

TORRES, CRISTINA VAN
Propiedades citogeno

2013

73195

73195



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,

FISICO-QUIMICAS Y NATURALES



“Propiedades Citogenotóxicas y Antivirales de Extractos de Especies del Género Baccharis”

MSc. Cristina Vanesa TORRES

Tesis para optar al Título de

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS 20127

Realizada en el Departamento de Microbiología e Inmunología
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Río Cuarto, 2013

Faint, illegible text at the top of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

Faint, illegible text in the middle section of the page.

73195

MFN:
Clasif:
T. 857

Este trabajo de tesis es presentado a la Escuela de Posgrado de la
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y
NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Para obtener el título de:

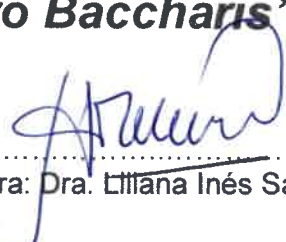
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por: Cristina Vanesa Torres

TEMA:

**“Propiedades Citogenotóxicas y Antivirales de
Extractos de Especies del Género Baccharis”**



Directora: Dra. Liliana Inés Sabini

Co-Directora: Dra. Silvia Matilde Zanon

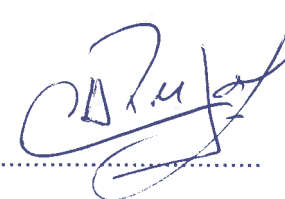
Área de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de
Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río
Cuarto.



Dra. Marcela KURINA SANZ



Dra. Graciela RACAGNI



Dr. Carlos PUJOL

Río Cuarto, 26 de julio de 2013

A María Cristina, una gran mujer... mi Madre...

A toda mi gran familia.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida y su presencia permanente en mi vida.

A la UNRC, donde se me permitió realizar toda mi formación académica.

A la Dra. Liliana Sabini por todo su conocimiento brindado para la realización de esta tesis. Gracias.

A la Dra. Silvia Zanon por toda su contribución en el desarrollo de esta tesis. Gracias.

A la Dra. Laura Comini por su colaboración en el desarrollo de los análisis químicos.

A las Dras Noelia Cariddi, Carola Sabini y Elina Reinoso por su colaboración con algunas experiencias de este estudio.

A los miembros del área de Virología: Sonia, Franco, Julia, José y Verónica.

A toda mi familia por su paciencia y afecto. Gracias.

A Marisa Galván por todos los momentos compartidos en el transcurso de esta tesis. Gracias.

A mis amigos por su compañía, consejo y afecto. Gracias.

A todos ellos, mi deseo de que la vida les devuelva con creces todo lo que hicieron por mí en este tiempo de realización de la tesis. Gracias!



INDICE

INDICE	i
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE DIAGRAMAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUCCION	1
1.1. Plantas medicinales y su utilización en la salud	1
1.1.1. Compuestos vegetales bioactivos	3
1.1.2. Compuestos naturales con acción antiviral	4
1.2. Flora medicinal del sur de Córdoba	6
1.2.1. Género <i>Baccharis</i>	6
1.2.1.a. Compuestos bioactivos obtenidos de especies de <i>Baccharis</i>	9
1.2.2. <i>Baccharis articulata</i> (Lamarck) Persoon	11
1.2.2.a. Usos medicinales	12
1.2.2.b. Propiedades bioactivas	13
1.3. Familia Herpesviridae	14
1.3.1. Características generales	14
1.3.2. Ciclo de replicación de los Herpesvirus	15
1.3.3. Virus <i>Herpes suis</i> tipo 1, cepa RC/79	18
1.3.4. Terapia antiviral	19
1.3.4.1. Avances en la quimioterapia antiviral	22
1.3.4.2. Inconvenientes en la terapia antiviral	22
1.4. Medicamentos herbarios	24
1.4. 1. Estudios de seguridad de medicamentos herbarios	25
1.5. Evaluación de Genotoxicidad: test de <i>Allium cepa</i> L.	26
1.5.1. Criterios de valoración del test de <i>Allium cepa</i> L.	27
1.6. Planteamiento del problema.	29
1.7. Hipótesis.	30
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo General	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. MATERIALES	33
3.1. Medios	33



3.1.1. Medio de Crecimiento para células Vero (MC)	33
3.1.2. Medio de Crecimiento (MC) para células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs)	33
3.1.3. Medio de Mantenimiento para células Vero (MM)	33
3.1.4. Medio para placas (MP)	33
3.1.5. Medio thioglicolato.....	33
3.2. Soluciones	34
3.2.1. Solución de ácido clorhídrico 1 N.....	34
3.2.2. Solución de agua mineral.....	34
3.2.3. Solución de azul tripán al 0,5%	34
3.2.4. Solución balanceada de fosfatos (PBS)	34
3.2.5. Solución de bicarbonato de sodio al 5%	35
3.2.6. Solución de buffer de lisis de ADN.....	35
3.2.7. Solución de cristal violeta.....	35
3.2.8. Solución destañadora de Rojo Neutro	35
3.2.9. Solución etanol absoluto: ácido acético glacial.....	35
3.2.10. Solución etanol 70°	36
3.2.11. Solución de gentamicina	36
3.2.12. Solución de glutamina	36
3.2.13. Solución de metil celulosa al 1,5 %.....	36
3.2.14. Solución de orceína aceto-acética	36
3.2.15. Solución de paracetamol 0,3 mg/ml.....	37
3.2.16. Solución de Rojo Neutro (RN)	37
3.2.17. Solución de rojo fenol al 0,5%.....	37
3.2.18. Solución de tripsina + EDTA 2X (solución stock)	37
3.3. Material biológico	38
3.3.1 Cultivos celulares	38
3.3.2. Material vegetal	38
3.3.3. Virus	38
3.3.4. Bulbos de <i>Allium</i> sp.	38
3.3.5. Material biológico humano	38
3.4. Reactivos.....	39
4. METODOS	41
4.1. Obtención de los extractos a partir de <i>Baccharis articulata</i>	41
4.2. Propagación y mantenimiento de la línea celular Vero.....	44
4.3. Ensayos de citotoxicidad.....	44
4.3.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)	44
4.3.2. Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC ₅₀) por	



