente debió ser incluido dentro de los ensayos y se constituyó en un componente químico más a analizar, así fue indispensable determinar en primer lugar su grado de toxicidad, para excluir su responsabilidad en el daño celular que pudiera registrarse.

4.4.1. Toxicidad sobre *Artemia salina*

4.4.1.a. Obtención de larvas de *Artemia salina*

Para inducir el estado larvario, 0,28 g de huevos de *Artemia salina* Leach fueron incubados en 100 ml de una solución de sal marina al 3,3% durante 36 h a 25 - 28°C, en ambiente oxigenado y con luz. Transcurrido ese tiempo, los nauplios obtenidos fueron observados al microscopio óptico y lupa, para corroborar si la eclosión de los huevos aconteció en forma normal, deducido de la morfología típica de la larva y buena movilidad, indicando un estado compatible con una fisiología óptima de este crustáceo. Luego, se trasvasaron a una placa de Petri dividida en dos sectores pero comunicados entre sí por un separador con una ranura horizontal de 1 mm x 3 cm. Uno de esos sectores fue protegido de la luz para inducir a las larvas vivas, por su fototropismo, su migración al sector iluminado, desde donde se las colectó para realizar el bioensayo [Torres, A., 1996; Franssen et al., 1997].

4.4.1.b. Determinación de Dosis Letal 50% (DL_{50})

El bioensayo de citotoxicidad sobre larvas de *A. salina* se realizó siguiendo la metodología descrita por Solís y col., (1993); y Franssen y col., (1997).

Las muestras oleosas se diluyeron en agua marina, previa disolución en DMSO (concentración final de 0,5% v/v).

En una policubeta de 24 orificios se colocaron 35 ± 5 nauplios vivos por pocillo y 1 ml de la muestra en estudio a las concentraciones que se presentan en la Tabla 1. Cada una de las concentraciones fue ensayada por cuadruplicado. Este sistema se incubó en óptimas condiciones de temperatura, luz y oxigenación, durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se contaron las larvas muertas por el tratamiento, en cada pocillo, al microscopio óptico invertido o bajo lupa. Posteriormente, las policubetas se llevaron a -20°C durante 24 h ó se trataron con hipoclorito de sodio puro para producir la muerte de las larvas y contar el número total de nauplios [Visconti et al., 1992]. Paralelamente se efectuaron:

- > Control de viabilidad: larvas en agua marina.
- > Control de inocuidad de DMSO: larvas en agua marina conteniendo DMSO a una concentración final de 0,5%.

La DL_{50} de cada una de las muestras fue obtenida analizando los resultados por el método de *Reed-Muench* (1932).



Tabla 1: Concentraciones en mg/ml, del aceite esencial de *M. verticillata* y sus componentes puros, ensayados en su potencial tóxico sobre *Artemia salina*.

AE	Tipo de muestra					
	Pulegona (P)	Mentona (M)	Limoneno (L)	P - M	P - L	M - L
4,21	1,19	4,46	21	3,77-0,92	23,05-0,61	20,04-2,15
2,10	0,59	2,23	10,5	1,88-0,46	11,52-0,30	10,02-1,07
1,05	0,3	1,12	5,25	0,94-0,23	5,76-0,15	5,01-0,54
0,53	0,15	0,56	2,63	0,47-0,12	2,88-0,076	2,51-0,27
0,26	0,07	0,28	1,31	0,23-0,058	1,44-0,038	1,25-0,13
0,13	0,04	0,14		0,12-0,029	0,72-0,019	0,63-0,067
0,07	0,018			0,059-0,014	0,36-0,009	0,313-0,034
				0,029-0,007	0,173-0,004	0,151-0,016
				0,014-0,003		

4.4.2. Determinación de Máxima Concentración No Citotóxica

Estos ensayos fueron realizados en las líneas celulares Vero y HEp-2.

La Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC) es definida como la concentración máxima de un compuesto vegetal que no produce alteración visible al microscopio óptico en la monocapa celular incubada a 37°C, durante 72 h como tiempo límite [Andrei y col., 1985; García et al., 1990; Kott et al., 1999; Ooi et al., 2004].

4.4.2.a. DMSO

Monocapas celulares desarrolladas en policubetas de 24 pocillos, fueron incubadas durante 72 h a 37°C con MM conteniendo diferentes concentraciones de DMSO (Tabla 2). Paralelamente, se incluyeron controles celulares, que consistieron en monocapas bañadas sólo con MM, sin el agente solubilizante.

4.4.2.b. Aceite esencial de *Minthostachys verticillata*

Cultivos celulares confluentes desarrollados en policubetas de 24 pocillos, fueron tratados con MM conteniendo diferentes concentraciones de cada muestra oleosa y su diluyente (Tabla 2), solubilizada en DMSO (a concentración no citotóxica), e incubados a 37°C por 72 h. Paralelamente se incluyeron:

- Controles celulares: monocapas bañadas con MM, sin la muestra en estudio.
- Controles de inocuidad de DMSO: monocapas celulares incubadas con MM conteniendo DMSO, a la concentración no citotóxica empleada en este ensayo.

Todos los controles se incubaron en idénticas condiciones de tiempo y temperatura que los cultivos tratados.



Los sustratos celulares fueron observados diariamente al microscopio óptico invertido, a fin de registrar posibles alteraciones celulares que permitieran inferir la toxicidad de las muestras.

Tabla 2: Concentraciones de DMSO, AE y los componentes mayoritarios de *M. verticillata*, ensayadas en células Vero y HEp-2, para la determinación de las MCNC de cada muestra.

Tipo de muestra									
DMSO (mg/ml)		AE ($\mu\text{g/ml}$)		Pulegona ($\mu\text{g/ml}$)		Mentona ($\mu\text{g/ml}$)		Limoneno ($\mu\text{g/ml}$)	
Vero	HEp-2	Vero	HEp-2	Vero	HEp-2	Vero	HEp-2	Vero	HEp-2
18,20	18,20	3.243	4.054	600	600	930	1.480	700	1.000
15,60	15,60	2.702	2.702	550	550	600	1.240	650	780
13,65	13,65	1.946	2.027	500	500	550	930	600	700
12,13	12,13	1.351	1.351	450	450	500	740	550	650
10,92	10,92	1.158	1.158	400	370	450	620	500	600
9,93	9,93	1.013	1.013	370	300	400	530	450	550
9,10	9,10	811	811	340	226	350	460	400	500
8,40	8,40	675	675	300	198	300	410	350	450
7,80	7,80	541		250	158	250	370	300	400
7,28	7,28			200	132	200	310	250	300
				160	99	150	250	200	230
				117	57	100		150	180
				60	26	50			140
				40					



4.4.2.c. Componentes mayoritarios del AE utilizados en formas individual y combinada

La determinación de citotoxicidad para estas muestras siguió la misma metodología descrita en el punto anterior y las concentraciones empleadas de los componentes individuales se presentan en la Tabla 2.

Por otra parte, la Tabla 3 muestra las concentraciones de las diferentes mezclas entre pulegona, mentona y limoneno, analizadas en los mismos sustratos biológicos, respetando las proporciones de los mismos presentes en el AE, registradas por CG.

Tabla 3: Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de las diferentes mezclas entre pulegona - mentona - limoneno a la proporción encontrada en la planta, ensayadas en células Vero y HEp-2, para la determinación de sus MCNC.

Tipo de muestra							
P ^(a) - M ^(b)		P - L ^(c)		M - L		P - M - L	
Vero	HEp-2	Vero	HEp-2	Vero	HEp-2	Vero	HEp-2
500-122,2	2090-510	500-13,2	1280-33,8	500-53,4	6680-720	500-122,2-13,2	500-122,2-13,2
450-109,9	1570-380	450-11,9	960-25,4	450-48,1	3340-360	450-109,9-11,9	450-109,9-11,9
400-97,7	1040-260	400-10,5	768-20,2	400-42,8	2230-240	400-97,7-10,5	400-97,7-10,5
350-85,5	520-130	350-9,2	500-13,2	350-37,4	1670-180	350-85,5-9,2	350-85,5-9,2
300-73,3	420-100	300-7,9	450-11,9	300-32,1	1340-140	300-73,3-7,9	300-73,3-7,9
250-61,1	350-85,5	250-6,6	400-10,5	250-26,7	1110-120	250-61,1-6,6	250-61,1-6,6
200-48,9	300-73,3	200-5,3	350-9,2	200-21,4	830-90	200-48,9-5,3	200-48,9-5,3
150-36,6	250-61,1	150-4,0	300-7,9	150-16,0	670-72	150-36,6-4,0	150-36,6-4,0
100-24,4	230-57	96-2,68	250-6,6	100-10,7	560-60	100-24,4-2,6	100-24,4-2,6
50-12,2	210-50	50-1,3	200-5,3	50-5,3	480-50	50-12,2-1,3	50-12,2-1,3
25-6,1	170-40	25-0,7	150-4,0	25-2,7	420-45	25-6,1-0,7	25-6,1-0,7
10-2,4	150-36,6	15-0,4	96-2,68	15-1,6	370-40	15-3,7-0,4	15-3,7-0,4
	130-32		50-1,3		330-36		
	120-30				220-24		
	100-24,4						
	80-20						

a: Pulegona; b: Mentona; c: Limoneno

4.4.3. Concentración Citotóxica 50%

La determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC₅₀) se desarrolló en células HEp-2 y el diseño experimental fue el mismo que el descrito en el apartado anterior. La única variante consistió en que, transcurrido el tiempo de incubación con la muestra en estudio, el análisis de citotoxicidad se realizó a través del recuento de células viables por el método de exclusión al azul tripán en una cámara de Neubauer [Mongini y Waldner, 1996].

Se definió el Índice de Viabilidad Celular como el cociente entre el número de células viables en los cultivos tratados a las concentraciones ensayadas y el número de células viables en los cultivos controles [Andrei y col., 1985].

Estos índices obtenidos para cada muestra se graficaron en función de sus concentraciones y por análisis de regresión lineal se determinó la CC₅₀ de cada una de las mismas, en el sistema celular HEp-2.

La CC₅₀ se define como la concentración de compuesto requerida para reducir la viabilidad celular al 50% con respecto al control celular [Eo et al., 2000; Kim et al., 2000; Li et al., 2002; Zhang et al., 2004], y fue calculada por análisis de regresión lineal simple.

4.5. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE COMPONENTES MAYORITARIOS DEL AE DE *Minthostachys verticillata*

Para analizar el grado de inhibición de la replicación viral ejercida por los componentes mayoritarios del AE utilizados en forma individual y combinados, se empleó el método de reducción del número de placas de lisis.

Los estudios de actividad antiviral se realizaron sobre monocapas confluentes de células Vero crecidas en policubetas de 24 pocillos, las cuales fueron infectadas con 0,2 ml de diluciones seriadas factor diez del virus *Herpes suis tipo 1, cepa RC/79* en MM. Luego de 90 min de adsorción a 37°C con rotación cada 15 min, se eliminó el inóculo remanente y las monocapas fueron cubiertas con MP conteniendo la muestra vegetal en estudio a su MCNC.



La actividad antiviral fue determinada para las siguientes muestras:

- AE de *Minthostachys verticillata*.
- Los tres componentes mayoritarios del AE en forma individual: pulegona, mentona y limoneno.
- Los tres componentes mayoritarios del AE en mezclas de a dos y tres, de acuerdo a las proporciones encontradas en la planta.

Cada ensayo incluyó los siguientes controles:

- Control celular: cultivos celulares no infectados ni tratados con la muestra en estudio.
- Control de infectividad viral: cultivos celulares infectados con las mismas diluciones virales y no tratados con la muestra en estudio.
- Control de citotoxicidad: cultivos celulares no infectados, y tratados con la muestra a su MCNC.

Todos los cultivos celulares, incluido los controles, fueron incubados a 37°C por 72 h, considerado este tiempo como límite para las experiencias.

La infectividad viral en los sustratos celulares tratados y no tratados fue determinada por el método de Dulbecco [Dulbecco, R. 1962] descrito en el apartado 4.2.2.

La actividad antiviral de cada muestra fue determinada a través de la reducción del número de placas de lisis en los cultivos tratados con respecto al número de placas en los cultivos controles. El porcentaje de inhibición ejercido por cada una de las mismas fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula [García et al., 1990]:

$$\% \text{ de inhibición viral} = 100 - \frac{A}{B} \times 100$$

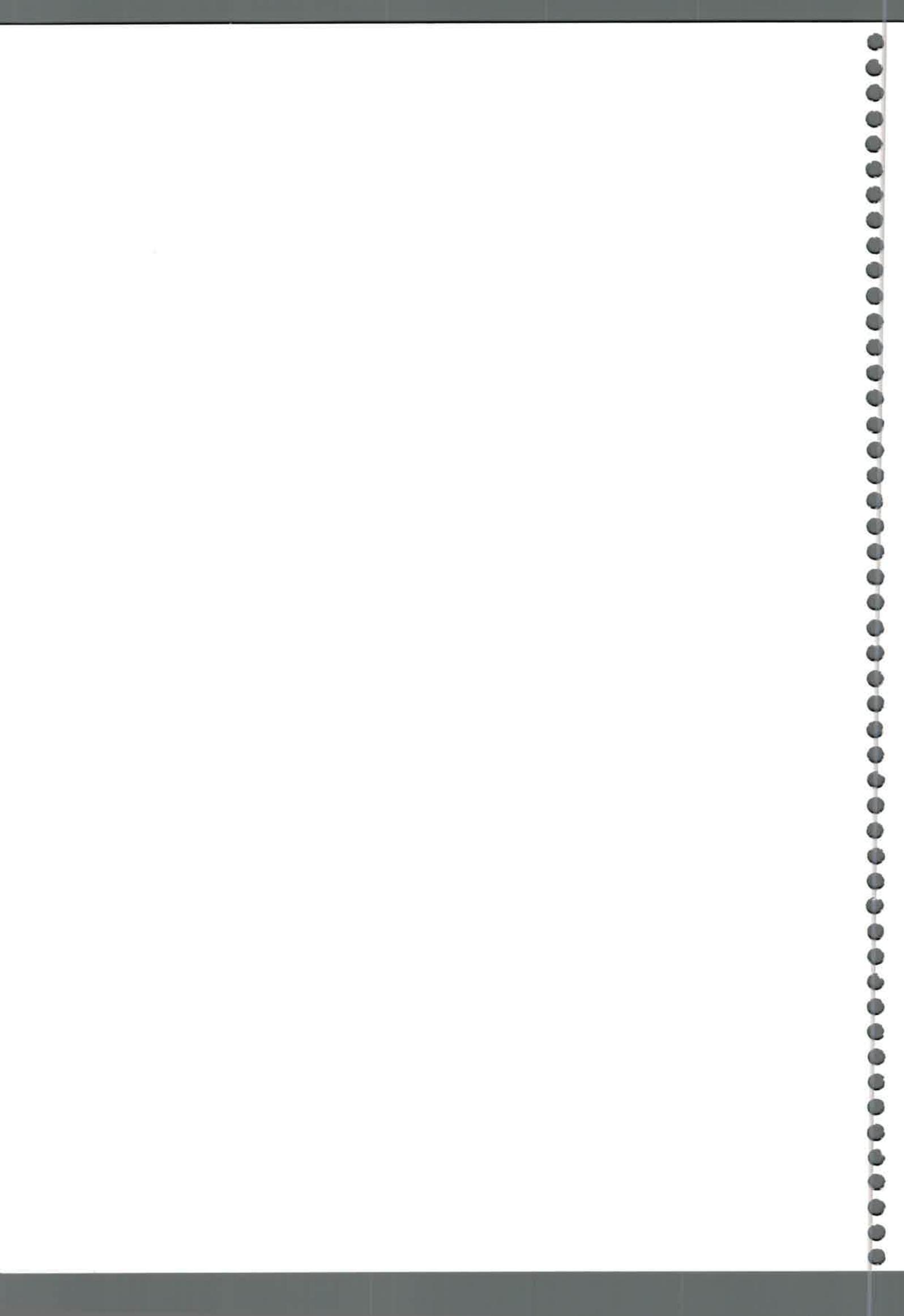
siendo: A = Título viral (expresado en UFP/ml) en los cultivos tratados.

B = Título viral (expresado en UFP/ml) en los cultivos no tratados.

Todas las experiencias fueron realizadas por duplicado.



RESULTADOS Y DISCUSION



5. 1. LINEAS CELULARES

5. 1. 1. Propagación y mantenimiento

Es conocido, según la literatura, que las líneas celulares Vero y HEp-2 son susceptibles a la infección por los virus herpes [Andrei y col., 1985; Descalzo y Coto, 1989; Pujol y col., 1995; De Logu et al., 2000] por lo que la propagación y el mantenimiento de estos sustratos biológicos se constituyeron en el primer objetivo de estas experiencias.

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.1.1 fue posible obtener monocapas confluentes de ambas líneas luego de un tiempo de incubación de 72 h a 37°C y con una suspensión celular inicial de 3×10^5 células/ml.

La observación al microscopio óptico invertido permitió determinar la morfología normal de estos cultivos celulares, caracterizada previamente por otros investigadores [Hsiung and Fong, 1982; Sabini, L., 1996].