	Indices
captación del Rojo Neutro	45
4.3.3. Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC ₅₀) por reducción de sales de tetrazolio (MTT)	46
4.4. Producción de stock del virus <i>Herpes suis</i> tipo 1.....	46
4.4.1. Titulación de la infectividad viral	47
4.5. Ensayos antivirales	47
4.5.1. Estudios de actividad antiviral de los extractos acuosos en distintas etapas del ciclo de replicación viral.....	47
4.5.1.a. Posterior a la adsorción y penetración viral	47
4.5.1.b. Sobre adsorción y penetración viral	49
4.5.2. Pre-tratamiento de los cultivos celulares con extractos acuosos	50
4.5.3. Actividad virucida con extractos acuosos	51
4.5.4. Determinación de la Concentración Efectiva 50% (CE ₅₀)	53
4.5.5. Cálculo del Índice de Selectividad	54
4.5.6. Determinación de la Inhibición del rendimiento viral.....	55
4.5.7. Determinación de la actividad antiviral de té de <i>B. articulata</i>	56
4.6. Estudio del potencial genotóxico de extracto acuosos caliente de <i>B. articulata</i>	57
4.6.1. Estudios <i>in vitro</i> : determinación de muerte celular por tinción y por fragmentación nuclear en linfocitos humanos	57
4.6.1.a. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC50) mediante tinción por exclusión al azul tripán.....	58
4.6.1.b. Tinción nuclear con Hoechst 33258 para la visualización de apoptosis en células mononucleares humanas.....	58
4.6.1.c. Ensayo de fragmentación de ADN	59
4.6.2. Estudio <i>in vivo</i> de citogenotoxicidad mediante el test de <i>Allium cepa</i> L.	60
4.6.2.a. Análisis de parámetros macroscópicos.....	63
4.6.2.b. Análisis de parámetros microscópicos.....	63
4.6.2.c. Registro de imágenes	64
4.7. Caracterización fitoquímica parcial de compuestos presentes en el extracto acuoso caliente de <i>B. articulata</i>	64
4.7.1. Ensayos preliminares de caracterización fitoquímica: técnicas cromatográficas y espectroscópicas.....	64
4.7.1.a. Reacción de Shinoda	65
4.7.1.b. Cromatografía en papel en dos dimensiones del EAC	65
4.7.1.c. Cromatografía en papel del EAC	66
4.7.1.d. Cromatografía en capa delgada	66
4.7.1.e. Determinación cuantitativa de ácido clorogénico en el EAC	67
4.7.2. Identificación y cuantificación por HPLC	68



	Indices
5. RESULTADOS Y DISCUSION	69
5.1. Obtención de extractos a partir de <i>Baccharis articulata</i>	69
5.2. Propagación y mantenimiento de la línea celular Vero.....	72
5.3. Ensayos de citotoxicidad.....	73
5.3.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)	73
5.3.2. Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC ₅₀) por captación del Rojo Neutro	76
5.3.2. Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC ₅₀) por reducción del MTT.....	84
5.4. Producción de stock del virus <i>Herpes suis</i> tipo 1.....	89
5.4.1. Titulación de la infectividad viral	90
5.5. Ensayos antivirales	91
5.5.1. Estudios de actividad antiviral de los extractos acuosos en distintas etapas del ciclo de replicación viral.....	91
5.5.1.a. Posterior a la adsorción y penetración viral	92
5.5.1.b. Sobre la adsorción y penetración viral	93
5.5.2. Pre-tratamiento de los cultivos celulares con extractos acuosos	95
5.5.3. Actividad virucida con extractos acuosos	96
5.5.4. Determinación de la Concentración Efectiva 50% (CE50)	97
5.5.5. Cálculo del Índice de Selectividad	100
5.5.6. Determinación de la Inhibición del rendimiento viral.....	101
5.5.7. Determinación de la actividad antiviral de té de <i>B. articulata</i>	103
5.6. Estudio del potencial genotóxico del extracto acuoso caliente de <i>B. articulata</i>	104
5.6.1. Determinación de muerte celular por tinción y por fragmentación nuclear en linfocitos humanos.....	104
5.6.1.a. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC50) mediante tinción por exclusión al azul tripán.....	104
5.6.1.b. Tinción nuclear con Hoechst 33258 para la visualización de apoptosis en células mononucleares humanas.....	106
5.6.1.c. Ensayo de fragmentación de ADN	107
5.6.2. Estudios in vivo de citogenotoxicidad mediante el test de <i>Allium cepa</i> L.....	110
5.6.2.a. Análisis de parámetros macroscópicos.....	112
5.6.2.b. Análisis de parámetros microscópicos.....	122
5.7. Caracterización fitoquímica parcial de compuestos presentes en el extracto acuoso caliente de <i>B. articulata</i>	135
5.7.1. Ensayos preliminares de caracterización fitoquímica: técnicas cromatográficas y espectroscópicas.....	135
5.7.2. Identificación y cuantificación por HPLC.....	136