En la Figura 2 se puede observar una monocapa confluyente de células Vero, con aspecto poliédrico y uniforme en todo el tapiz celular. Esta apariencia se conservó durante 20 - 25 días, cuando el cultivo permaneció con MM y a 28°C.

La Figura 3 muestra un cultivo confluyente de células HEp-2. Si bien el mismo presenta una apariencia morfológica similar a las células Vero, puede notarse áreas de células más redondeadas y otras zonas de células fibroblásticas. Estas características se mantuvieron durante un tiempo máximo de 15 días cuando los sustratos biológicos se incubaron en las mismas condiciones que la línea anterior.

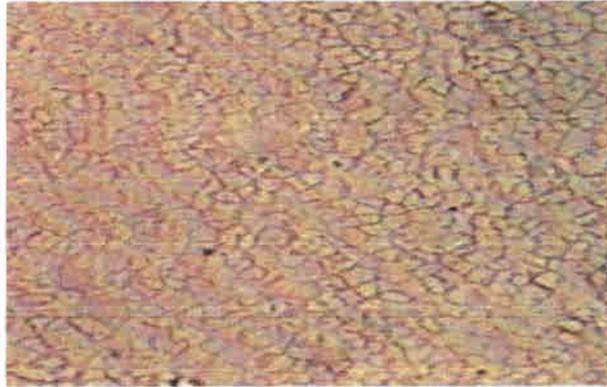


Figura 2: Morfología normal de una monocapa de células Vero (20X).

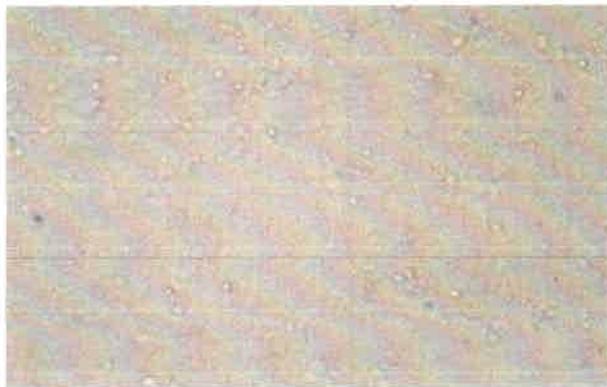


Figura 3: Morfología normal de una monocapa de células HEp-2 (20X)

5. 1. 2. Conservación

El proceso de crioconservación permitió preservar un lote para cada línea celular en buenas condiciones fisiológicas durante tiempos prolongados.

Además, el descongelamiento celular detallado en el apartado 4.1.3, produjo un alto porcentaje de células con capacidad proliferativa, formando una monocapa confluyente al cabo de una semana.

5. 2. VIRUS

5.2.1. Amplificación y titulación viral

La observación diaria al microscopio óptico de los cultivos infectados con virus *Herpes suis tipo 1* durante un tiempo máximo de 72 h permitió determinar el ECP. A las 24 h post infección (p.i.) se visualizaron grupos celulares con redondeamiento, aumento de tamaño y refringencia, los que generaron posteriormente (48 h p.i.) los típicos sincitios, como consecuencia de la fusión de membranas citoplasmáticas. Transcurridas 72 h de infección, los mismos se constituyeron en focos de lisis, que generaron desprendimiento de las células del recipiente (Figura 4). Por otra parte, los controles celulares conservaron su morfología normal durante el tiempo que duró la experiencia, tal como se observa en la Figura 2.

El ECP registrado para esta cepa viral fue coincidente con el informado por Sabini et al., (2000).

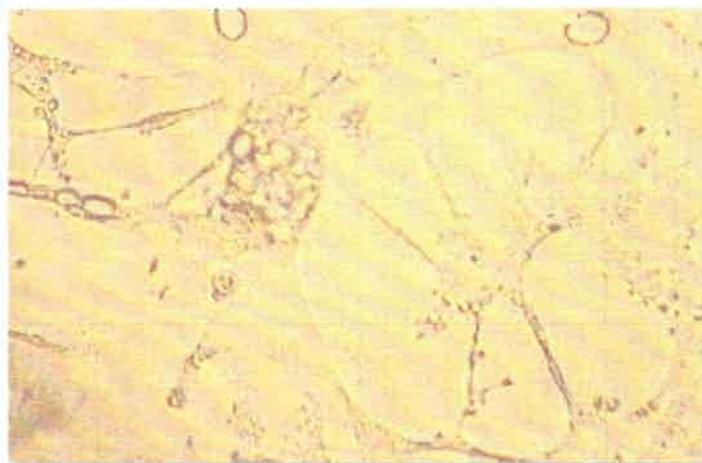


Figura 4: ECP producido por el virus *Herpes suis tipo 1*, cepa RC/79, en células Vero (20X).

Tal como indican Farnham y Newton, (1959) y Sabini, L., (1996), el virus *Herpes suis* disminuye su infectividad aún conservado a 4°C, motivo por el cual la cepa viral debió ser amplificada y titulada periódicamente durante el desarrollo del presente trabajo.

Cuando la suspensión viral fue titulada por el método de Dulbecco, el virus produjo placas de lisis nítidas y con bordes regulares, a las 72 h p.i.(Figura 5).



Figura 5: Placas de lisis producidas por el virus *Herpes suis* tipo 1, cepa RC/79, en células Vero.

Los valores de títulos virales fluctuaron entre 10^6 y 10^8 UFP/ml y fueron similares a los obtenidos por *Descalzo y Coto, (1989); García y col., (1995)*, en sus estudios de actividad antiviral con productos vegetales.

5.3. ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys verticillata*

5.3.1. Obtención del aceite esencial

Si bien existen variadas metodologías para la extracción de AE a partir de plantas aromáticas y/o medicinales, el criterio de selección de la técnica de destilación con vapor de agua se basó en que numerosas citas bibliográficas referidas a distintos géneros de la familia Lamiaceae la citan como la técnica de referencia [*Mimica-Dukié et al., 1991; Baser et al., 1997; Harmandar et al., 1997; Pino et al., 1997; Ciccio et al., 1999; Demirci et al., 2003*]. Esta metodología permitió obtener el aceite esencial con valores de rendimiento similares.

El AE presentó un color amarillo pálido; descripción similar fue aportada por *De Feo y col.*, (1998) quienes trabajaron con especies de *Minthostachys verticillata*. Características similares fueron también descriptas para el AE de la especie *Ocimum selloi*, también perteneciente a la familia Lamiaceae [*Moraes et al.*, 2002].

La densidad del AE fue de 0,973 g/ml, resultando superior al informado por otros autores para la misma especie vegetal. Así, *Zabala, E.*, (2002), informó una densidad de 0,902 g/ml, cuando trabajó con material de igual procedencia pero de diferente mes de recolección (abril vs. diciembre). Por otra parte *De Feo y col.*, (1998), registraron un valor de 0,88 g/ml para esta fracción obtenida a partir de material recolectado en el mismo mes (abril) pero de la región de Mina Clavero.

Un tiempo de 2 h fue suficiente para el agotamiento de la matriz herbácea, lográndose un volumen de 3 ml de AE cuando se emplearon 60 g de la especie *Minthostachys verticillata*. A partir de estos resultados se pudo calcular su rendimiento, que correspondió al 5% v/p (volumen/peso seco de material vegetal). Si bien *De Feo y col.*, (1998) informaron valores similares (4,91% v/p), el proceso de destilación por vapor de agua, desarrollado por estos investigadores, requirió un tiempo mayor (3 h). Esta disminución de rendimiento, aún con tiempos mayores de destilación, permite inferir que la cantidad porcentual de aceites esenciales para una misma especie vegetal depende del ecosistema donde la misma se desarrolla, es decir de las condiciones edafoclimáticas del lugar, como así también de las interacciones desarrolladas con las demás especies vegetales con las que cohabitan.

Si se compara el rendimiento aquí obtenido con el hallado por *Zabala, E.*, (2002), (5% vs. 9,6%), a partir de la especie procedente del mismo lugar, es decir Santa Rosa, pero recolectada en distinta época (abril vs. diciembre), puede notarse que este último valor fue prácticamente el doble. Esta discrepancia podría deberse a que la planta se hallaría en un estado fenológico distinto por lo que su actividad metabólica generaría productos diferentes en cuanto a calidad y cantidad [*Dominguez, X.*, 1973].

Sin embargo, es importante señalar que diferencias significativas se hallaron aún entre poblaciones de una misma especie vegetal, recolectadas en el mismo período y lugar, tal lo informado por *Banaeva y col.*, (1998), quienes analizaron el rendimiento de la especie *Thymus serpyllum*.

Existe una amplia bibliografía referida a rendimientos de AE con valores porcentuales de 0,20 - 0,25 para *Ocimum selloi* [Morales et al., 2002], 0,5 para *Hyssopus officinalis* [Miti and Sinisa, 2000] y 1,2 para *Ocimum spp* [Murillo Perea y Viña Patiño, 1999], todas especies pertenecientes a la familia Lamiaceae. Del análisis de estos resultados se puede concluir que el rendimiento de *M. verticillata* superó los valores hallados para las especies anteriormente mencionadas pertenecientes a la misma familia. Por lo expuesto se deduce que existe variabilidad inter e intraespecífica, respecto al rendimiento como también a la densidad de los aceites esenciales.

5.3.2. Cromatografía gaseosa del Aceite esencial de *M. verticillata*

Para determinar la composición química de un AE resulta indispensable definir el perfil de los componentes de la mezcla, para lo cual existen distintas metodologías, tal como se describieron en el apartado 1.3.4.b.

En este trabajo se realizó CG debido a que existen diversas investigaciones que citan a esta metodología como técnica adecuada para el análisis cuali-cuantitativo de aceites esenciales obtenidos a partir de diferentes géneros pertenecientes a la familia Lamiaceae [Arrebola et al., 1997; Baser et al., 1997; Dellacassa et al., 1997; Pino et al., 1997; Salgueiro et al., 1997; Ciccio et al., 1999].

El desarrollo de este ensayo requirió un tiempo de aproximadamente 80 min para obtener el perfil cromatográfico del AE de *M. verticillata*, que se presenta en la Figura 6.

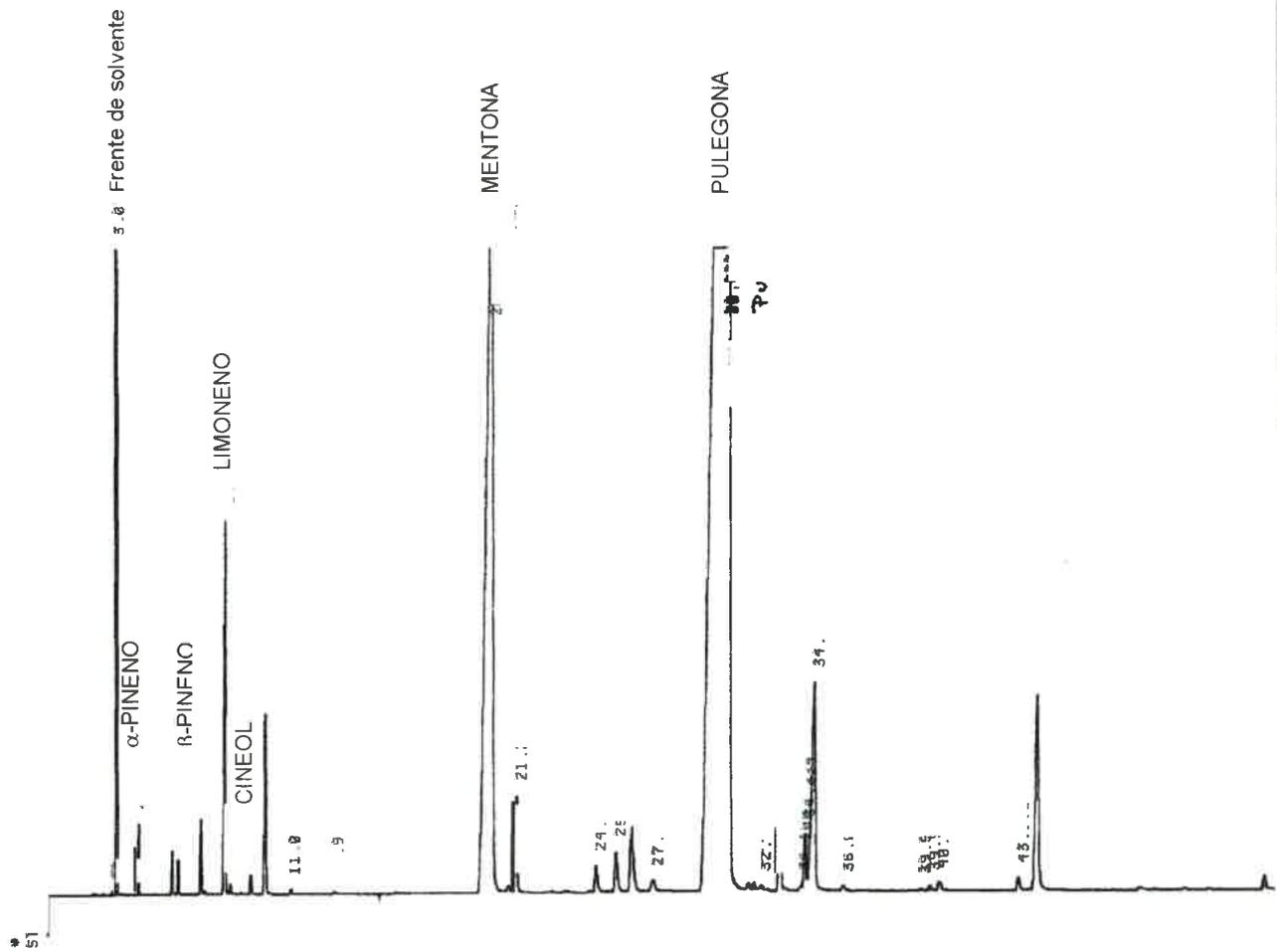


Figura 6: Perfil cromatográfico del AE de *M. verticillata*, obtenido por CG.

El área representada por cada pico corresponde a las proporciones en las que se encuentra cada compuesto puro en el AE. Se muestra sólo la primera

parte del cromatograma, dado que allí se distribuyen los componentes de interés, es decir los que se encuentran en mayor concentración y que resultaron ser: limoneno, mentona y pulegona, ordenados en forma creciente al tiempo de elusión. También se identificaron componentes minoritarios como α -pineno, β -pineno y 1,8-cineol.

Los patrones usados para realizar la CG correspondieron a los componentes mayoritarios y fueron seleccionados tomando como base los resultados informados por *De Feo y col., (1998)*, quienes identificaron en el AE de *M. verticillata* mayor proporción de pulegona, mentona y limoneno. La predominancia de estos tres componentes parece ser una constante para el AE de la especie, dada la consistencia de los datos obtenidos por ambas investigaciones. *De Feo y col., (1998)* pudieron caracterizar 45 componentes químicos en su AE que representaron un valor porcentual del orden del 97,2 en contraposición al 81,72% (Tabla 4), reportado en esta investigación.

Tabla 4: Porcentajes de los compuestos identificados en el AE de *M. verticillata*.

Compuesto identificado	Porcentaje
α -pineno	0,16
β -pineno	0,27
Limoneno	1,87
1,8-cineol	0,05
Mentona	16,40
Pulegona	62,97
Total	81,72

Como puede notarse, en el AE predominaron los monoterpenos oxigenados pulegona y mentona con el 62,97 y 16,40%, respectivamente. También se detectaron α -pineno, β -pineno y limoneno como monoterpenos hidrocarbonados y en menor proporción 1,8-cineol.

En referencia a los componentes mayoritarios presentes en los AE de diferentes géneros y especies de Labiadas, la literatura consultada revela que existe gran variabilidad química. Pueden citarse como ejemplos, el contenido significativamente alto de eugenol (88,8%) en la muestra de *Ocimum basilicum* [Base de datos internet: www.ics.trieste.it/EssentialOils/EssentialOil.aspx]; la predominancia de timol (34,60%), γ -terpineno (17,61%) y p-cimeno (17,65%) en *Thymus vulgaris* [Pino et al., 1997]; y de carvacrol (42,76%) y timol (28,7%) en *Origanum tyttanthum* [Baser et al., 1997]. La discrepancia en relación a la presencia de componentes predominantes es interesante; puede destacarse que los componentes mayoritarios obtenidos en este trabajo son coincidentes con los informados por Ciccio y Poveda, (1999), quienes analizaron químicamente el AE de *Cunila polyantha*, especie vegetal perteneciente a otro género de las Labiadas en la que determinaron porcentajes del 63% para mentona y 14% para pulegona.

Bandoni y col., (1998) trabajaron con *M. verticillata* recolectada de diferentes lugares de las provincias de San Luis y Córdoba, y en diferentes períodos. Dichos autores encontraron también, como componentes principales, a pulegona y mentona e informaron que el compuesto predominante de su muestra fue mentona.

Es conocido que un aumento en la proporción de mentona tiene una relación directa con el grado de floración del vegetal cosechado [Bandoni y col., 1998; Martínez, A. 2003]. Probablemente esto justifique el mayor porcentaje de mentona hallado en el AE analizado por Bandoni y col., (1998) porque su colecta fue realizada en verano, época de mayor floración de la peperina. Por el contrario, el material vegetal recolectado para este trabajo, al igual que el cosechado por De Feo y col., (1998), correspondió al mes de abril, período en que la planta presenta principalmente frutos, lo que explicaría el mayor contenido de pulegona en el AE.

Este argumento está fuertemente validado por Martínez, A., (2003), quien explica la estrecha relación biosintética entre pulegona y mentona, y menciona

la presencia de un “activador” durante la floración, responsable del desplazamiento del equilibrio pulegona-mentona hacia este último compuesto.

Algunos autores han descrito un nuevo concepto para denominar esta variabilidad en la composición del AE: el de “quimiotipo”. Dicho concepto relaciona íntimamente los componentes mayoritarios que presentan los aceites esenciales, y la relación entre ellos que define el quimiotipo de un determinado AE [Mímica-Dukié et al., 1991; Moraes et al., 2002].

Muñoz-Collazos y col., (1993), propusieron emplear la relación pulegona-mentona (detectados como mayoritarios) para establecer así un índice que permitiera determinar los diferentes quimiotipos dentro de la especie *Minthostachys andina*.

Sobre la base de los resultados obtenidos en este trabajo para *Minthostachys verticillata* y teniendo en cuenta los valores porcentuales de pulegona (62,97) y mentona (16,40) (Tabla 4), se obtuvo un índice de 3,84. Por su parte, De Feo y col., (1998), informaron un índice de 1,29, lo que indica una diferencia menor entre los dos componentes. Por el contrario, Bandoni y col., (1998), obtuvieron índices de 0,54 y 0,41, expresando así un predominio de mentona en las muestras analizadas. Estos resultados sugieren que el AE analizado en esta tesis correspondió a un quimiotipo diferente a los descritos por los autores mencionados. Sin embargo, todos los AE estarían incluidos entre los quimiotipos citados por Zygadlo y col., (1996): carvona, timol-carvacrol y predominantemente pulegona-mentona.

5.4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD DEL AE DE *M. verticillata* Y SUS COMPONENTES MAYORITARIOS

La literatura consultada cita una amplia variedad de técnicas indispensables y útiles para determinar el grado de toxicidad de productos vegetales, previo a los estudios de actividad antiviral.

Para el desarrollo del presente trabajo se seleccionaron distintas metodologías que involucraron dos sistemas biológicos diferentes: *Artemia salina* y cultivos celulares.

5.4.1. *Artemia salina*

Está indicado en la base de datos [Solís et al., 1993] que los resultados de citotoxicidad obtenidos empleando *A. salina* se aproximan a los hallados en células de mamíferos, aunque algunos investigadores han informado que no hay una correlación directa en el grado de toxicidad entre ambos sistemas [Franssen et al., 1997]. No obstante su alta especificidad, hacen de esta técnica un método preliminar para determinar toxicidad, motivo por el cual el AE de *M. verticillata* y sus componentes mayoritarios fueron ensayados primero en este organismo y luego en líneas celulares.

5.4.1.a. Obtención de larvas de *Artemia salina*

Se logró la eclosión de casi el 100% de los huevos de *A. salina* después de 36 h de incubación en agua marina a temperatura ambiente, con buena oxigenación y luz.

5.4.1.b. Determinación de Dosis Letal 50% del AE de *M. verticillata* y sus componentes mayoritarios

Se define Dosis Letal 50% como la concentración o dosis del compuesto que produce la muerte de un 50% de las larvas sometidas al tratamiento.

Dada la naturaleza oleosa de las muestras a estudiar, se debió disolver las mismas en DMSO a una concentración final de 0,5% v/v que según la bibliografía consultada no afecta la viabilidad de las larvas de *A. salina* [Franssen et al., 1997].

Previo a la determinación de la DL₅₀, resultó indispensable reconocer la morfología normal de este crustáceo y así poder distinguir las alteraciones que las diferentes fracciones vegetales de *M. verticillata* podrían inducir.

La Figura 7.a exhibe la morfología normal del crustáceo, crecido en solución salina al 3,3%. Por el contrario en la Figura 7.b, se visualiza el daño morfológico inducido por el AE de *M. verticillata* a concentración tóxica. Puede notarse una desorganización estructural, y pérdida y/o ruptura de alguno de sus miembros.



Las concentraciones tóxicas de las demás muestras evaluadas permitieron visualizar imágenes similares.

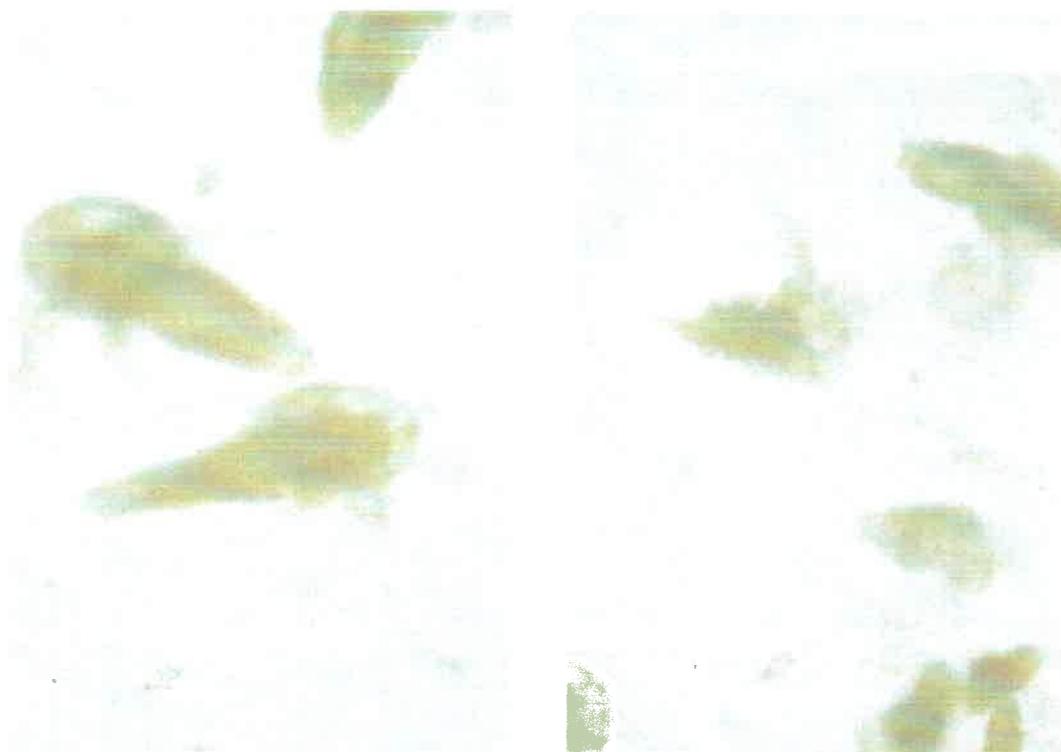


Figura 7: Larvas de *Artemia salina*: **a)** control, **b)** tratadas con AE de *M. verticillata* a concentración tóxica.

La DL_{50} se calculó mediante la aplicación del método estadístico de Reed-Muench.

Los valores obtenidos se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: DL₅₀ del aceite esencial de *M. verticillata*, sus principales componentes y combinaciones sobre *Artemia salina*.

Compuesto vegetal	DL ₅₀ (mg/ml)
AE	2,10
Pulegona	0,30
Mentona	1,12
Limoneno	5,25
Pulegona-Mentona	0,47/0,12
Pulegona-Limoneno	ND
Mentona-Limoneno	5,01/0,54

ND: No Determinada.

El compuesto menos tóxico fue limoneno, seguido por el AE puro, y mentona; de todos los componentes individuales, pulegona fue el más tóxico.

No fue posible determinar la DL₅₀ para la mezcla pulegona - limoneno, debido a que la concentración mínima probada (0,173 - 0,004 mg/ml) registró una letalidad superior al 90%.

Sökmen, A., (2001) analizaron la toxicidad de diferentes partes de la especie vegetal *Thymus fallax* (Labiada) sobre este crustáceo y hallaron valores de DL₅₀ de 0,45 y 0,94 mg/ml para extractos preparados con partes aéreas y callos de la planta, respectivamente. Es de destacar que la naturaleza química de estas fracciones, obtenidas con solventes de diferente polaridad, es distinta a las estudiadas en este trabajo de Tesis. A pesar de esta discrepancia, los valores informados por estos autores indican mayor grado de toxicidad sobre *A. salina* que los aquí señalados.

En el presente trabajo, el empleo de *A. salina* tuvo como propósito lograr una aproximación de los rangos de concentraciones a emplear para la determinación de citotoxicidad en los cultivos celulares.

Aunque la utilización de *A. salina* es un indicador ideal de la actividad insecticida [Svoboda and Hampson, 1999], por los resultados logrados aquí con el AE de *M. verticillata*, también se reporta un beneficio útil para la determinación previa del potencial citotóxico de compuestos químicos.

También *A. salina* ha sido empleada en estudios de extractos de *Neurolaena lobata* contra Plasmodium; sin embargo los resultados de toxicidad obtenidos en el crustáceo no tuvieron correlación con la actividad antiplasmodial [Franssen et al., 1997]. Los investigadores atribuyen estas diferencias a la complejidad de las fracciones vegetales en las que diferentes compuestos podrían ser responsables de las distintas acciones biológicas.

5.4.2. Determinación de Máxima Concentración No Citotóxica

La potencia de un antiviral está relacionada con su capacidad de resultar no tóxico para la célula huésped, ya que es preciso asegurar que la inhibición observada sea debida sólo a una acción directa sobre la replicación viral y no sobre la célula que sustenta dicha replicación. Por esta razón, en primer lugar se determinó la acción tóxica del AE de *M. verticillata* y de pulegona, mentona y limoneno sobre monocapas celulares preformadas.

La línea celular HEp-2 es de origen humano, por el contrario la línea Vero deriva de células de riñón de mono, la que filogenéticamente, tiene estrecha relación con el humano.

Como se mencionó en el apartado 5.2.1, la infección por virus *Herpes suis* produce al cabo de 72 h placas de lisis en las monocapas celulares, por lo que este tiempo es el necesario para cuantificar su infectividad. Por este motivo, los valores de MCNC fueron determinados a dicho período de tratamiento celular con las fracciones en estudio para garantizar la ausencia de toxicidad en los posteriores ensayos de inhibición viral.

5.4.2.a. Máxima Concentración No Citotóxica de DMSO

Este estudio fue requerido porque las muestras, como ya se mencionó, son de naturaleza oleosa y debido a que el medio que baña la monocapa celular es acuoso, el DMSO debió ser utilizado como solubilizante del AE y de sus componentes. Como consecuencia, el DMSO se constituyó en parte del sistema en los siguientes ensayos, por lo que debió determinarse su MCNC y poder así descartar su posible efecto tóxico en el sistema celular ensayado.

La observación al microscopio óptico de células Vero tratadas con DMSO a concentración citotóxica permitió determinar la presencia de granulaciones citoplasmáticas, redondeamiento y disminución del tamaño celular, refringencia y engrosamiento de la membrana citoplasmática, tal como se muestra en la Figura 8.a. Al mismo tiempo se presenta un cultivo control, con la morfología normal que lo caracteriza (Figura 8.b).

La Figura 9.a exhibe las alteraciones inducidas por el mismo agente sobre la línea celular HEp-2, definidas por redondeamiento y retracción celular, y pérdida parcial de confluencia en el cultivo. En contraposición, en la Figura 9.b se observa el sistema celular control.

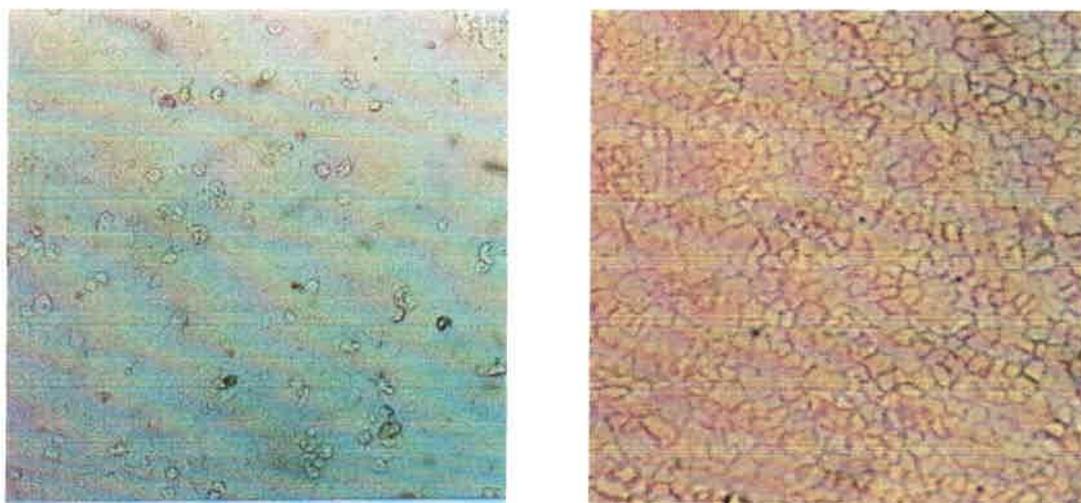


Figura 8. a) Efecto citotóxico de DMSO (10,92 mg/ml) sobre monocapa de células Vero, **b)** Morfología normal de una monocapa de células Vero (control celular) (20X).

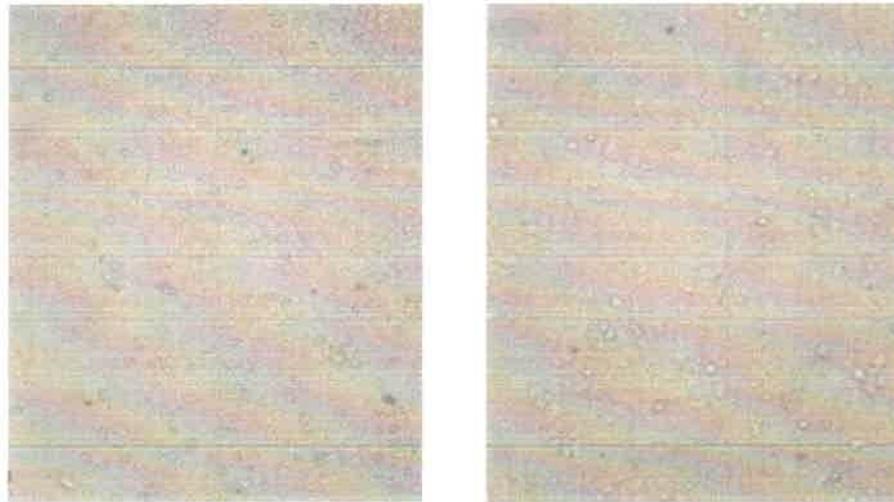


Figura 9. a) Efecto citotóxico de DMSO (18,20 mg/ml) sobre monocapa de células HEp-2, b) Morfología normal de una monocapa de células Hep-2 (control celular) (20X).

Los ensayos de citotoxicidad permitieron, además de caracterizar los daños en los sistemas celulares, hallar los valores de MCNC de DMSO que correspondieron a 9,10 y 13,65 mg/ml, en las líneas celulares Vero y HEp-2, respectivamente.

Estos resultados demuestran que las células HEp-2 fueron más resistentes a la acción tóxica del DMSO, porque toleraron hasta una concentración de 13,65 mg/ml sin evidenciar daño visible, concentración a la cual las células Vero se mostraron alteradas.

5.4.2.b. MCNC del AE de *M. verticillata*

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.4.2.b, después de 72 h de incubación de los cultivos celulares con diferentes concentraciones del AE, se pudo establecer a partir de cual concentración el AE no ejerció acción tóxica. En función de estos resultados pudo determinarse la MCNC del AE sobre monocapas de células Vero y de HEp-2, cuyos valores fueron de 811 y 1.013 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Estos valores demuestran que las células HEp-2

nuevamente resultaron más resistentes a la acción de la muestra en estudio, porque toleraron hasta una concentración de 1.013 $\mu\text{g/ml}$ sin evidenciar alteraciones, concentración a la cual el sistema celular Vero presentó cambios morfológicos visibles.

También, la observación de los cultivos tratados permitió caracterizar las alteraciones de los mismos a concentraciones citotóxicas, tal como se presentan en las Figuras 10.a y 10.b.