	Índices
6. CONCLUSIONES	138
7. BIBLIOGRAFIA	139
8. PRODUCCION CIENTIFICA.....	155



TABLAS

Tabla 1: Compuestos activos extraídos de plantas medicinales con distintos solventes.....	4
Tabla 2: Extractos de distintas especies vegetales con actividad antiviral.....	5
Tabla 3: Actividades biológicas probadas de algunas especies del género <i>Baccharis</i>	8
Tabla 4: Extractos de especies de <i>Baccharis</i> con actividad antiviral.....	9
Tabla 5: Compuestos bioactivos identificados en especies del género <i>Baccharis</i>	10
Tabla 6: Características biológicas de los Herpesvirus	15
Tabla 7: Antivirales de uso clínico, aprobados por la FDA.	21
Tabla 8: Rendimiento de peso seco obtenido a partir de partes aéreas de <i>B. articulata</i> sometidas a extracción con solventes de diferentes polaridad.	69
Tabla 9: Valores de Maxima Concentración No Citotóxica determinados en células Vero para los extractos acuosos y los obtenidos con solventes orgánicos a partir de <i>B. articulata</i>	75
Tabla 10: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero tratadas con distintas concentraciones de EC de <i>B. articulata</i> , determinados por captación de RN.	77
Tabla 11: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero tratadas con distintas concentraciones de EH de <i>B. articulata</i> , determinados por captación de RN.....	77
Tabla 12: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero tratadas con distintas concentraciones de EM de <i>B. articulata</i> , determinados por captación de RN.....	78
Tabla 13: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero tratadas con distintas concentraciones de EAF de <i>B. articulata</i> , determinados por captación de RN.....	79
Tabla 14: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero tratadas con distintas concentraciones de EAC de <i>B. articulata</i> , determinados por captación de RN..	80
Tabla 15: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero tratadas con concentraciones de EAF de <i>B. articulata</i> , determinados por reducción de MTT..	84
Tabla 16: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero tratadas con concentraciones de EAC de <i>B. articulata</i> , determinados por reducción de MTT	85
Tabla 17: Correlación entre valores de viabilidad celular porcentual obtenidos por tres métodos diferentes empleando células Vero en monocapas.	87
Tabla 18: Inhibición de la multiplicación del virus <i>Herpes suis</i> tipo 1 por EAF y EAC de <i>B. articulata</i> incorporado a las células luego de la adsorción y penetración viral.....	92
Tabla 19: Inhibición de la multiplicación del virus <i>Herpes suis</i> tipo 1 por el EAF y EAC de <i>B. articulata</i> incorporados a las células durante la adsorción y penetración viral...	94
Tabla 20: Inhibición de la multiplicación del virus <i>Herpes suis</i> tipo 1 en células Vero pre-tratadas, en ensayos independiente, con EAF o EAC de <i>B. articulata</i>	95
Tabla 21: Acción virucida del EAF y EAC de <i>B. articulata</i> frente al virus <i>Herpes suis</i> tipo 1.	96
Tabla 22: Inhibición de la multiplicación del virus <i>Herpes suis</i> tipo 1 por EAC de	



	Índices
<i>B. articulata</i> , durante la adsorción, a dosis constante de virus.	99
Tabla 23: Porcentajes de Inhibición del rendimiento viral por EAC de <i>B. articulata</i>	102
Tabla 24: Inhibición de la multiplicación viral, durante la adsorción viral, por la infusión de <i>B. articulata</i>	103
Tabla 25: Efectos citotóxicos del extracto acuoso caliente (EAC) de <i>B. articulata</i> sobre PBMCs de humanos sanos determinado por el método de exclusión al azul de tripán.	104
Tabla 26: Valores promedio del número y longitud de raíces de <i>Allium cepa</i> L, y diferentes anomalías producidas luego del tratamiento durante 5 días con distintas concentraciones de EAC de <i>B. articulata</i>	113
Tabla 27: Valores promedio del número y longitud de raíces de <i>Allium cepa</i> L, y diferentes anomalías encontradas luego del tratamiento durante 2 días con distintas concentraciones de EAC de <i>B. articulata</i> y luego expuestas por 3 días a agua mineral, (ensayo de reversión).	114
Tabla 28: Valores de anomalías macroscópicas presentes en la raíces de <i>Allium cepa</i> L. tratadas durante 5 días con distintas concentraciones de EAC de <i>B. articulata</i>	118
Tabla 29: Comparación de valores porcentuales de anomalías macroscópicas presentes en la raíces de <i>Allium cepa</i> L. tratadas con distintas concentraciones del EAC de <i>B. articulata</i> durante 5 días y en ensayo de reversión.	121
Tabla 30: Valores de los parámetros microscópicos analizados en raíces de <i>Allium cepa</i> L. luego del tratamiento durante 2 días con distintas concentraciones de EAC de <i>B. articulata</i> , (IM1).	123
Tabla 31: Valores de los parámetros microscópicos analizados en raíces de <i>Allium cepa</i> L. luego del tratamiento durante 5 días con distintas concentraciones de EAC de <i>B. articulata</i> , (IM2).	124
Tabla 32: Valores de los parámetros microscópicos analizados en raíces de <i>Allium cepa</i> L. luego del tratamiento durante 2 días con distintas concentraciones de EAC de <i>B. articulata</i> y luego con 3 días de agua mineral (reversión), (IM3).	125
Tabla 33: Proporción peso en peso de cada componente identificado en el EAC de <i>B. articulata</i>	137



FIGURAS

Figura 1: Aspecto morfológico de la especie *Baccharis articulata*..... 11

Figura 2: Ciclo de replicación de los Herpesvirus. 17

Figura 3: Virus *herpes suis* tipo 1. Microscopía electrónica..... 19

Figura 4: Monocapa de células Vero sin infectar, normales. 72

Figura 5: Aspecto morfológico de células Vero y tratadas con extractos de *B. articulata*. 74

Figura 6: Aspecto morfológico de células Vero tratadas extractos acuosos de *B. articulata*. 75

Figura 7: Viabilidad porcentual de Células Vero tratadas con extractos de *B. articulata* por método de RN. 82

Figura 8: Viabilidad porcentual de Células Vero tratadas con extractos acuosos de *B. articulata* por método de RN. 83

Figura 9: Viabilidad porcentual de Células Vero tratadas con extractos acuosos de *B. articulata*, por método de MTT..... 86

Figura 10: Células Vero infectadas con virus *Herpes suis* tipo 1, cepa RC/79. 90

Figura 11: Placas de lisis producidas por el *Herpes suis* tipo 1 en células Vero..... 91

Figura 12: Actividad antiviral de EAC de *B. articulata* en células Vero y frente a virus *Herpes suis* tipo 1..... 98

Figura 13: Inhibición viral porcentual del EAC de *B. articulata* frente al virus *Herpes suis* tipo 1. 99

Figura 14: Inhibición del rendimiento viral a una multiplicidad de infección de 0,1 del virus *Herpes suis* tipo 1, por el tratamiento con EAC de *B. articulata*, durante la adsorción y penetración viral. 101

Figura 15: Inhibición del rendimiento viral (%), a distintas MOI, con EAC de *B. articulata* 102

Figura 16: Microfotografías de PBMCs de humanos sanos teñidas con azul de tripán, post-incubación durante 18-24 al EAC de *B. articulata*. 105