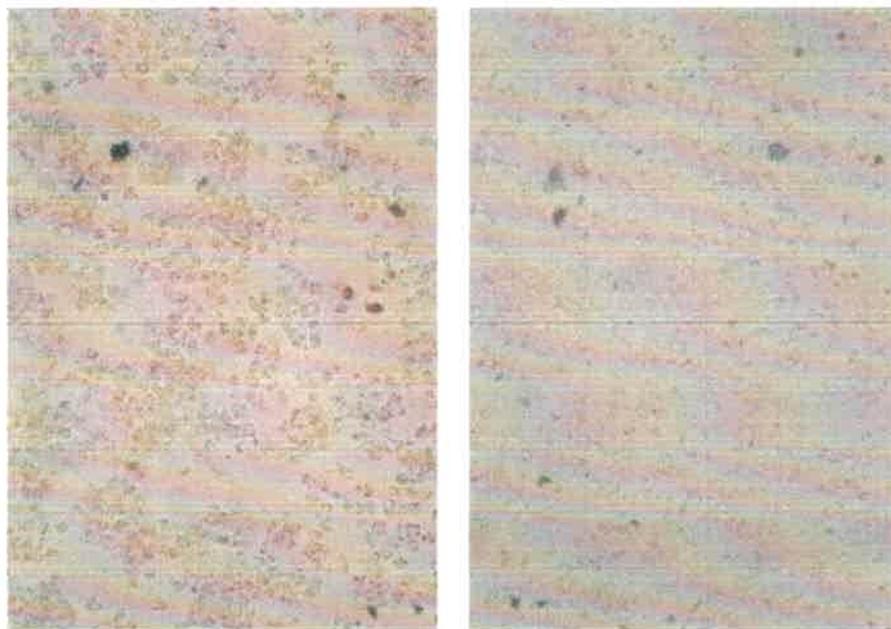


Figura 10: Efecto citotóxico del AE de *M. verticillata* sobre monocapas de:
a) células Vero (1.351 $\mu\text{g/ml}$),
b) células HEp-2 (1.158 $\mu\text{g/ml}$), (20 X).

En ambos sustratos biológicos hubo alteraciones de la morfología, retracción celular y pérdida de la confluencia de la monocapa, como consecuencia de la muerte de las células y desprendimiento de muchas de ellas de la superficie donde estaban adheridas, quedando espacios vacíos. Las células Vero además, manifestaron granulaciones intracitoplasmáticas.

Es de destacar que al ser el AE una mezcla compleja de compuestos con características volátiles, se podría pensar que al analizar su toxicidad sobre células vivas crecidas en policubetas e incubadas a 37°C por un tiempo prolongado (72 h), los componentes de la misma podrían volatilizarse y afectar a las monocapas de pocillos adyacentes. Esta situación no sucedió, ya que los sistemas celulares controles incluidos en la misma policubeta, no evidenciaron ninguna alteración morfológica durante el tiempo que demandó esta experiencia.

5.4.2.c. MCNC de los componentes mayoritarios del AE, en formas individual y combinada

Si bien las 72 h se constituyeron en el tiempo límite del tratamiento, la observación microscópica a escasas horas de realizada la experiencia, permitió evidenciar alteraciones celulares en las monocapas de ambas líneas, incubadas con las mayores concentraciones de las muestras en estudio.

A continuación se describen los efectos citotóxicos de los compuestos predominantes del AE de *M. verticillata* analizados en forma pura sobre células Vero. La Figura 11.a muestra el daño tóxico ejercido por pulegona caracterizado por retracción de las células aún adheridas, y formación de huecos en la monocapa. El tratamiento con mentona, a concentración citotóxica, generó células abalonadas, agrupadas y refringentes con granulaciones intracitoplasmáticas, además de desprendimiento celular (Figura 11.b). La incubación con limoneno produjo redondeamiento y refringencia celular, engrosamiento de la membrana citoplasmática y presencia de granulaciones intracitoplasmáticas (Figura 11.c).

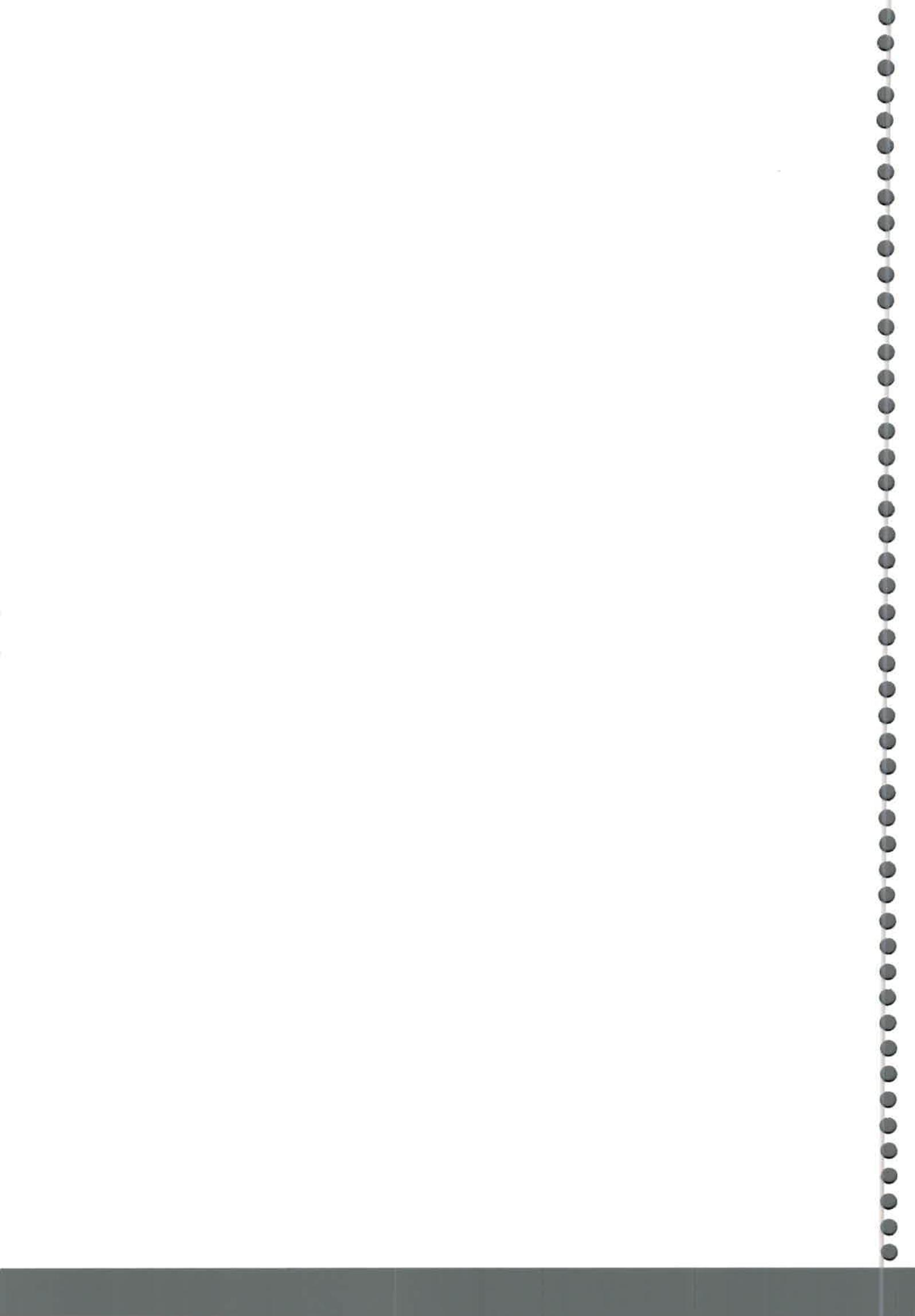




Figura 11: Efecto citotóxico sobre monocapa de células Vero:

- a) pulegona (340 $\mu\text{g/ml}$) (10 X);
- b) mentona (930 $\mu\text{g/ml}$) (32 X);
- c) limoneno (450 $\mu\text{g/ml}$) (10 X).

También se caracterizó la acción tóxica de dichos compuestos sobre el sistema de células HEP-2, observándose en todos los tratamientos redondeamiento celular. Este efecto fue uniforme en toda la monocapa cuando el ensayo se realizó con pulegona (Figura 12.a). Cuando los sustratos biológicos fueron tratados con mentona y limoneno, se observó además de este redondeamiento, presencia de células abalonadas, formación de racimos celulares, y desprendimiento parcial de monocapa generando como consecuencia huecos en la misma. Las Figuras 12.b y 12.c presentan el efecto citotóxico inducido por mentona y limoneno, respectivamente.

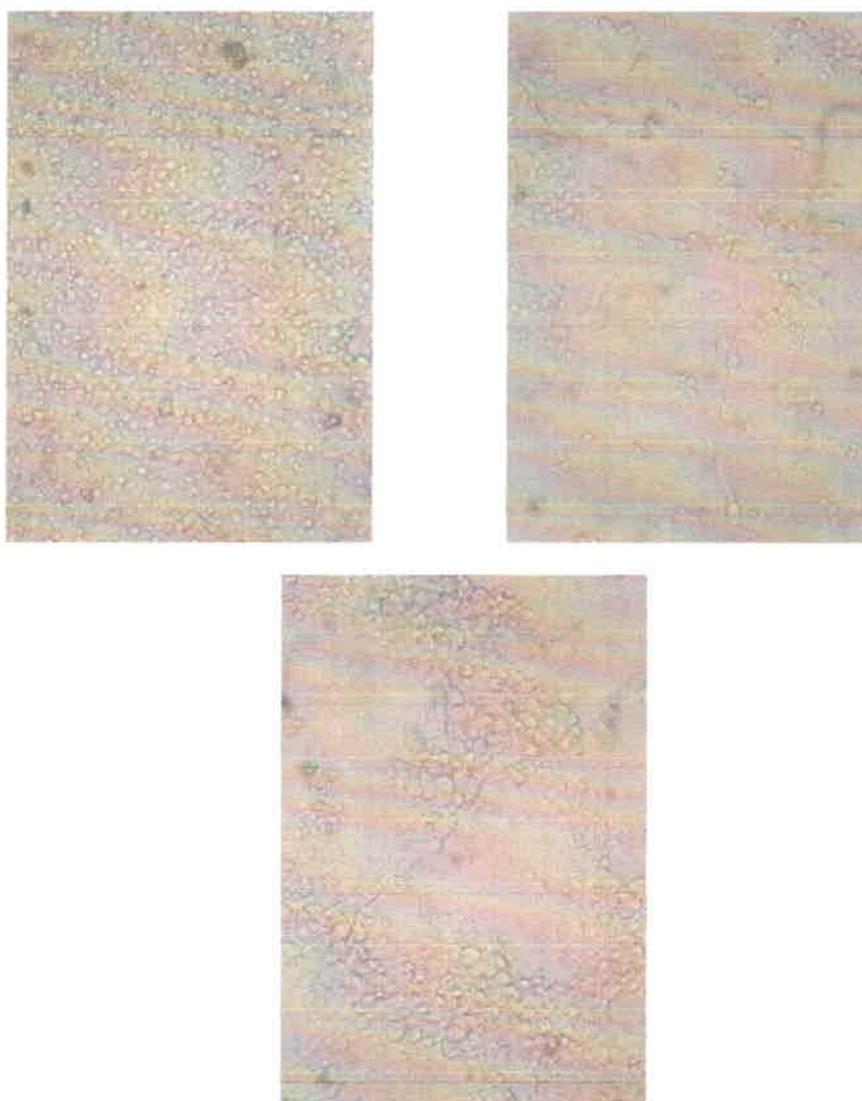


Figura 12: Efecto citotóxico sobre monocapa de células HEP-2:

- a) pulegona (0,23 mg/ml) (20 X);
- b) mentona (0,93mg/ml) (20 X);
- c) limoneno (5,83 mg/ml) (20 X).

En paralelo a la caracterización de las alteraciones inducidas por las diferentes muestras sobre los dos sustratos biológicos ensayados, se determinaron las MCNC de cada una de ellas. Estos resultados, obtenidos a las 72 h post-incubación, se exhiben en la Tabla 6.

Tabla 6: Toxicidad del AE de *M. verticillata* y sus componentes mayoritarios sobre dos líneas celulares a las 72 h post-tratamiento.

Muestra	Máxima Concentración No Citotóxica ($\mu\text{g/ml}$)	
	Vero	HEp-2
Aceite esencial	811	1.013
Pulegona	60	132
Mentona	400	370
Limoneno	250	450

De acuerdo a los valores de MCNC obtenidos en células Vero, para los tres componentes mayoritarios ensayados en forma individual fue posible establecer un orden creciente de toxicidad, siendo mentona la menos tóxica, seguida por limoneno y pulegona. La pulegona a concentraciones superiores a 60 $\mu\text{g/ml}$, indujo cambios morfológicos celulares en contraposición a mentona y limoneno que no ejercieron citotoxicidad a esa concentración.

Por otra parte, los resultados de MCNC de estas mismas fracciones vegetales obtenidos en células HEp-2, muestran que nuevamente pulegona fue el compuesto puro más tóxico registrándose una concentración de 132 $\mu\text{g/ml}$ como la máxima que soportó el sustrato biológico.

Si se analizan ahora los otros dos componentes ensayados puede notarse que mentona fue el menos citotóxico en células Vero y limoneno en la línea HEp-2. Los resultados sugieren claramente que las moléculas implicadas en la acción citotóxica y su mecanismo de acción, indistinto del sistema celular empleado, serían distintos para las tres muestras evaluadas.

Aunque pulegona, como se mencionó anteriormente, resultó el componente predominante del AE que ejerció mayor toxicidad en ambas líneas celulares, dichos sustratos mostraron diferente grado de sensibilidad. Puede notarse que pulegona resultó tóxica a menor concentración en células Vero que en HEp-2 (60 $\mu\text{g/ml}$ vs. 132 $\mu\text{g/ml}$). Este resultado sugiere el compromiso de la

célula huésped en el mecanismo de acción citotóxica ejercida por este compuesto, pudiendo implicar que dicho mecanismo esté condicionado por la fisiología de la célula y la posibilidad de internalización y/o metabolismo del compuesto por el sistema huésped.

Al comparar los resultados discutidos en párrafos anteriores con los valores de MCNC del AE de *M. verticillata* en células Vero y HEp-2 (811 y 1.013 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente), los tres componentes mayoritarios en forma pura, fueron más citotóxicos que el AE. Sobre la base de estos resultados y en conocimiento que el AE es una mezcla de componentes, se infiere que la menor citotoxicidad ejercida por el AE podría deberse a una acción antagónica entre los constituyentes mayoritarios. El mismo comportamiento podrían tener los otros componentes del AE cuya presencia fue detectada por CG, tales como α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, e incluso los no identificados que se encuentren en el rango de trazas.

Para dilucidar si este tipo de interacción realmente existía entre los componentes mayoritarios del AE de *M. verticillata* a la hora de ejercer su potencial citotóxico, se realizaron todas las posibles combinaciones entre pulegona, mentona y limoneno, respetando los porcentajes presentes en el vegetal (62,97; 16,40 y 1,87, respectivamente). A partir de estos valores se construyó la Tabla 7 en la que se presentan las combinaciones de los compuestos y sus respectivas proporciones.

Tabla 7: Combinación de los compuestos puros del AE de *M. verticillata*.

Combinaciones de compuestos	Proporción en el AE
pulegona - mentona	3,84 : 1
pulegona - limoneno	33,67 : 1
mentona - limoneno	8,77 : 1
pulegona - mentona - limoneno	33,67 : 8,77 : 1

Estos valores proporcionales fueron tenidos en cuenta para realizar las diferentes diluciones de las mezclas de compuestos, que expresadas en concentraciones se presentaron en la Tabla 3. Los resultados de estas experiencias se resumen en las Tablas 8 y 9, en las que además se incluyen los Índices de Toxicidad (IT) de los compuestos puros respecto al AE y de los compuestos combinados en relación a los mismos en forma individual.

Con el propósito de facilitar el análisis comparativo se muestran primeramente los resultados obtenidos en células Vero (Tabla 8).

Tabla 8: MCNC e Índice de Toxicidad de componentes puros, empleados

en forma individual o combinados, en células Vero.

Muestra	M C N C ($\mu\text{g/ml}$)	Indice de toxicidad
Pulegona	60	13,52 ^(a)
Mentona	400	2,03 ^(a)
Limoneno	250	3,24 ^(a)
Pulegona - Mentona	100 - 24,4	0,6 ^(b) 16,39 ^(b)
Pulegona - Limoneno	25 - 0,7	2,4 ^(b) 357,14 ^(b)
Mentona - Limoneno	250 - 26,7	1,6 ^(b) 9,36 ^(b)
Pulegona - Mentona - Limoneno	50 - 12,2 - 1,3	1,2 ^(b) 32,78 ^(b) 192,3 ^(b)

(a): MCNC de AE (811 $\mu\text{g/ml}$) / MCNC del compuesto puro.

(b): MCNC del compuesto puro / MCNC del mismo compuesto en la mezcla.

Con el propósito de comparar el grado de toxicidad de los componentes puros con respecto al AE, se calculó para cada uno el IT. Este valor refleja cuánto más o menos tóxico resulta el compuesto puro evaluado en forma individual. Se asume que cuando el IT de uno de los componentes de la mezcla es menor que 1, la capacidad citotóxica del componente en cuestión en la mezcla es más baja que la capacidad citotóxica del componente actuando solo. Contrariamente, si el índice es mayor que uno, refleja que el componente es más tóxico que el AE que lo contiene. A modo de ejemplo pulegona resultó 13,52 veces más tóxica que el AE ($811/60 = 13,52$). Lo mismo ocurrió con mentona y limoneno, aunque en menor grado.

Los resultados confirman que los constituyentes del AE de *M. verticillata* establecen entre sí una relación antagónica para inducir daño celular, lo que se

traduce en una disminución del potencial citotóxico del AE del que forman parte.

El IT también puede ser determinado para combinaciones de compuestos aplicando la misma interpretación.

Como puede observarse en la Tabla 8, los valores del IT reflejaron en la mezcla pulegona - mentona, que la combinación de estos compuestos potenció la capacidad citotóxica de mentona en más de 16 veces; mientras que la acción citotóxica de pulegona al estar en esta combinación, se redujo en un 40%. Se deduce que esta mezcla indujo una toxicidad sobre el cultivo de células Vero de carácter sinérgico para mentona y antagónico para pulegona.

Para las demás combinaciones analizadas en células Vero, hubo una tendencia hacia el sinergismo citotóxico, presentándose de una manera más acentuada para limoneno cuando estuvo presente junto con pulegona (357,14 vs. 3,24) y, aunque en menor grado, cuando formó parte de la triple mezcla (192,3 vs. 3,24).

Los valores del IT reflejaron en la mezcla pulegona - mentona, una potenciación de la citotoxicidad de mentona en más de 8 veces (16,39 vs. 2,03); mientras que la acción tóxica de pulegona al estar combinada se redujo 23 veces (0,6 vs. 13,52). Por lo tanto esta mezcla indujo una toxicidad sobre el cultivo de células Vero de carácter sinérgico para mentona y antagónico para pulegona.

Como se aprecia en la tabla, los componentes que formaron parte de las diferentes mezclas junto con pulegona, en todos los casos ejercieron antagonismo sobre pulegona, aunque en diferente grado. Esta interacción también se evidenció sobre mentona al estar combinada con limoneno.

Como se indicó en metodología, la citotoxicidad de estas mismas muestras fue estudiada también sobre células HEp-2. Los resultados de estas experiencias se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 9: MCNC e Índice de Toxicidad de componentes puros, empleados en forma individual o en mezclas, en células HEP-2.

Muestra	M C N C ($\mu\text{g/ml}$)	Índice de toxicidad
Pulegona	132	7,67 ^(a)
Mentona	370	2,74 ^(a)
Limoneno	450	2,25 ^(a)
Pulegona - Mentona	100 - 24,4	1,32 ^(b) 15,16 ^(b)
Pulegona - Limoneno	96 - 2,68	1,37 ^(b) 167,91 ^(b)
Mentona - Limoneno	220 - 24	1,68 ^(b) 18,75 ^(b)
Pulegona - Mentona - Limoneno	50 - 12,2 - 1,3	2,64 ^(b) 30,33 ^(b) 346,15 ^(b)

(a): MCNC de AE (1.013 $\mu\text{g/ml}$) / MCNC del compuesto puro.

(b): MCNC del compuesto puro / MCNC del mismo compuesto en la mezcla.

Del análisis comparativo entre los valores de MCNC de los compuestos puros y del AE, nuevamente se deduce que existe una interacción antagónica entre los tres componentes del aceite ya que el potencial citotóxico de esta muestra fue menor. Esta aseveración se corrobora con los IT de cada uno de ellos. Como puede observarse en la Tabla 9 el compuesto cuya toxicidad disminuyó en mayor grado cuando formó parte del AE fue pulegona, tal como lo señala su IT de 7,67. Es importante señalar que no se descarta la posible participación en estas interacciones de los demás compuestos que, si bien no

fueron analizados en este trabajo, representaron el 18,76% de la composición del AE de *M. verticillata*.

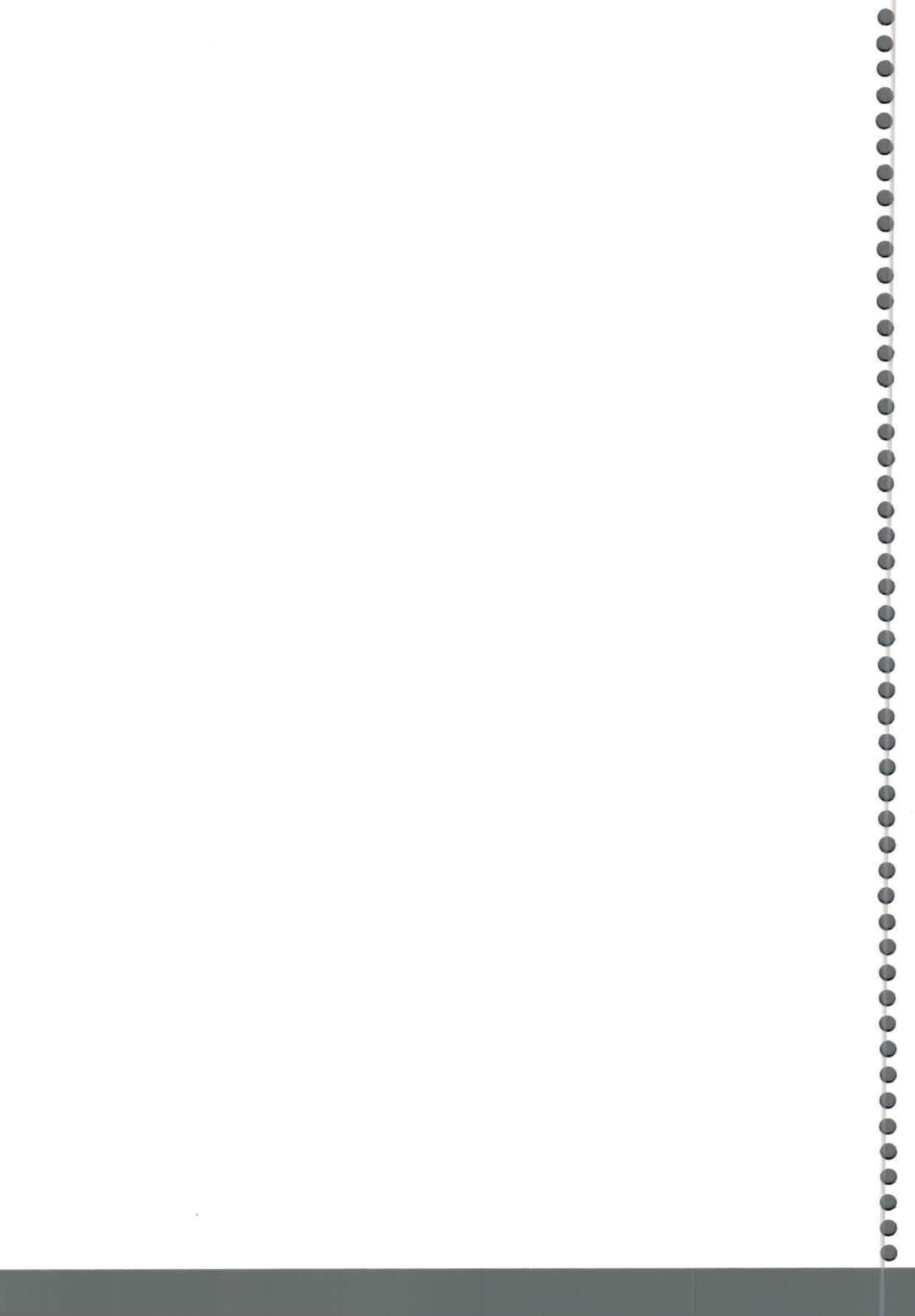
Tal como señalan los índices de toxicidad, con valores mayores a 1, sobre células HEp-2, todas las mezclas de dos y la de tres componentes mostraron sinergismo entre sus constituyentes, contrariamente al resultado antagónico determinado en células Vero para pulegona, al estar combinada con mentona (IT = 0,6).

Si se comparan ahora los IT para un determinado compuesto en el AE respecto al obtenido para el mismo en la mezcla de dos de ellos, puede observarse que limoneno ejerció antagonismo sobre los otros dos componentes, resultando este efecto más marcado sobre pulegona que sobre mentona (7,67/1,37 vs. 2,74/1,68). Al analizar la combinación pulegona - mentona, pulegona nuevamente mostró disminución en su capacidad tóxica (7,67/1,32).

Cuando la interacción fue analizada en la triple mezcla, coincidentemente la actividad tóxica de pulegona se redujo, pero en menor grado que en las combinaciones de dos (de 7,67 a 2,64).

El concepto de antagonismo es discutido en la literatura científica por varios autores. *Karpouhtsis y col.*, (1998), estudiaron por CG la composición del AE de tres especies vegetales vulgarmente conocidas como orégano, entre ellas *Origanum vulgare* (Lamiaceae), para luego analizar la actividad genotóxica e insecticida de los compuestos mayoritarios carvacrol y timol sobre *Drosophila*. Los resultados de estos investigadores demostraron que carvacrol es más tóxico que timol en forma individual, y además evidenciaron el antagonismo ejercido por este último fenol, reduciendo así la toxicidad de carvacrol.

También se han reportado interacciones entre derivados vegetales y compuestos organofosforados. Tal es el caso de fosfomidón, empleado rutinariamente como insecticida y larvicida, que aumentó su capacidad tóxica



cuando fue administrado en combinación con carvacrol a larvas del díptero *Thecodiplosis japonensis*, sugiriendo en este caso, un posible efecto sinérgico o potenciador de dicha actividad biológica [Lee et al., 1997].

Otros autores han demostrado un efecto sinérgico al emplear mezclas de 1,8-cineol con otros monoterpenoles, usadas para el tratamiento de enfermedades virales del tracto respiratorio. Este sinergismo fue evidente en combinaciones de compuestos mayoritarios de ciertos AE obtenidos a partir de géneros de la familia Myrtaceae, de gran interés en el tratamiento de enfermedades pulmonares [Franchomme and Péroël, 1990].

5.4.3. Determinación de Concentración Citotóxica 50%

Los resultados obtenidos del recuento de células HEP-2, tratadas con las diferentes fracciones del AE, por el método de exclusión al azul tripán que fuera descrito en el apartado 4.1.2, fueron analizados gráficamente.

Los Gráficos 1 a 6 representan la concentración del compuesto vs. el porcentaje de viabilidad celular. Se consideró como 100% de viabilidad el número de células presentes en las monocapas no tratadas.

Los valores de CC_{50} fueron calculados por análisis de regresión lineal simple de las curvas dosis-respuesta generadas a partir de los resultados obtenidos para cada compuesto en forma individual y para las mezclas, respetando la proporción encontrada en la planta.

Para facilitar la interpretación de estos resultados, se anexan las Tablas 10 a 16, correspondientes a cada fracción vegetal con las concentraciones ensayadas y la viabilidad porcentual obtenida.

Tabla 10: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEP-2 a diferentes concentraciones de pulegona.

Tabla 10: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEP-2 a diferentes concentraciones de pulegona.

Concentración (mg/ml)	Viabilidad celular (%)
0,057	85
0,099	52
0,158	41
0,198	33
0,226	9

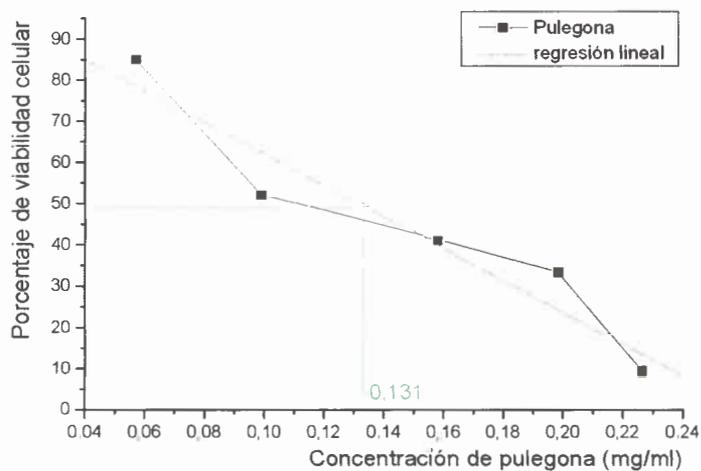


Gráfico 1: CC_{50} de pulegona sobre células HEP-2.

La CC_{50} obtenida en células HEP-2 a las 72 h de tratamiento con pulegona correspondió a 0,131 mg/ml.

Tabla 11: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEP-2 a diferentes concentraciones de mentona.

Concentración (mg/ml)	Viabilidad celular (%)
0,15	120
0,25	86
0,31	76
0,37	45
0,41	32
0,46	29

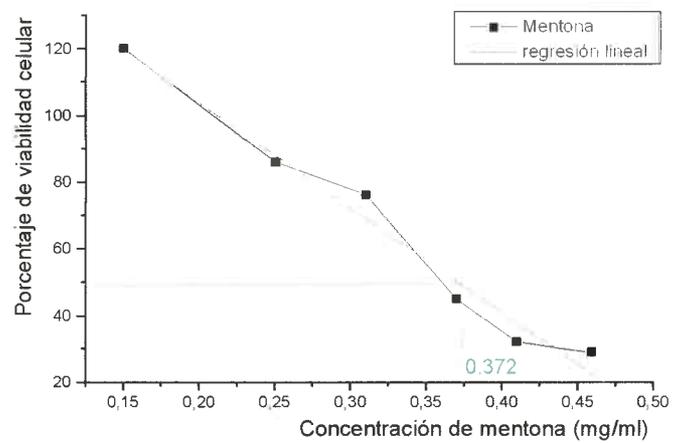


Gráfico 2: CC₅₀ de mentona sobre células HEP-2.

La incubación de cultivos celulares por 72 h con mentona permitió obtener la CC₅₀ que correspondió a 0,372 mg/ml.

Tabla 12: Porcentajes de viabilidad de células HEP-2 a diferentes concentraciones de limoneno.

Concentración (mg/ml)	Viabilidad celular (%)
0,14	125
0,18	114
0,23	88
0,35	98
0,45	92
0,78	123
1	91
1,18	57
1,4	9

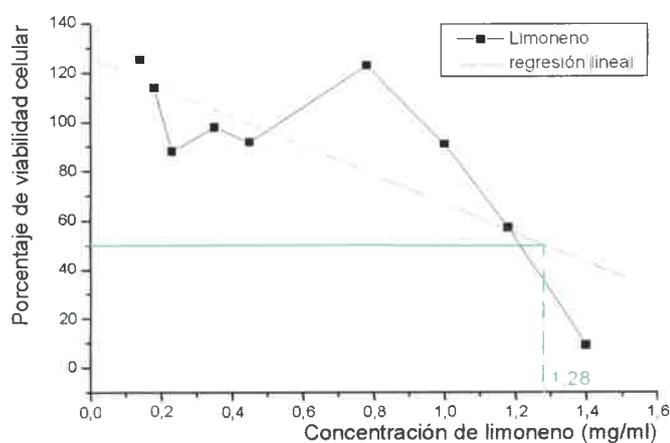


Gráfico 3: CC₅₀ de limoneno sobre células HEP-2.

La CC₅₀ para limoneno en cultivos de células HEP-2 fue de 1,28 mg/ml.

Las tablas siguientes (13 a 16) presentan las concentraciones de cada componente que constituye la mezcla. Para determinar el valor de su CC₅₀ se

consideró arbitrariamente la concentración del primer componente en la mezcla de a dos.

Tabla 13: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEp-2 a diferentes concentraciones de pulegona-mentona (P-M).

Concentración P-M (mg/ml)	Viabilidad celular (%)
0,084-0,021	98
0,116-0,028	60
0,131-0,032	37
0,149-0,037	30
0,174-0,043	2

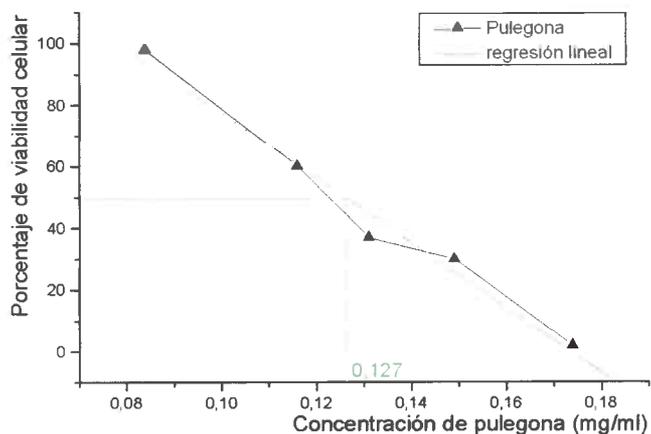


Gráfico 4: CC₅₀ de la mezcla pulegona-mentona sobre células HEp-2.

La CC₅₀ de pulegona cuando estuvo combinada con mentona, correspondió a 0,127 mg/ml. La determinación de este parámetro para el segundo componente, fue realizada teniendo en cuenta la proporción del

mismo en la mezcla, tal como se indicó en la Tabla 7. Así, la CC_{50} de la mezcla pulegona-mentona fue de 0,127-0,031 mg/ml.

Tabla 14: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEP-2 a diferentes concentraciones de pulegona-limoneno (P-L).