Figura 17: Porcentaje de viabilidad de PBMCs humanas in vitro frente a diferentes concentraciones del EAC de *B. articulata*..... 105

Figura 18: Microfotografías de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) teñidas con Hoechst 33258 107

Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa mostrando la fragmentación del ADN de linfocitos humanos sanos, tratados con el EAC de *B. articulata*. 108

Figura 20: Aspecto morfológico de raíces de *Allium* cepa L. expuestas al EAC de *B. articulata* durante 5 días 117

Figura 21: Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de *Allium* cepa L. inducido por distintas concentraciones del EAC de *B. articulata* aplicado durante 5 días consecutivos. 118



Figura 22: Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de <i>Allium cepa</i> L. Inducido por distintas concentraciones del EAC de <i>B. articulata</i> aplicado durante 2 días y luego sometidas a depuración por 3 días con agua mineral (Reversión).	120
Figura 23: Comparación entre la longitud de raíces de bulbos de <i>Allium cepa</i> L., expuestas a distintas concentraciones de EAC de <i>B. articulata</i> durante 5 días vs aquellas tratadas por 2 días y luego sometida a depuración por 3 días con agua mineral (reversión).	120
Figura 24: Células meristemáticas de raíces de <i>Allium cepa</i> L. en interfase y en diferentes estadios de la división celular presentes en el sistema control negativo.....	126
Figura 25: Valores porcentuales de índice de fases de células en división tratadas con el EAC de <i>B. articulata</i> por 48 h (IM1), respecto del control negativo, determinados por test de <i>Allium cepa</i> L.....	128
Figura 26: Valores porcentuales de índice de fases de células en división tratadas con el EAC de <i>B. articulata</i> por 5 días (IM2), respecto del control negativo, determinados por test de <i>Allium cepa</i> L.....	129
Figura 27: Valores porcentuales de índice de fases de células en división tratadas con el EAC de <i>B. articulata</i> por 2 días y luego por reversión (IM3), respecto del control negativo, determinados por test de <i>Allium cepa</i> L.	130
Figura 28: Valores de Índice Mitótico porcentuales respecto del control negativo obtenido para el EAC de <i>B. articulata</i> en distintos tratamientos por test de <i>Allium cepa</i> L.....	131
Figura 29: Células meristemáticas de raíces de <i>Allium cepa</i> L., destruidas a consecuencia de la exposición a concentraciones superiores de 1,2 mg/ml de EAC de <i>B. articulata</i>	132
Figura 30: Micronúcleo en Interfase de células meristemáticas de raíces de <i>Allium cepa</i> L. expuestas a concentraciones superiores a 1,2 mg/ml de EAC de <i>B. articulata</i>	133
Figura 31: Anafase con fragmentación cromosómica inducida por el tratamiento con 0,3 mg/ml de Paracetamol.	135
Figura 32: Cromatograma del EAC de <i>B. articulata</i> comparado con compuestos testigos.	137



DIAGRAMAS

Diagrama 1: Obtención de extractos n-hexánico, clorofórmico y metanólico de *B. articulata*42

Diagrama 2: Obtención de extractos acuosos de *B. articulata*43

Diagrama 3: Ensayo de actividad antiviral post-adsorción y penetración viral, de extracto acuoso a su MCNC48

Diagrama 4: Ensayo de actividad antiviral durante la adsorción y penetración viral, de extracto acuoso a su MCNC.....50

Diagrama 5: Ensayo de tratamiento celular con el extracto acuoso, previo a la infección viral.....51

Diagrama 6: Ensayo de la acción virucida de los extractos acuosos.52

Diagrama 7: Ensayo de la actividad antiviral para la determinación de la CC₅₀ por EAC.....54

Diagrama 8: Ensayo de la Inhibición del rendimiento viral durante la adsorción viral por el EAC.56

Diagrama 9: Ensayo *in vivo* de la evaluación del potencial citogenotóxico del EAC de *B. articulata* mediante el Test de *Allium cepa* L.....62



ABREVIATURAS

%; Porcentaje

µg: Microgramo

µl: Microlitro

A: Anafase

ADN: Acido desoxirribonucleico

ANMAT: Administracion Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica

ARN: Acido ribonucleico

c.s.p.: Cantidad suficiente para

CC₅₀: Concentración Citotóxica 50

CD: Células destruidas

CE₅₀: Concentración Efectiva 50

CIEIS: Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad optica

DS: Desviación estándar

EAC: Extracto acuoso obtenido en caliente

EAF: Extracto acuoso obtenido en frío

EC: Extracto clorofórmico

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

EH: Extracto n-hexánico

EM: Extracto metanólico

FC: Fragmentación cromósomica

g: Gramo

Ga: Ganchos

h: Hora

HPLC: Cromatografía lliquida de alta eficacia

IF: Indice de fase

IM: Indice mitótico

IT: Índice de toxicidad

M: Metafase

M: Molar

mARN: Acido ribonucleico mensajero



- MC: Medio de crecimiento
MCNC: Máxima concentración no citotóxica
mg: Miligramo
min: Minutos
ml: Mililitro
MM: Medio de mantenimiento
mm: Milímetro
MN: Micronucleos
MPC: Muerte celular programada
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
Ne: Necrosis
nm: Nanómetro
Nº: Número
°C: Grado centígrado
OMS: Organización Mundial de la Salud
p/p: Peso en peso
p/v: Peso en volumen
P: Profase
PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica (del inglés "Peripheral blood mononuclear cells")
PBS: Solución balanceada de fosfatos
PRV: Virus de la Pseudorrabia
RCV: Río Cuarto Vasculares
RN: Rojo Neutro
RPMI: Roswall Park Memorial Institute
SDS: Dodecilsulfato sódico
SF: Solución fisiológica
SFB: Suero fetal bovino
T: Telofase
Tu: Tumor
UV: Ultravioleta
vs: Versus
δ: Densidad