Concentración P-L (mg/ml)	Viabilidad celular (%)
0,077-0,0020	51
0,096-0,0025	43
0,154-0,0040	46
0,256-0,0067	42
0,32-0,0084	1

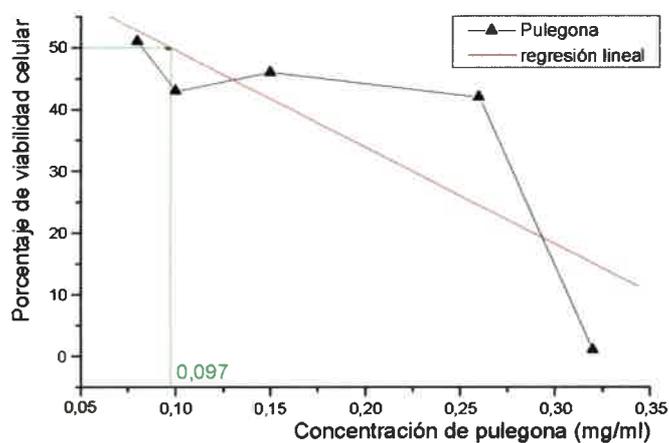


Gráfico 5: CC_{50} de la mezcla pulegona-limoneno sobre células HEP-2.

La CC_{50} correspondiente a la mezcla pulegona-limoneno determinada en células HEP-2 fue de 0,097-0,0027 mg/ml.

Tabla 15: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEp-2 a diferentes concentraciones de mentona-limoneno (M-L).

Concentración M-L (mg/ml)	Viabilidad celular (%)
0,22-0,024	77
0,33-0,036	67
0,37-0,04	46
0,42-0,045	44
0,48-0,05	36
0,56-0,06	40
0,83-0,09	12

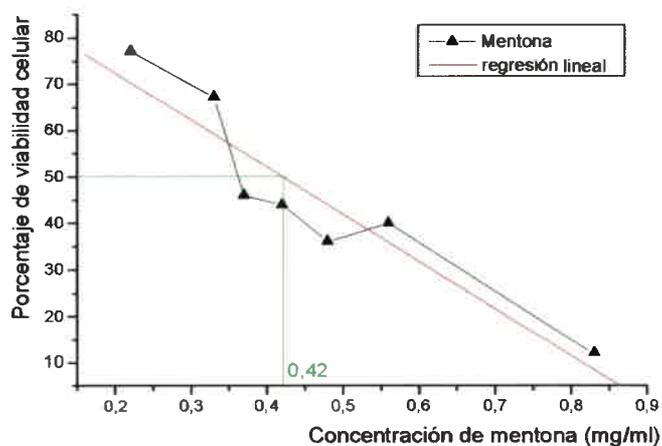


Gráfico 6: CC₅₀ de la mezcla mentona-limoneno sobre células HEp-2.

La CC₅₀ hallada para la mezcla mentona-limoneno sobre la línea HEp-2 tuvo valores de 0,42-0,045 mg/ml.

Tabla 16: Porcentajes de viabilidad celular evaluados sobre células HEP-2 a diferentes concentraciones de pulegona-mentona-limoneno (P-M-L).

Concentración P-M-L (mg/ml)	Viabilidad celular (%)
0,035-0,002-0,0009	69
0,049-0,003-0,0013	55
0,069-0,004-0,0018	52
0,087-0,005-0,002	38
0,099-0,006-0,0026	17
0,14-0,009-0,004	2
0,17-0,011-0,005	5

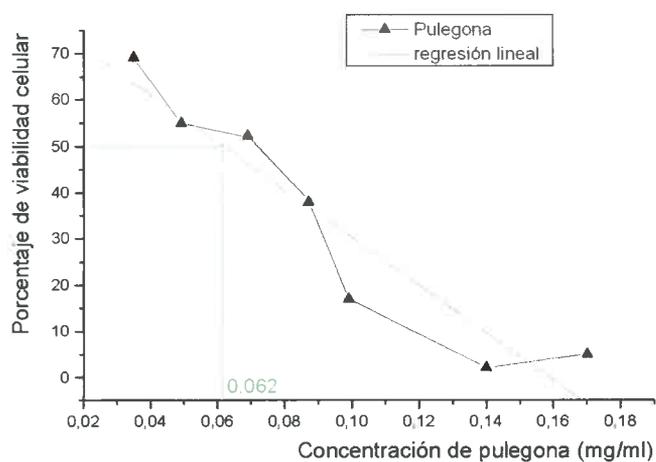


Gráfico 7: CC_{50} de la mezcla pulegona-mentona-limoneno sobre células HEP-2.

Para la combinación de los tres componentes la CC_{50} fue de 0,062-0,015-0,0016 mg/ml.

Las larvas de *A. salina* soportaron mayores concentraciones de AE y de los compuestos puros o combinados, que los sustratos celulares. El análisis comparativo de los resultados logrados con estos dos tipos de huéspedes podría no ser adecuado debido a que el ensayo con *A. salina* implica la utilización de un organismo pluricelular en el cual existe una fisiología más compleja que en las monocapas de cultivos celulares, lo que podría condicionar y justificar la diferencia entre los resultados obtenidos.

Como ya se mencionó, la determinación de la MCNC de las fracciones vegetales es un indicador válido del grado de toxicidad que pudieran ejercer los productos vegetales en el sistema huésped donde se los va a emplear. Más preciso aún es la determinación del valor de CC_{50} , razón por la cual se fijó como objetivo. El criterio de precisión se basa en que para esta metodología los valores que se obtienen no están sometidos a parámetros subjetivos, sino que representan la cantidad real de células vivas y de células muertas, y el error matemático que puede haber en ese recuento se minimiza haciendo repetidas veces el ensayo. No se debe interpretar con esta apreciación que la técnica de determinación de la MCNC no sea confiable, pero sí es cierto que es más subjetiva ya que se basa en resultados cualitativos. El valor positivo o negativo de daño celular resulta del criterio de quien observa dicha alteración al microscopio.

Además, no es correcto comparar valores obtenidos por ambas metodologías, porque la MCNC como ya se mencionó es la mayor concentración del compuesto que no induce alteraciones morfológicas y/o daños celulares visibles, los cuales no siempre reflejan una pérdida de viabilidad celular.

La Tabla 17 resume los valores de citotoxicidad de los compuestos mayoritarios del AE y de sus mezclas, en función de la MCNC y CC_{50} , expresadas en $\mu\text{g/ml}$ y determinadas en células HEp-2.

Tabla 17: Valores de citotoxicidad de los componentes mayoritarios del AE de *M. verticillata*, ensayados en formas individual y combinados en células HEp-2.

Compuesto/s	MCNC ($\mu\text{g/ml}$)	CC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Pulegona (P)	132	131
Mentona (M)	370	372
Limoneno (L)	450	1.280
Pulegona - Mentona	100 - 24,4	127 - 31
Pulegona - Limoneno	96 - 2,68	97 - 2,7
Mentona - Limoneno	220 - 24	420 - 45
P - M - L	50 - 12,2 - 1,3	62 - 15 - 1,6

Al analizar los valores de CC₅₀, pudo observarse que de los compuestos individualmente ensayados, pulegona resultó el más tóxico y, de las combinaciones, lo fue la mezcla de los tres seguida por la de pulegona - limoneno.

A pesar de las discrepancias mencionadas anteriormente entre ambas metodologías, los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes en cuanto al orden de toxicidad presentado por cada una de las muestras analizadas indistinto de la técnica desarrollada.

Resulta interesante comparar los valores de CC₅₀ obtenidos en estos ensayos con los informados por *Chiang y col.*, (2002), quienes trabajaron con compuestos terpenoides y obtuvieron valores de 37,8 y 14,4 $\mu\text{g/ml}$ para el ácido oleanólico y ácido ursólico, respectivamente. Dichos valores indican la mayor toxicidad de estos compuestos con respecto a los aquí ensayados. Si bien estos resultados fueron realizados en la línea celular BCC-1/KMC, diferente a la aquí empleada, ambas líneas celulares provienen de carcinomas humanos.

Otros terpenoides han mostrado también mayor toxicidad, como lo indican sus menores valores de CC₅₀ de los ácidos morónico (63,4 $\mu\text{g/ml}$) y betulónico (16,2 $\mu\text{g/ml}$) provenientes de la especie *Rhus javanica*, resultados obtenidos

por la misma técnica metodológica empleada en este trabajo [Kurokawa et al., 1999].

Las características de toxicidad selectiva en la aplicación farmacológica es una condición primordial porque mientras más alto es el valor de MCNC o CC_{50} , es decir mientras más concentración de la fracción en estudio tolere el sustrato biológico, mayor es su posibilidad de ser empleado como un posible fitofármaco garantizando de esta manera su inocuidad.

5.5. DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL AE DE *M. verticillata* Y SUS COMPONENTES MAYORITARIOS

Considerando los resultados alentadores de capacidad antiherpética del AE de *M. verticillata* informados por Zabala, E., (2002) (94,40%) y Spesia, M., (2004) (89,41%), resultó de interés investigar si el AE de esa especie vegetal, recolectada del mismo lugar geográfico pero en diferente época, conservaba esta capacidad. Por este motivo, se analizó la acción inhibitoria de dicho AE frente al virus *Herpes suis* como así también la de sus componentes mayoritarios. Estos últimos, tal como se indicó en el apartado 4.5, fueron ensayados en forma pura y en mezclas de dos y tres.

La Tabla 18 resume la inhibición viral porcentual ejercida por el aceite esencial y por cada compuesto puro o de la mezcla a su MCNC, calculado a partir de los títulos virales obtenidos en los cultivos tratados vs. el sistema control. Además se exhibe la disminución sobre el tamaño de placa de lisis, producida por algunas de las muestras analizadas.

Tabla 18: Actividad antiviral del AE de *M. verticillata* y sus componentes mayoritarios, solos y combinados, a su MCNC frente al virus *Herpes suis tipo 1*, cepa RC/79 en células Vero.

Muestra vegetal	MCNC (µg/ml)	Título de virus (UFP/ml)		Porcentaje de inhibición viral*	Reducción del tamaño de placas
		control	tratado		
AE	811	$8,25 \times 10^7$	$9,5 \times 10^5$	98,85	-
Pulegona (P)	60	$6,25 \times 10^7$	$4,60 \times 10^5$	99,26	+
Mentona (M)	400	$8,50 \times 10^8$	$2,10 \times 10^6$	99,75	+
Limoneno (L)	250	$6,25 \times 10^7$	$2,22 \times 10^6$	96,45	-
P - M	100-24,4	$9,75 \times 10^7$	$8,75 \times 10^5$	98,60	+
P - L	25-0,7	$6,25 \times 10^7$	$3,80 \times 10^6$	93,92	-
M - L	250-26,7	$8,60 \times 10^6$	$1,35 \times 10^6$	84,30	+
P - M - L	50-12,2-1,3	$8,60 \times 10^6$	$2,45 \times 10^6$	71,51	-

*Porcentaje de inhibición viral = $100 - (\text{título de virus tratado} / \text{título de virus control}) \times 100$

+: Reducción importante.

-: Ausencia de reducción del tamaño de placas.

Los valores de inhibición viral del AE superaron a los informados por Zabala, E., (2002) y Spesia, M., (2004).

De los tres compuestos individuales puros, mentona y pulegona ejercieron mayor actividad antiviral con porcentajes de 99,75% y 99,26%, respectivamente. La literatura consultada define al agente antiviral como aquel compuesto que reduce el título del virus en 2 o más unidades logarítmicas (mayor o igual al 99% de inhibición) [Wachsman et al., 1982; Andrei y col., 1985; De Rodríguez et al., 1990]. Sobre la base de lo expresado, estos dos componentes se comportarían como agentes antivirales.

Si bien limoneno no ejerció una reducción de 2 unidades logarítmicas, el porcentaje de inhibición viral (96,45%), fue igualmente importante.

Debido al alto grado de inhibición de los componentes mayoritarios ensayados en forma individual, podría atribuirse a los mismos la actividad antiviral ejercida por el AE de *M. verticillata*.



El análisis comparativo de los resultados inhibitorios de las combinaciones de dos componentes, permitió observar que ninguna de ellas alcanzó el 99% de reducción viral. No obstante para la mezcla pulegona - mentona, el valor obtenido de inhibición en la multiplicación viral fue de 98,60%, valor que no difiere sustancialmente del sugerido para ser considerado un agente antiviral. Si se compara este valor con los obtenidos por los mismos compuestos individuales se observa una disminución en la actividad antiviral. Este resultado permitiría inferir que estos compuestos terpénicos competirían por el mismo sitio blanco, el que correspondería a algún estadio de la replicación viral posterior a la adsorción y penetración del agente infeccioso, ya que el tratamiento de las células se realizó luego de estos eventos, es decir a los 90 min post-infección. También es posible que estos compuestos compitan durante su internalización por parte de las células.

Como puede observarse en la Tabla 18, los valores de inhibición viral producidos por las demás combinaciones de dos componentes fueron inferiores a los registrados por los compuestos puros ensayados individualmente, lo que permite evidenciar una interacción antagónica aún mayor. Este efecto se vio exacerbado cuando los cultivos celulares infectados fueron tratados simultáneamente con pulegona, mentona y limoneno, como lo demuestra el grado de reducción viral (71,51%), logrado en este ensayo. La comparación de este grado de inhibición con el obtenido por el AE cuyo valor fue de 98,85%, permitiendo hipotetizar que los componentes minoritarios no ensayados en este trabajo, serían los responsables de un efecto aditivo y/o sinérgico sobre esta actividad biológica. Esta apreciación concuerda con lo informado por *Svoboda y Hampson, (1999)*, quienes remarcan la importancia de los componentes trazas en los AE, los cuales pueden influenciar significativamente en las actividades biológicas de los mismos.

Investigaciones realizadas por *Schnitzler y col., (2001)* quienes trabajaron con el AE del árbol de té a concentraciones no citotóxicas, informaron porcentajes de inhibición de los VHS-1 y VHS-2 de 98,2 y 93,0%, respectivamente, los que fueron considerados por los autores como

importantes. De la misma manera, los resultados del AE de *M. verticillata* y de sus tres componentes puros en forma individual y las combinaciones pulegona - mentona y pulegona - limoneno obtenidas en este trabajo, pueden considerarse de la misma forma en función de su similitud.

Además de la reducción del número de placas de lisis producida por el virus en los cultivos tratados con las muestras, fue posible detectar en dichas placas una disminución en su tamaño. Esta situación se manifestó en los ensayos con los dos componentes mayoritarios (pulegona - mentona) puros y combinados, y en la mezcla de mentona - limoneno. Dicho efecto podría deberse a una disminución de la multiplicación viral, como así también a una inhibición en la diseminación viral de célula a célula, tal como lo explica *De Logu y col., (2000)* en su estudio de la actividad antiviral del AE de *Santolina insularis*.

Al integrar las actividades citotóxicas y antivirales exhibidas por los componentes mayoritarios del AE de *M. verticillata*, solos y combinados en las proporciones encontradas en la planta se puede observar que mentona resultó ser el compuesto menos tóxico como lo indica su MCNC (Tabla 18), y al mismo tiempo mostró ejercer el mayor grado de inhibición del *virus Herpes suis*. Su baja citotoxicidad y su alta actividad antiviral son características que inducen a considerar su posible utilización como futuro fitofármaco. Por otro lado, si bien pulegona mostró ser altamente tóxica sobre el sistema celular ensayado, el mismo en muy baja concentración (60 µg/ml) inhibió el título viral en más de un 99%.

Si bien en estas experiencias no fue analizada la actividad inhibitoria sobre la penetración del virus a la célula huésped, es conocido que derivados vegetales, tales como flavonoides redujeron significativamente la adsorción y penetración de *VHS tipos 1 y 2* [*Barnard et al., 1993*]. También componentes proteicos de *Opuntia streptacantha* inactivaron extracelularmente e inhibieron la replicación viral de diferentes virus a ARN y ADN, entre los cuales se cita *Herpes suis* [*Ahmad et al., 1996*].



Abad y col., (2000), trabajaron con extractos de diez plantas superiores de los cuales cinco exhibieron una fuerte actividad antiherpética, cuando fueron empleados a concentraciones no tóxicas, del orden de los 500 mg/ml, dosis mayores a las halladas y empleadas en el presente trabajo.

Extractos acuosos de *Geranium sanguineum L* (Geraniaceae) ejercieron inhibición de la multiplicación de los virus *Herpes simplex tipos 1 y 2* cuando los mismos fueron incorporados a los cultivos celulares previo a la infección viral y permanecieron durante todo el ciclo replicativo. Estos efectos fueron atribuidos a compuestos de naturaleza polifenólica (flavonoides, catequinas y taninos condensados) [*Serkedjieva and Ivancheva, 1999*].

Por último, es necesario destacar que la acción antiviral de las muestras analizadas en este trabajo resultó ser selectiva ya que se manifestó en concentraciones no tóxicas para la célula huésped.

CONCLUSIONES



- El análisis cromatográfico del AE de *M. verticillata* indicó que pulegona, mentona y limoneno fueron los componentes mayoritarios.
- Los resultados de DL₅₀, sobre *A. salina*, permitieron aproximar los rangos de concentraciones de las muestras para los ensayos posteriores en cultivos celulares.
- La determinación de MCNC indicó que:
 - Los componentes mayoritarios ensayados individualmente fueron más citotóxicos que el AE.
 - Las células Vero mostraron ser más sensibles a la acción tóxica de la mayoría de las muestras, que las HEp-2.
 - Los índices de toxicidad hallados en células Vero revelaron que la mezcla pulegona - mentona indujo una toxicidad sobre el cultivo de células Vero de carácter antagónico para pulegona y sinérgico para mentona. Las demás combinaciones ejercieron sinergismo.
 - En células HEp-2, los valores de índice de toxicidad determinaron que los componentes de todas las combinaciones interactuaron sinérgicamente.
- La citotoxicidad determinada por MCNC y CC₅₀, en células HEp-2 indicó valores similares para la mayoría de las muestras analizadas, excepto para limoneno y la mezcla mentona - limoneno.
- El AE de *M. verticillata* y sus tres componentes mayoritarios, ensayados individualmente o combinados, ejercieron una importante acción inhibitoria de la replicación del virus *Herpes suis tipo 1, cepa RC/79*, destacándose la actividad de mentona y pulegona.



- >> Todas las mezclas de los componentes predominantes del AE ejercieron acción antagónica sobre la actividad antiherpética.
- >> La evaluación de las propiedades biológicas en el sistema células Vero - virus *Herpes suis* indicó que mentona fue la menos citotóxica y la de mayor actividad antiherpética.
- >> La acción antiviral del AE de *M. verticillata* y sus componentes predominantes resultó ser selectiva ya que se manifestó en concentraciones no tóxicas para la célula huésped.
- >> La baja citotoxicidad de mentona y su elevada actividad antiviral resultan promisorios, sugiriendo su potencial utilización como fitofármaco en el tratamiento de infecciones herpéticas, revalorizando el potencial etnobotánico de la provincia de Córdoba.



BIBLIOGRAFIA

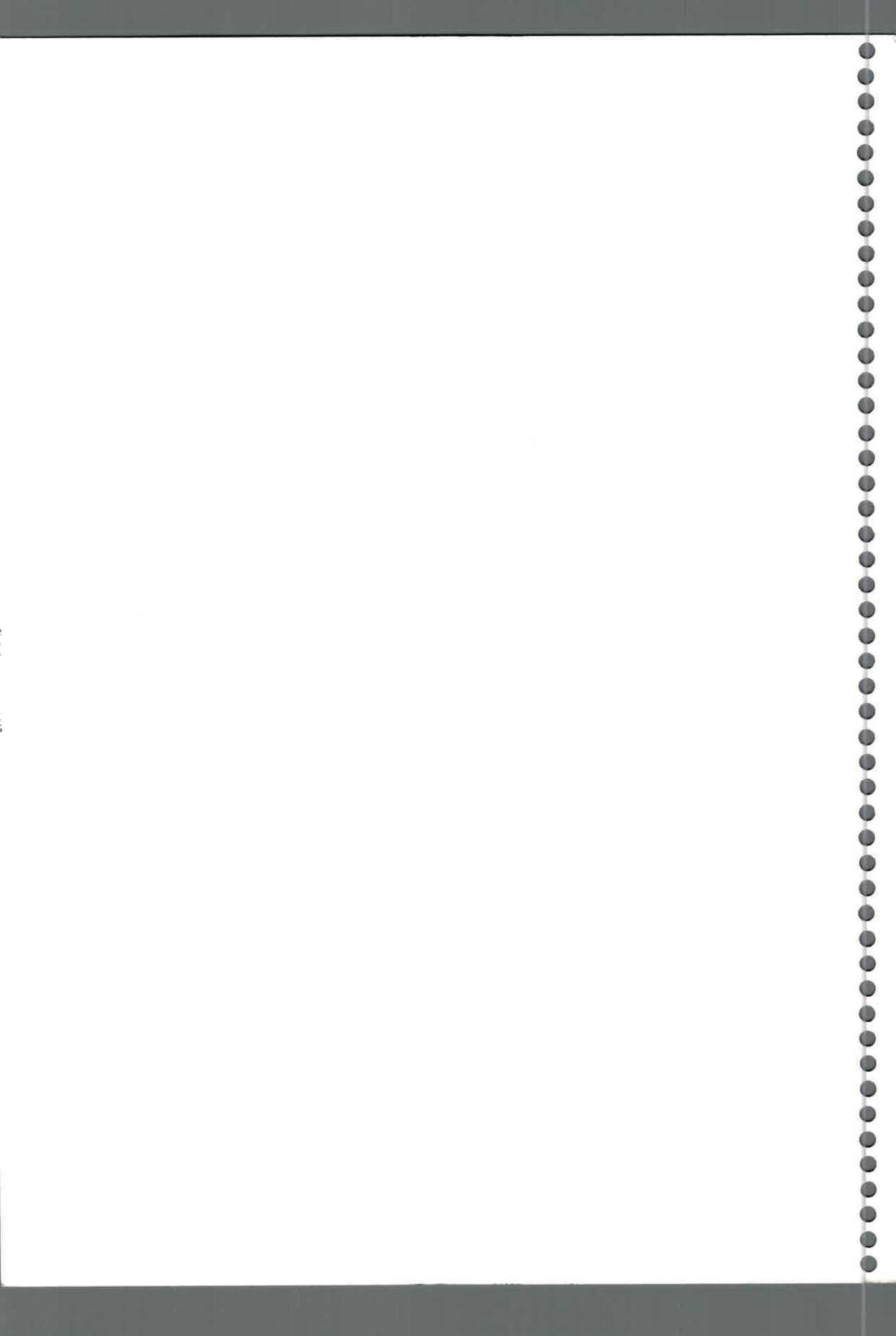
- Abad, M.; Guerra, J.; Bermejo, P.; Irurzun, A.; Carrasco, L. 2000. Search for antiviral activity in higher plant extracts. *Phytotherapy Res.* **14**(8): 604-607.
- Abdullah, D.; Ping, Q.; Liv, G. 1996. Enhancing effect of essential oils on the penetration of 5-fluorouracil through rat skin. *Acta Pharm. Sin.* **31**: 214-221.
- Ahmad, A.; Davies, J.; Randall, S.; Skinner, G. 1996. Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral Res.* **30**: 75-85.
- Ambrogi, A.; Giraud, J.; Busso, J.; Bianco, O.; Bagnat, E.; Segura de Aramburu, M.; Ramos, B.; Ceriatti, F. 1981. Primer diagnóstico de enfermedad de Aujeszky en cerdos en la República Argentina. *Gac. Vet. Buenos Aires.* **XLII** (357): 58-64.
- Andrei, G. 1988. Caracterización y purificación de un factor antiviral presente en la planta superior *Melia azedarach* L. Determinación de su mecanismo de acción. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.
- Andrei, G.; Coto, C.; de Torres, R. 1985. Ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de extractos crudos y semipurificados de hojas verdes de *Melia azedarach* L. *Rev. Arg. de Microb.* **17**(4): 187-194.
- Armaka, M.; Papanikolaou, E.; Sivropoulou, A.; Arsenakis, M. 1999. Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of *Herpes simplex virus type 1*. *Antiviral Research* **43**(2): 79-92.
- Arrebola, M.; Navarro, M.; Jiménez, J. 1997. Essential oils from *Satureja obovata*, *Thymus serpylloides* subsp. *serpylloides* and *T. serpylloides* subsp. *gadorenensis* micropropagated plants. *J. of Essential Oil Res.* **9**(5): 533-536.
- Aydin, S.; Öztürk, Y.; Beis, R.; Baser, K. 1996. Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity. *Phytotherapy Res.* **10**(4): 342-344.
- Ayisi, N. and Nyadedzor, C. 2003. Comparative *in vitro* effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*,



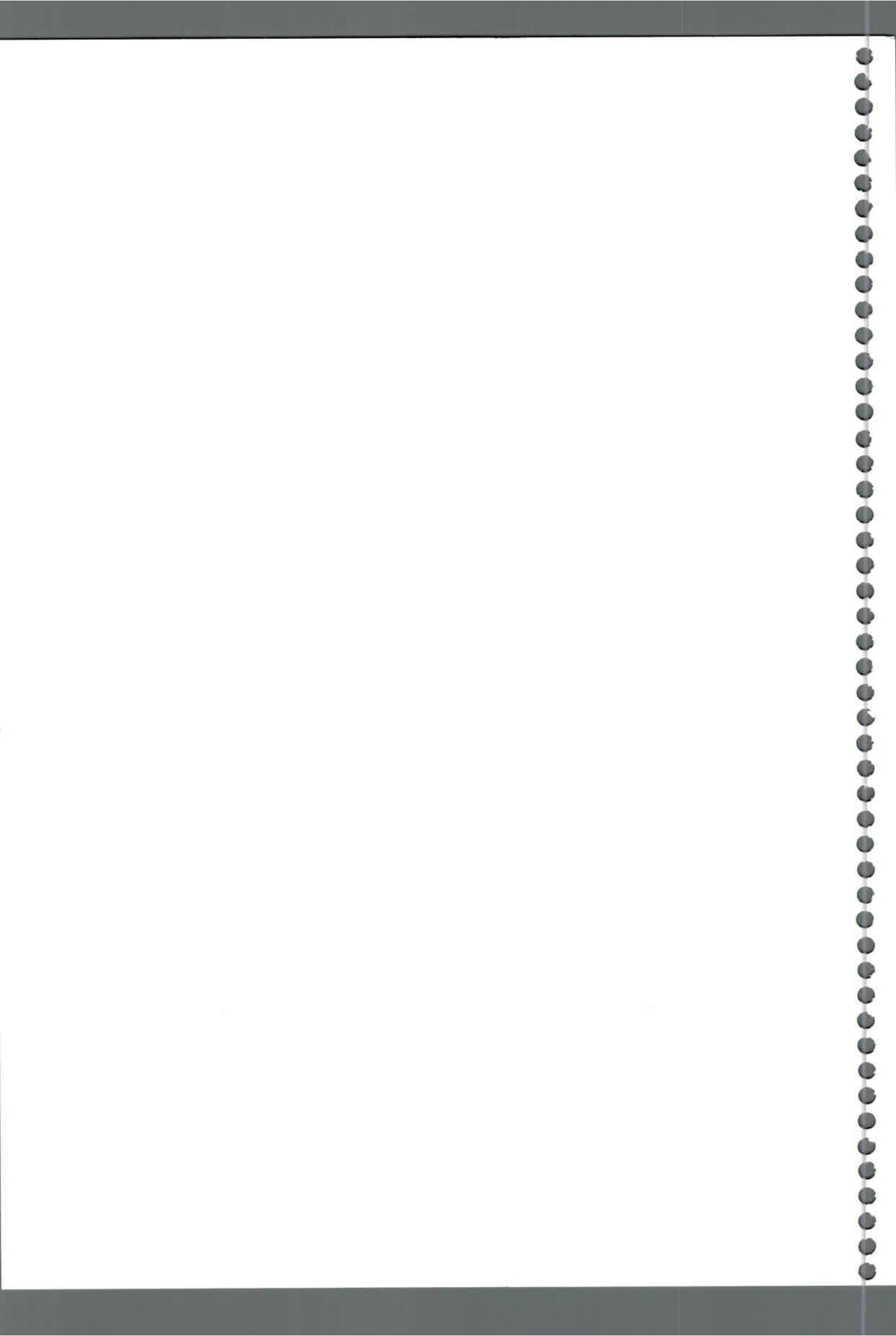
- Alchornea cordifolia* and *Elaeophorbium drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections. *Antiviral Res.* **58**: 25-33.
- Banaeva, Y.; Pokrovsky, L.; Tkachev, A. 1998. Chemical Composition of the Essential Oil of *Thymus serpyllum* L. Growing Wild in Altai Region. Abstracts of Posters. Sitio en internet en: www.nioch.nsc.ru/icnpas98.
- Bandoni, A.; Juárez, M.; Elechosa, M.; López, M. 1998. Composición de esencias de peperina *Minthostachys verticillata* (Gris.) Epling provenientes de Córdoba y San Luis. XII Congreso Nacional de Rec. Nat. Arom. y Medicinales. Córdoba.
- Barnard, D.; Smeets, D.; Huffman, J.; Meyerson, L.; Sidwell, R. 1993. Antiherpesvirus activity and mode of action of SP-303, a novel plant flavonoid. *Chemotherapy* **39**(3): 203-211.
- Baser, K.; Demircakmak, B.; Nuriddinov, K.; Nigmatullaev, A.; Aripov, K.; 1997. Composition of the essential oil of *Origanum tyttanthum* Gontsch. from Uzbekistan. *J. of Essential Oil Res.* **9**(5): 661-612.
- Baudoux, D. 2000. Antiviral and antimicrobial properties of essential oils. *Aromatherapy* **1**: 1-10.
- Beesley, A.; Hardcastle, J.; Hardcastle, P.; Taylor, C. 1996. Influence of peppermint oil on absorptive and secretory processes in rat small intestine. *Gut.* **39**(2): 214-219.
- Betancur-Galvis, L.; Morales, G.; Forero, J.; Roldan, J. 2002. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **97**(4): 541-546.
- Berría, M. 1998. Familia Herpetoviridae. Cap. 19: 327-338. En *Virología Médica*. Carballal, G; Oubiña, J. 3º ed. Edit. El Ateneo.
- Bocco, M. y Grosso, M. 1994. Plantas medicinales usadas en medicina popular en las zonas serranas del Departamento de Río Cuarto. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Chiang, L.; Chiang, W.; Chang, M.; Ng, L.; Lin, C. 2002. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds *in vitro*. *Antiviral Res.* **55**: 53-62.



- Ciccio, J.; Poveda, L. 1999. Volatile constituents of *Cunila polvantha* (Lamiaceae) from Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **47**(3): 377-379.
- Ciccio, J.; Soto, V.; Poveda, L. 1999. Essential oil of *Lepechinia schiedeana* (Lamiaceae) from Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **47**(3): 373-375.
- Ciudad Banda, C. 2000. Producción de Compuestos Secundarios como Alternativa de Cultivos Tradicionales. *Anales de la Universidad de Chile.* VI Serie: N° 11.
- Deans, S.; Ritchie, G. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *Intern. J. Food Microbiol.* **5**:165-180.
- De Cristófano, M.; Livellara, B.; de Torres, R. 1996. Herpes Virus. Capítulo 72: 665-690. En *Microbiología Biomédica*. Basualdo, J.; Coto, C.; de Torres, R. 1° ed. Edit. Atlante S.R.L.
- De Feo, V.; Ricciardi, A.; Biscardi, D.; Senatore, F. 1998. Chemical composition and Antimicrobial screening of the Essential Oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epl. (Lamiaceae). *J. Essent. Oil Res.*, **10**: 61-65.
- Dellacassa, E.; Lorenzo, D.; Mondello, L.; D'Alcontres, I. 1997. Uruguayan essential oil. Part VIII. Composition of leaf oil of *Hiptis floribunda* Briq. ex Micheli (Labiatae). *J. of Essential Oil Res.* **9**(5): 523-525.
- De Logu, A.; Loy, G.; Pellerano, M.; Bonsignore, L.; Schivo, M. 2000. Inactivation of *HSV-1* and *HSV-2* and prevention of cell-to-cell spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral Res.* **48**: 177-185.
- Demirci, B.; Dadand, M.; Paper, D.; Fran, G.; Can Bas, K. 2003. Chemical Composition of the Essential Oil of *Phlomis linearis*. Biological Effects on the CAM-Assay: A Safety Evaluation. *Z. Naturforsch.* 58c, 826. Sitio en internet: www.znaturforsch.com.
- De Rodríguez, D.; Chulia, J.; Simoes, C. 1990. Search for *in vitro* antiviral a new isoflavonic glicoside from *Ulex europaeus*. *Planta Medica* **56**: 59-62.
- Descalzo, A.; Coto, C. 1989. Inhibición del virus de pseudorrabia (*Suid herpesvirus 1*) por acción de un antiviral aislado de hojas de *Melia azedarach*. *Rev. Arg. de Microbiología* **21**: 133-140.
- De Torres, R.; García, G.; Mbayed, V. 1998. Antivirales. Cap. 26: 475-485. En *Virología Médica*. Carballal, G; Oubiña, J. 3° ed. Edit. El Ateneo.



- Domínguez, X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. 1º ed. Ed. Limusa S.A. México.
- Dulbecco, R. 1962. Production of plaques in monolayer tissue culture by single particles of an animal virus. *Procc. National Academic Science USA* **38**: 747-752.
- Eo, S.; Kim, Y.; Lee, C.; Han, S. 2000. Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. *J. of Ethnopharmacology* **72**: 475-481.
- Farnham, A.; Newton, A. 1959. The effect of some environment factors of herpes virus grown in Hela cells. *Virology* **7**: 449.
- Fogaca, R.; Cavalcante, A.; Serpa, A.; Sousa, P.; Coelho-de-Souza, A.; Leal-Cardosa, J. 1997. The effects of essential Oils of *Mentha x villosa* on skeletal muscle of the toad. *Phytotherapy Res.* **11**(8): 552-557.
- Franchomme, P.; Pénéol, D. 1990. L'aromathérapie exactement. Edit. Roger Jollois, Limoges.
- Franssen, F.; Smeijsters, L.; Berger, I.; Medinilla Aldana, B. 1997. *In vivo* and *in vitro* Antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**(7): 1500-1503.
- Fyfe, L.; Armstrong, F.; Stewart, J. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* by combination of plant oils and derivatives of benzoic acid: the development of synergistic antimicrobial combinations. *International J. of Antimicrobial Agents* **9**(3): 195-199.
- García, G.; Campos, R.; de Torres, R.; Broussalis, A.; Ferraro, G.; Martino, V.; Coussio, J. 1990. Antiherpetic Activity of some Argentine Medicinal Plants. *Fitoterapia* **LXI**: 542-546.
- García, G.; Cavallaro, L.; Broussalis, A.; Ferraro, G.; Martino, V.; De Torres, R.; Coussio, J. and Campos, R. 1995. Antiviral activity of *Achyrocline flaccida* Wein DC Aqueous Extract. *Phytotherapy Res.* **9**: 251-254.