Resumen

Las infecciones virales han representado en la historia de la humanidad un problema sanitario importante. Aquellas enfermedades producidas por miembros de la familia Herpesviridae ganan particular atención debido a las características de estos virus de establecer latencia en sus huéspedes naturales y recurrencia en aquellos sometidos a situaciones de estrés o con inmunocompromiso. A nivel veterinario cobra relevancia el virus *Herpes suis* tipo 1 también conocido como virus de la pseudorabia (VPR), pues se asocia con abortos prematuros, alta tasa de mortalidad en lechones y disminución de la camada en cerdas madres infectadas. No existen para esta patología vacunas disponibles aplicables en Argentina, por lo que el control se limita a prácticas de manejo que pueden incluir la aplicación de drogas de origen natural. La especie *Baccharis articulata* "carqueja" es muy utilizada en la medicina tradicional y en las industrias productoras de bebidas amargas y es relativamente abundante y típica de las serranías cordobesas. El propósito de esta investigación fue asignar la actividad biológica de extractos obtenidos a partir de *B. articulata* utilizando bioensayos seleccionados para la detección de sus propiedades antiherpéticas, su posible blanco de ataque en el ciclo de la replicación del virus y su toxicidad general.

De cinco extractos obtenidos de la especie, el *screening* de acción antiviral reveló que el extracto acuoso obtenido en caliente (EAC) fue el más bioactivo frente al virus VPR, cepa RC/79. El extracto mostró valores de CC_{50} de 718 $\mu\text{g/ml}$ y 538 $\mu\text{g/ml}$ por las técnicas de captación de Rojo Neutro (RN) y reducción de MTT en células Vero, respectivamente. El estudio del mecanismo de acción antiviral del EAC empleado a 600 $\mu\text{g/ml}$ reveló que solo la adsorción y/o penetración viral fue inhibida en un 54 %. La CE_{50} , determinada por reducción de placas de lisis, fue de 445 $\mu\text{g/ml}$, permitiendo el cálculo de índices de selectividad de 1,61 (RN) y 1,21 (MTT). El EAC empleado a 600 y 1200 $\mu\text{g/ml}$ también ejerció acción virucida del orden de 78 % y 96 %, respectivamente a 37°C durante 2 h.

Estudios complementarios de inocuidad se realizaron por ensayos *in vitro* evaluando citotoxicidad por tinción con azul de tripan en células mononucleares de sangre periférica de humanos sanos, por evaluación de apoptosis mediante la tinción de Hoechst 33258 y fragmentación de ADN. También fueron realizados estudios de evaluación de citogenotoxicidad por ensayos *in vivo* desarrollando el test de *Allium* cepa L. Todos los ensayos revelaron inocuidad del EAC a las concentraciones activas frente al virus.

Mediante técnicas cromatográficas en papel, en capa delgada y por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) pudieron identificarse y cuantificarse en el EAC de *B. articulata* cuatro componentes mayoritarios: quercetina, acacetina, ácido clorogénico y luteolina, los que podrían ser los responsables de su acción antiviral.



Summary

Viral infections have been a major health problem in the history of humanity. The diseases caused by Herpeviridae family members involve special attention due to their characteristics of establishing latency in their natural hosts and recurrence in undergoing stress or immunocompromised hosts. *Herpesvirus suis* type 1, also known as pseudorabies virus (PRV), becomes relevant in veterinary. It is associated with premature abortions, high mortality in piglets and decreased in swine production. There are no vaccines available in Argentina, so the control is limited to handling practices which may include natural drugs application. *Baccharis articulata* ("carqueja") is relatively abundant and typical from Córdoba hills and it is widely used in traditional medicine and bitter drinks production. The aim of this research was to study the biological activity of extracts obtained from *Baccharis articulata* using bioassays to detect antiherpetic properties, the possible mode of action in the PRV infection cycle and the general toxicity of these extracts.

Antiviral action screening of the five extracts obtained from this vegetable specie revealed that the hot aqueous extract (HAE) was the most bioactive against the PRV virus, strain RC/79. This extract had CC_{50} values of 718 $\mu\text{g/ml}$ and 538 $\mu\text{g/ml}$ on Vero cells by Neutral Red Uptake (NR) and MTT assays, respectively. The antiviral action mechanism study of HAE (600 $\mu\text{g/ml}$) revealed a 54 % inhibition of viral adsorption and/or viral penetration. The 50 % effective concentration of the extract for PRV plaque formation was determined at 445 $\mu\text{g/ml}$, and selectivity index were 1.61 (NR) and 1.21 (MTT). The HAE at 600 and 1200 $\mu\text{g/ml}$ also inactivated the virus at 37°C° for 2 h in an order of 78 % and 96 %, respectively.

Complementary safety studies were performed for in vitro assays of cytotoxicity by trypan blue staining on peripheral blood mononuclear cells of healthy humans, apoptosis by staining with Hoechst 33258 and DNA fragmentation. Studies were also performed by citogenotoxicity in vivo assays using *Allium cepa* L test. All the assays revealed that active concentrations against the virus of EAC were safe.

Paper chromatographic techniques, thin-layer and high performance liquid chromatography (HPLC) allowed the identification and quantification of four major components EAC of *B. articulata*: quercetin, acacetina, chlorogenic acid and luteolin, which could be responsible for the antiviral action described.

Introducción



1. INTRODUCCION

1.1. Plantas medicinales y su utilización en la salud.

Las plantas han servido a la humanidad como recurso de agentes medicinales desde épocas inmemorables, constituyendo prácticamente la única fuente de obtención de medicinas en las primeras etapas del desarrollo de la humanidad.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) “*todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención de la salud, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales*” es conceptualizado como medicina tradicional, [OMS, 2005].

Por tradición popular o por investigación científica, se considera planta medicinal a aquella que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica. Además, para los científicos estas plantas pueden producir sustancias que sirven como precursoras para la semisíntesis química-farmacéutica. Estos vegetales se utilizan tradicionalmente como infusiones, decocciones, extractos fluidos, jarabes, extractos secos, cápsulas, comprimidos, [Núñez y Cantero, 2000; OMS, 2005; Cañigual y col., 2003].

Es la Etnofarmacología la ciencia que tiene como objetivo estudiar el conocimiento compilado de los indígenas acerca de la utilización de productos vegetales con el fin de prevenir, atenuar o curar un estado patológico. Recién cuando se comprueba científicamente el efecto curativo de las drogas o extractos vegetales pueden ser indicados por el médico, [Cañigual y Vila, 1998; Cañigual y Vila, 2001; Mangiaterra, 2005].

El avance de la ciencia, en especial la Biotecnología y la Bioquímica Molecular, ha permitido conocer más acerca de los principios activos de las plantas medicinales y su actividad en el organismo y así lograr validar los usos de las diversas especies vegetales. Como ejemplos se pueden citar los alcaloides quinina y cinchonina aislados a partir de la corteza de cinchona. En 1826, se obtiene la morfina a partir del opio (*Papaver somniferum* L.) y en 1831 se aísla la atropina de la planta *Atropa belladonna* L., [Alonso, 2002; Chattopadhyay y Naik, 2007].

En la actualidad el 60% de los medicamentos disponibles en el mercado con acción antimicrobiana y antitumoral deriva de plantas superiores, [Calixto, 2000].

De la totalidad de las especies vegetales existentes en el planeta, aproximadamente 260.000, se considera que sólo el 10% se encuentra registrada en los



tratados médicos de fitoterapia. En Argentina más de 2.000 especies vegetales autóctonas son empleadas regionalmente por la medicina tradicional y en muy pocas de ellas se han avalado científicamente sus propiedades terapéuticas, [Lucas y Bonnacarrère, 2005].

En los años 60 la OMS reconoce el uso de las plantas medicinales autóctonas como medicina tradicional o folclórica y provoca un gran impulso en la investigación hacia la búsqueda y estudios de la estructura molecular y función de sus metabolitos. En 1978 también incentiva a los gobiernos a incorporar los aspectos favorables de la medicina tradicional a la salud primaria dado que su utilización es muy accesible en países con bajos ingresos económicos, [Ratera y Ratera, 1980; Hammer y col., 1999; Núñez y Cantero, 2000; Mangiaterra, 2005].

El 25% de los medicamentos utilizados en los países desarrollados derivan de vegetales, mientras que en los países en vías de desarrollo el 75% de la población aún depende de la medicina tradicional o folclórica. Sin embargo esos valores en la actualidad se han incrementado. Así la OMS indicó que en África el consumo alcanza al 80% de la población, en China la atención sanitaria depende en un 40% de productos herbarios, siendo utilizada por el 70% de la población canadiense, el 40% en USA e Inglaterra y el 75% en Francia. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) informó que el consumo de productos vegetales en Chile alcanza al 71% y en Colombia al 40%, [OMS, 2005; Barboza y col., 2009].

En los últimos 30 años en Argentina se incrementó el interés por el consumo y el estudio de plantas medicinales y/o productos derivados, evidenciándose su disponibilidad en farmacias, herboristerías, dietéticas e industria licoreras. Estos vegetales se emplean para la elaboración de productos medicinales, cosméticos, aromaterapia, yerbas mate, destilerías de amargos y aperitivos. Además, la situación socioeconómica por la que transita nuestro país conduce, al igual que a otros países en desarrollo, a un aumento en la utilización de la medicina tradicional o alternativa para el cuidado primario de la salud, [Mangiaterra, 2005; Martínez, 2005; Pochettino y col., 2008].

De las 10.000 especies vegetales que son utilizadas por la medicina tradicional en el mundo la mayoría proviene de países americanos. Se ha informado que en el año 2001 el mercado mundial de las plantas medicinales representó el 5% del mercado farmacéutico alcanzando un total de U\$S 12.000 millones. En Argentina el impacto económico de la medicina tradicional es aún desconocido, [Cañigual y col., 2003].

Martínez I. (2005), indica que las especies *Baccharis articulata*, *Equisetum giganteum* y *Lippia turbinata*, representan las de más alta demanda comercial (77 y



127 Kg/año) cuando se refieren al departamento de Santa María de la provincia de Córdoba, Argentina.

1.1.1. Compuestos vegetales bioactivos

El interés en las plantas medicinales tiene su fundamento en que ellas proveen un arsenal de drogas con diversas actividades biológicas que pueden ser aisladas a través de distintos métodos de extracción. Muchos de los compuestos químicos identificados son metabolitos secundarios de importancia farmacéutica por su acción antibacteriana, inmunomoduladora, antiviral, antifúngica, insecticida, entre otras, [Bagci y Digrak, 1996; Cowan, 1999; Briskin, 2000; Park, 2003]. Estas moléculas son productos del metabolismo vegetal que no intervienen en los procesos bioquímicos de adaptación a condiciones físicas o químicas, crecimiento ni reproducción de la planta, pero sí cumplen funciones de defensa, regulación y/o señalización química, [Mongelli y Pomilo, 2002; Mongelli y col., 2009].

Entre los fitoquímicos bioactivos hoy conocidos se encuentran: fenoles, polifenoles, quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, cumarinas, terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, taninos, saponinas, lectinas, lignanos, polipéptidos y glucósidos, [Jassim y Naji, 2003, Vicent Martínez, 2004]. Estos compuestos, una vez identificados, pueden ser sintetizados químicamente en el laboratorio como es el caso de la vincristina (utilizada en el tratamiento de la leucemia) pero con menor eficiencia en su actividad respecto a la natural. Por el contrario, otros como la digitoxina (cardiotónico y antiarrítmico) no pueden hasta el momento ser producidos *in vitro*, [Lozoya, 1997; Núñez y Cantero, 2000].

La búsqueda inicial de compuestos activos para evaluar la actividad antimicrobiana de las plantas, comienza con el empleo de extractos acuosos y alcohólicos seguido de extracciones con solventes de distinta polaridad, tal como se presenta en la **Tabla 1**. En las extracciones acuosas en particular, los compuestos fenólicos o glicósidos aislados más frecuentemente son polisacáridos, polipéptidos y lectinas. Los terpenoides podrían también encontrarse en la fase acuosa, aunque es factible también su extracción con solventes menos polares, [Cowan, 1999].