- Gill, A.; Dellaquis, P.; Russo, P.; Holley, R. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International J. of Food Microbiology* **73**: 83-92.
- Golberg, H. De la fitoterapia a la fitomedicina. Sitio en internet: www.plantasmedicinales.org/veter.htm.
- Greenberg, M.; Friedman, H.; Cohen, S.; Oh, S.; Laster, L.; Starr, S. 1987. A comparative study of *Herpes simplex* infections in renal transplant and leukemic patients. *J. Infect. Dis.* **156**: 280-287.
- Harmandar, M; Duru, M; Cakir, A; Hirata, T; Izumi, S. 1997. Volatile constituents of *Stachys obliqua* L. (Lamiaceae) from Turkey. *Flavour and Fragrance J.* **12**(3): 211-213.
- Hayashi, K.; Kamiya, M. and Hayashi, T. 1995. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, Influenza virus and HIV. *Planta Medica* **61**: 237-241.
- Hsiung, G. and Fong, K. Herpesviridae. Recognition and characterization of viruses by virus morphology and virus-induced cellular changes. DNA viruses. Chapter 20: 195-215. *Diagnostic Virology*. 3rd ed. Yale University Press New Haven and London. 1982.
- Jassim, S.; Najji, M. 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J. of Applied Microbiology* **95** Issue 3: 412.
- Karpouhtsis, I.; Pardali, E.; Feggou, E.; Kokkini, S.; Scouras, Z; Marvragani-Tsipidou, P. 1998. Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* **46**(3): 1111-1115.
- Kim, Y.; Eo, S.; Oh, K.; Lee, C.; Han, S. 2000. Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with interferons. *J. of Ethnopharmacology* **72**: 451-458.
- Kott, V.; Barbini, L.; Cruañes, M.; Muñoz, J.; Vivot, E.; Cruañes, J.; Martino, V.; Ferraro, G.; Cavallaro, L.; Campos, R. 1999. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *J. of Ethnopharmacology* **64**: 79-84.
- Kurokawa, M.; Basnet, P.; Ohsugi, M.; Hozumi, T.; Kadota, S.; Namba, T.; Kawana, T.; Shiraki. 1999. Anti-Herpes simplex virus activity of moronic

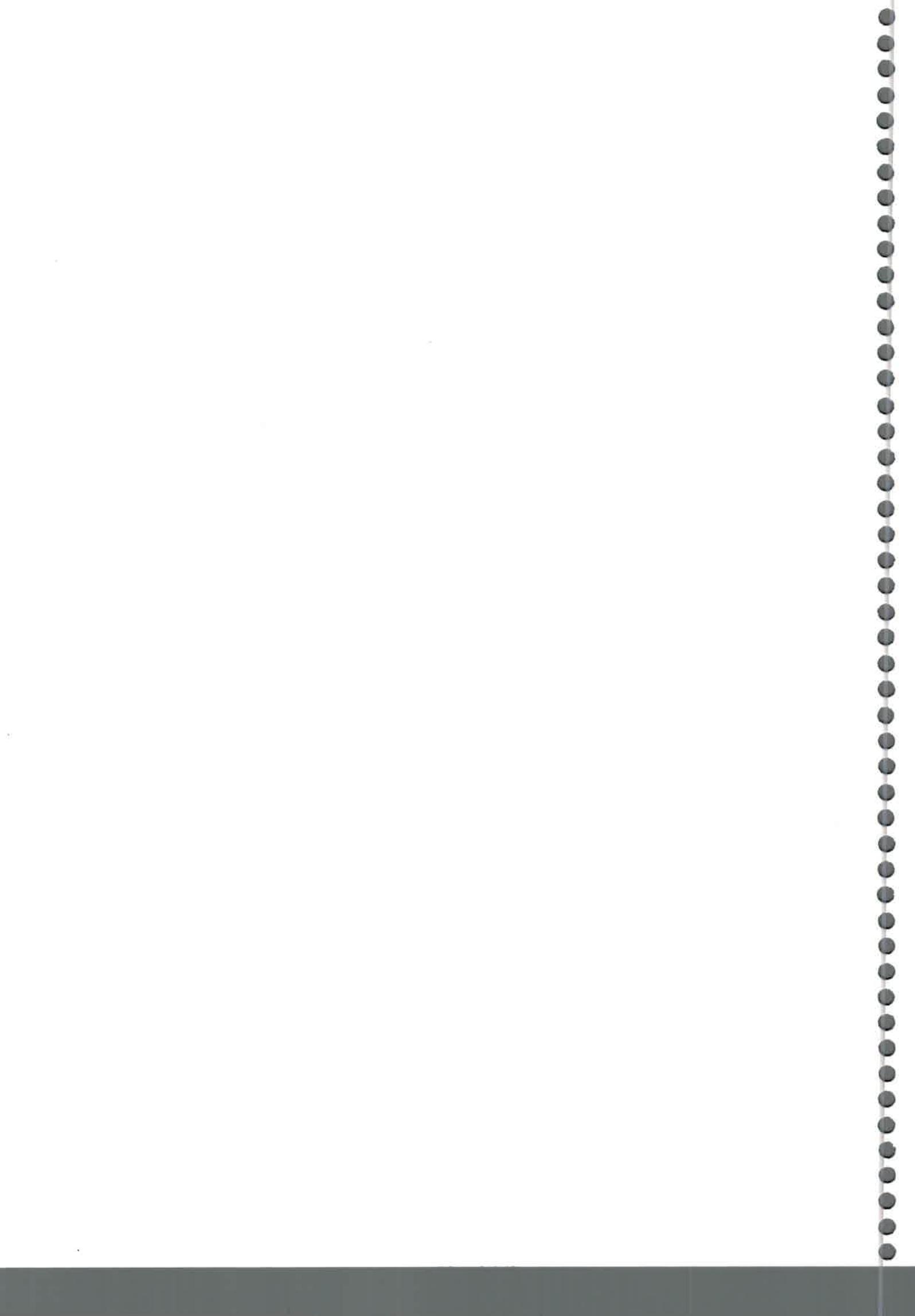
- acid purified from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. *The J. of Pharmacology and experimental therapeutics* **289**: 72-78.
- Larrondo, J.; Agut, M.; Calvo-Torras, M. 1995. Antimicrobial activity of essences from labiates. *Microbios* **82**(332): 171-172.
- Lee, S.; Kim, S.; Ahn, Y.; Kim, J.; Lee, B. 1997. Effectiveness of carvacrol derived from *Thujopsis dolabrata* var. Holdai Sawdust against *Thecodiplosis japonensis* (Diptera: Cecidomyiidae). *Pestic. Sci.* **42**: 119-124.
- Li, Y.; Ma, S.; Yang, Y.; Ye, S.; But, P. 2002. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. *J. of Ethnopharmacology* **79**: 365-368.
- Lin, Y.; Flavin, M.; Schure, R.; Chen, F.; Sidwell, R.; Bamard, D.; Huffmann, J.; Kem, E. 1999. Antiviral activities of bioflavonoids. *Planta Medica* **65**: 120-125.
- Mangena, T. 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential Oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Lett. Applied Microbiology* **28**(4): 291-296.
- Martínez, A. 2003. Aceites esenciales. Facultad Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín. Sitio en internet: www.muiscas.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.
- Mevy, J.; Bessiere, J.; Dherbomez, M.; Viano, J. 2002. Composition and some biological activities of the essential oils from an African Pasture Grass: *Elionurus elegans* Kunth. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 4240-4243.
- Mímica-Dukié, N.; Gasic, O.; Kite, G.; Fellow, L.; Jancic, R. 1991. A study of the Essential Oil of *Mentha longifolia* Growing in Yugoslavia. *Planta Medica* **57**, supplement Issue 2. Poster A 83-84.
- Miti, V.; Sinisa; 2000. Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* cultivated in Serbia. *Facta Universitatis. Serie: Physics, Chemistry and Technology* **2**: 105-108.

- Mongelli, E., Desmarchelier, C., Coussia, J., Ciccía, G. 1995. Actividad antimicrobiana e interacción con el ADN de plantas medicinales de la amazonia Peruana. *Rev. Arg. Microbiol.* **27**: 199-203.
- Mongini, C. y Waldner, C. 1996. Metodologías para la evaluación de las células inmunocompetentes. Cap. 36: 730-771. En *Inmunología e Inmunoquímica*. Margni, R. 5º ed. Edit. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Moraes, L.; Facanali, R.; Ortiz, M.; Ming, L.; Meireles, M. 2002. Phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **74**(1): 183-186.
- Mourey, A.; Canillac, N. 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* **13**: 289-292.
- Muñoz-Collazos, S.; Soriano-Ferrufino, G.; Collin, F.; Jean, F.; Deslauriers, H. 1993. Variability in the composition of the essential Oils of *Minthostachys andina* in Central Bolivia. *Phytochemistry* **33**: 123-127.
- Murillo Perea, E.; Viña Patiño, A. 1999. Determinación de constituyentes volátiles de la Albahaca (*Ocimum spp*) mediante dos métodos de Extracción. *Rev. Colombiana de Química* **28**(1). Sitio en internet: www.icfes.gov.co/revistas/recolqui.
- Núñez, C. y Cantero, J. 2000. Las plantas medicinales del sur de la provincia de Córdoba. Edit. de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Oliva, M.; Demo, M. y Zygadlo, J. 2001. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de plantas medicinales de la República Argentina. *Rev. Latinoamericana de Microbiología* **43** (1): 542.
- Ooi, L.; Wang, H.; Luk, C.; Ooi, V. 2004. Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae). *J. of Ethnopharmacology* **94**: 117-122.
- Pellecuer, J.; Allegrini, J.; De Buochberg, S. 1974. "Estude in vitro de l'activité antibactérienne et antifongique de l'essence de *Satureja montana* (Labiées). *J. Pharm. Belge* **29**(2): 137-144.
- Pellecuer, J.; Allegrini, J.; De Buochberg, S. 1976. Huiles essentielles bactéricides et fongicides. *Revue de l'Institut Pasteur, Lyon*, 2: 135-139.



- Pino, J.; Estarron, M.; Fuentes, V. 1997. Essential oil of thyme (*Thymus vulgaris* L.) grown in Cuba. *J. of Essential Oil Res.* **9**(5): 609-610.
- Pujol, C.; Coto, C.; Damonte, E. 1995. Determinación de la actividad antiviral de un xilomanano sulfatado de origen natural en distintas condiciones experimentales. *Rev. Arg. de Microb.* **27**: 91-98.
- Rastogi, B; Dhawan, B. 1990. Anticancer and antiviral activities in Indian Medicinal Plants. *Rev. Drug Develop. Res.* **19**: 1-12.
- Ratera, E. y Ratera, M. 1980. Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular. 1º ed. Edit. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires.
- Reed, L. S. and Muench, H. A. 1932. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* **27**: 493-497.
- Ricci, D.; Fraternali, D.; Giamperi, L.; Bucchini, A.; Epifanio, F.; Burini, G.; Curini, M. 2005. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *J. of ethnopharmacology* **98**: 195-200.
- Sabini, L. 1996. Caracterización del virus de la Pseudorrabia, cepa RC/79: Estudios dirigidos al control y/o prevención de la enfermedad. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Sabini, L.; Zanon, S.; Lara, L.; Torres, C.; Sutil, S.; Rovera, M.; Ramos, B. 2000. Study of *Pseudorabies virus*, RC/79 strain, virulence markers. *Rev. Latinoamericana de Microb.* **42**(3): 111-116.
- Saggese, D. 1959. Yervas medicinales argentinas. 10º ed.
- Sagrera-Ferrandiz, J. 1993. Plantas medicinales. 1º ed. Edit. Iatros, Colombia.
- Salgueiro, L.; Da Cunha, A.; Tomas, X.; Canigual, S.; Adzet, T.; Vila, R. 1997. The essential oil of *Thymus villosus* and its chemical polymorphism. *Flavour and Fragrance J.* **12**(2): 117-122.
- Schnitzler, P.; Schon, K.; Reichling, J. 2001. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against *Herpes simplex virus* in cell culture. *Pharmazie* **56**(4):343-347.
- Serkedjjeva, J. and Ivancheva, S. 1999. Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *J. of Ethnopharmacology* **64**(1): 59-68.

- Sökmen, A. 2001. Antiviral and cytotoxic activities of extracts from the cell cultures and respective parts of some Turkish medicinal plants. *Turk J. Biology* **25**: 343-350.
- Solís, P.; Wright, C.; Anderson, M.; Gupta, M.; Phillipson, J. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica* **59**: 250-252.
- Sotanaphun, U.; Lipipun, V.; Suttisri, R.; Bavovada, R. 1999. A new antiviral and antimicrobial sesquiterpene from *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Planta Medica* **65**(3): 257-258.
- Spesía, M. 2004. Aceite esencial de *Minthostachys verticillata*: su acción sobre la replicación de *Herpes suis tipo 1* en células Vero. Tesis para optar al título de Microbióloga. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Svoboda, K.; Hampson, J. 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Sitio en internet: www.ienica.net/specchemseminar/svoboda.
- Tassou, C.; Drosinos, E.; Nychas, G. 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems. *J. Applied Bacteriology* **78**(6): 593-600.
- Torres, A. 1996. Micotoxinas de *Alternaria* en girasol. Factores que afectan su producción y estudios preliminares de toxicidad. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Torres, C. 2004. Estudio de la actividad antifúngica de diferentes fracciones de *Minthostachys verticillata* frente a hongos de importancia clínica. Tesis Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Toursarkissian, M. 1980. Plantas medicinales de la Argentina. Sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica. 1º ed. Edit. Hemisferio Sur: 63-64.
- UICN, OMS and WWF. 1993. Directrices sobre conservación de plantas medicinales. Sitio en internet: www.wwf.org.uk/filelibrary/plantas_medicinales.



- Vanden Berghe, D.; Vlietinck, A.; Van Hoof, L. 1986. Plant products as potential antiviral agents. *Bull. Inst. Pasteur* **84**: 101-147.
- Vanden Berghe, D.; Vlietinck, A. 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Meth. in plants Biochemistry* **6**: 47-69.
- Vanella, J. 1964. Procedimientos y técnicas del laboratorio de virus. Instituto de Virología, Universidad Nacional de Córdoba.
- Visconti, A.; Sibila, A.; Sabia, C. 1992. *Alternaria alternata* from oilseed rape: mycotoxin production and toxicity to *Artemia salina* larvae and rape seedlings. *Mycotoxin Res.* **8**: 9-16.
- Wachsman, M.; Martino, V.; Gutkind, G.; Coussio, J.; Coto, C. y de Torres, R. 1982. Antiviral activity of a *Melia azedarach* plant extract. *Fitoterapia* **53**: 167-170.
- Xu, H.; Lee, S.; White, R.; Blay, J. 1999. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Res.* **44**(1): 43-54.
- Zabala, E. 2002. *Herpes suis*: su sensibilidad frente al extracto alcohólico y al aceite esencial de *Minthostachys verticillata*. Tesis para optar al título de Microbióloga. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Zanon, S.; Ceriatti, F.; Rovera, M.; Sabini, L.; Ramos, B. 1999. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Rev. Latinoamericana de Microb.* **41**(2): 59-62.
- Zhang, X.; Huang, C.; Qin, Q. 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral Res.* **61**: 93-99.
- Zunino, M.; Lopez, M.; Zygadlo, J. 2003. Medicinal plants of Argentina. Pharmacological properties and phytochemistry. *Adv. in Phytochemistry* **2**: 209-245.
- Zygadlo, J. and Juliani, H. 2003. Study of essential oil composition of aromatic plants from Argentina. *Recent Progress in Medicinal Plants*, **8**: 273-291.
- Zygadlo, J.; Maestri, D.; Lamarque, A.; Guzmán, C.; Velasco-Negueruela, A.; Pérez-Alonso, M.; García-Vallejos, M.; Grosso, N. 1996. Essential oil variability of *Minthostachys verticillata*. *Biochemical Systematics and Ecology* **24**(4): 319-323.



[www. herbotecnia.com.ar/aut-peperina.html](http://www.herbotecnia.com.ar/aut-peperina.html).

www.ics.trieste.it/EssentialOils/EssentialOil.aspx?ID=54

www.naturesgift.com/extraction.htm. Methods of Extracting Essential Oils.

www.plantasmedicinales.org/farmacognosia/sept2002/aceites_esenciales.htm.

Aceites esenciales.

07118

DE RIO CU

U. N. R. C.
Biblioteca Central



61159

61159