Tabla 1: Compuestos activos extraídos de plantas medicinales con distintos solventes

Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Diclorometano	Eter	Acetona
Antocianina	Taninos	Antocianina	Terpenoides	Terpenoide	Alcaloide	Flavonoides
Almidón	Polifenoles	Terpenoide	Flavonoides		Terpenoide	
Saponina	Poliacetilenos	Saponina			Cumarina	
Terpenoide	Flavonoles	Taninos			Ácidos	
Polipéptido	Terpenoides	Flavonoides			grasos	
Lectina	Esteroles	Polifenoles				
	Alcaloides					
	Propóleos					

Adaptado de Cowan, "Plant products as antimicrobial agents". *Clinical Microbiology Reviews*. 1999.

1.1.2. Compuestos naturales con acción antiviral

Numerosas publicaciones informan acerca de una gran diversidad de plantas medicinales que por los métodos extractivos anteriormente mencionados, exhiben actividad antiviral. La siguiente tabla presenta algunos ejemplos de especies vegetales con capacidad antiviral contra virus *Herpes simplex tipo 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2)*.



Tabla 2: Extractos de distintas especies vegetales con actividad antiviral

Extracto	Especie vegetal	Agente viral	Referencia
Acuoso	<i>Phyllanthus orbicularis</i>	VHS-1	García y col., 2003.
	<i>Phyllanthus orbicularis</i>	VHS-2	Del Barrio y Parra, 2000.
	<i>Geranium sanguineum</i>	VHS-1 y VHS-2	Serkedjieva y Ivancheva, 1999
	<i>Carissa edulis</i>	VHS-1 y VHS-2	Tolo y col., 2006.
	<i>Polygonum punctatum</i> <i>Lithraea lithraea</i> <i>Brasiliensis sebastiania</i> <i>Sebastiania klotzschiana</i>	VHS-1	Kott y col., 1998.
	<i>Salvia officinalis.</i>	VHS-1 y VHS-2	Schnitzler y col., 2008
	<i>Aloysia gratissima</i>	VHS-1	Montanha y col., 2004.
	<i>Beta vulgaris</i>	VHS-2	Betancur-Galvis y col., 1999.
Etanólico	<i>B accharis erioclada</i> DC., <i>Baccharis megapotamica</i> , <i>Baccharis uncinella</i> DC., <i>Glechon marifolia</i> , <i>Glechon spathulata</i> , <i>Ilex brevicuspis</i> , <i>Ilex theezans</i> , <i>Maytenus ilicifolia.</i>	VHS-1	Montanha y col., 2004.
	<i>Salvia officinalis</i>	VHS-1 y VHS-2	Schnitzler y col., 2008.
	<i>Callisia grasilis</i>	VHS-2	Betancur Galvis y col., 1999.
	<i>Aglaiá odorata</i> , <i>Moringa oleifera</i> , <i>Ventilago denticulata.</i>	VHS-1	Lipipun y col., 2003.
Metanólico	<i>Astilbe rivularis</i> , <i>Bergenia ciliata</i> , <i>Cassiope fastigiata</i> , <i>Thymus linearis.</i>	VHS-1	Rajbhandari y col., 2007.
	<i>Holoptelia integrifolia</i> , <i>Nerium indicum</i>	VHS-1	Rajbhandari y col., 2001.
	<i>Maclura conchichinensis</i>	VHS-2	Bunyapraphatsara y col., 2000.
	<i>Hypericum mysorense</i> , <i>Hypericum hookerianum</i>	VHS-1	Vijayan y col., 2004.
	<i>Annona sp.</i>	VHS-2	Betancur-Galvis y col., 1999.
Acetona	<i>Usnea complanta.</i>	VHS-1	Vijayan y col., 2004.



1.2. Flora medicinal del sur de Córdoba

La región sur de la provincia de Córdoba se caracteriza por poseer una variada y abundante flora autóctona, favorecida por el clima de la zona. Existen en ella alrededor de 400 especies (aproximadamente el 75% son nativas), de las cuales más de 140 presentan actividad farmacológica potencial y con uso comprobado en la región. Las familias *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Verbenaceae* y *Solanaceae* constituyen el 43% de esa flora medicinal, siendo la familia *Asteraceae* la más abundante en especies medicinales.

Además, es interesante destacar que un alto porcentaje de las plantas medicinales tienen cierta exclusividad ambiental en su distribución, característica particularmente importante para la zona serrana. Esta estrecha relación plantea la necesidad de un mantenimiento del hábitat respecto a este recurso ya que su destrucción implicaría la pérdida irreversible de muchas especies.

Las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética utilizan muchas de estas hierbas, como lo son: la carqueja (*Baccharis articulata*), la peperina (*Minthostachys verticillata*), el tomillo (*Hedeoma multiflora*), el poleo (*Lippia turbinata*), el cedrón (*Aloysia citriodora*), el incayuyo (*Lippia intergrifolia*) y el boldo (*Peumus boldus*). Además, son las más empleadas para la elaboración de jugos, bebidas amargas, yerbas compuestas, té de hierbas, y medicaciones no recetadas. La carqueja se encuentra en el 12% de los productos herbales utilizados, seguida por poleo (11%) y el incayuyo (7%), siendo la manzanilla (*Matricaria chamomilla*) la de mayor uso con un 15%. Además, la carqueja se incluye en el 70% de las bebidas amargas no alcohólicas, en un 9% en medicamentos no recetados, en 6% de té herbales y en un 20% de yerbas mate compuestas, [Nuñez y Cantero, 2000; Juliani y col., 2007; Barboza y col., 2009].

1.2.1. Género *Baccharis*

El género *Baccharis* pertenece a la familia *Asteraceae*, esta familia probablemente es la más grande de todo el mundo y se encuentra distribuida en todo el planeta. El género está constituido por aproximadamente 400 a 500 especies de las cuales unas 100 crecen en Argentina. El nombre genérico de la planta, *Baccharis* proviene del latín Bacchus = Baco, el dios romano del vino y la vendimia, haciendo referencia al aroma a especias de las raíces. Las especias eran postres que en la antigüedad se consumían acompañados de vino, por ello la vinculación con esta deidad pagana, [Mangiaterra, 2005].



En nuestro país, el género *Baccharis* es uno de los más importantes en número de especies utilizadas por la medicina tradicional, generando un gran impacto comercial debido sus actividades biológicas, [Baboza y col., 2009].

A continuación se presentan algunas especies pertenecientes al género *Baccharis* y sus actividades biológicas estudiadas por diferentes investigadores, (Tabla 3).

Tabla 3: Actividades biológicas probadas de algunas especies del género *Baccharis*.

Especie	Propiedades biológicas / Referencia bibliográfica
<i>Baccharis articulata</i>	Antioxidante [De Oliveira, y col., 2003; Abad y Bermejo, 2007; Freire y col., 2007; Vieira y col., 2011] antiinflamatoria [Abad y Bermejo, 2007], antiviral [Zanon y col., 1999; Abad y col., 1999], digestiva y protectora hepática [Palacios y col., 1999, Alonso y Desmarchelier, 2006], antiespasmódica [Juliani y col., 2007]; antiséptico [Alonso y Desmarchelier, 2006], antifúngica [Vivot Lupi y col., 2009], antiproliferativa [www.homeopatia.com.mx/congreso26]
<i>Baccharis boliviensis</i>	Antibacteriano y alelopático [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis conferta</i>	Espasmolítico y antibacteriano [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis cordifolia</i>	Antiviral y antioxidante [Mongelli y col., 1997], citotóxico y insecticida [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis crispa</i>	Antibiótico, antimicrobiano y antioxidante [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis genistelloides</i>	Antiviral [Abad y col., 1999; Freire y col., 2007], gastroprotector [Freire y col., 2007], antiartrítico, hipoglucémico e hipotriglicéridémico [Coelho y col., 2004]
<i>Baccharis grisebachii</i>	Antimicrobiano [Hadad y col., 2007; Freire y col., 2007], antioxidante [Tapia y col., 2004]
<i>Baccharis heterophylla</i>	Antimicrobiano y espasmolítico [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis megapotamica</i>	Antileucémico, antibiótico, antiinflamatorio y analgésico [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis nítida</i>	Antibacteriano [Rangel y col., 2001]
<i>Baccharis notoserghila</i>	Antibiótico y antimicrobiano [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis pedunculata</i>	Antifúngico [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis pentlandii</i>	Gastroprotector y antiviral [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis serrifolia</i>	Antiespasmódico [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis teindalensis</i>	Antiviral, antiúlceras y antidiarreico [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis tola</i>	Antibacteriano y antiinflamatorio [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis trimera</i>	Vasodilatador, moluscicida, antimutagénico y hepatoprotector [Freire y col., 2007]
<i>Baccharis trinervis</i>	Antiviral [Abad y col., 1999; Sánchez Palomino y col., 2002; Freire y col., 2007], antiinflamatorio y antioxidante [Freire y col., 2007], antifúngico [Marín Ocampo y col., 2006]



1.2.1.a. Compuestos bioactivos obtenidos de especies de *Baccharis*

Numerosas investigaciones en el estudio de compuestos bioactivos se han realizado con distintas especies vegetales de este género, demostrando que pueden servir para la producción de nuevos medicamentos. El género provee de una rica fuente de componentes bioactivos, principalmente de flavonas, flavonoides, polifenoles, diterpenos y tri-terpenos, lo que constituye un gran potencial para la generación de productos herbales, [Verdi y col., 2005; Juliani y col., 2007]. En cuanto a la acción antiviral se pueden mencionar ejemplos obtenidos de distintas especies, (Tabla 4).

Tabla 4: Extractos de especies de *Baccharis* con actividad antiviral.

Especie	Extracto	Virus	Referencia
<i>B. articulata</i>	etanólico	<i>Herpes suis</i>	Zanon y col., 1999.
<i>B. crispa</i>	etanólico	de la <i>Estomatitis Vesicular</i>	Wachsman y col., 1988.
<i>B. erioclada</i>	acuoso, etanólico e hidroetanólico	<i>Herpes simplex</i> tipo 1	Montanha y col., 2004.
<i>B. megapotanica</i>	etanólico, hidroetanólico	<i>Herpes simplex</i> tipo 1 y 2 <i>Herpes simplex</i> tipo 1	
<i>B. uncinella</i>	etanólico, hidroetanólico	<i>Herpes simplex</i> tipo 1 y 2 <i>Herpes simplex</i> tipo 1	
<i>B. genistelloides</i>	acuoso	<i>Herpes simplex</i> tipo 1 y de la <i>Estomatitis Vesicular</i>	Abad y col., 1999.
<i>B. trimera</i>	acuoso	<i>Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)</i>	Abdel Malek y col., 1996.
<i>B. trinervis</i>	acuoso	<i>Herpes simplex</i> tipo 1 y VIH	Sánchez Palomino y col., 2002

Distintos compuestos químicos han sido identificados como los principios activos de especies del género *Baccharis* que ejercen algunas actividades biológicas, reconocidas, (Tabla 5).

Tabla 5: Compuestos bioactivos identificados en especies del género *Baccharis*

Especie del genero <i>Baccharis</i>	Actividad Biológica	Extracto / Fracción	Compuestos Identificados	Referencia
<i>B. articulata</i>	antioxidante	Fracción butanólica de un Extracto acuoso	Ball (4'-O-beta-D-glucopyranosyl-3',5-dimethoxybenzyl-cafeato)	<i>De Oliveira y col., 2003</i>
<i>B. crispa</i> <i>B. notoserghila</i> <i>B. rufescens</i> <i>B. medulosa</i>	antibacteriana	Extracto etanólico y aceite esencial	Flavonoides: genkwanina y apigenina	<i>Verdi y col., 2005</i>
<i>B. darwinii</i>	fungicida	Extracto de éter de petróleo	Cumarinas: 5'-hydroxy aurapteno, aurapteno y 5'-oxaurapteno	<i>Kurdelas y col., 2010</i>
<i>B. dracunculifolia</i>	antitumoral	propóleos	Ácidos cinámico y cafeico	<i>Búfalo y col., 2010</i>
<i>B. dracunculifolia</i>	antiviral	propóleos	Ácidos cinámico y cafeico	<i>Búfalo y col., 2009</i>
<i>B. grisebachii</i>	antifúngica		derivados de ácido cumárico 3,5-diprenyl-p-cumárico, diterpeno: Labda-7, 13E-dien-2beta,15-diol	<i>Feresin y col., 2003</i>
<i>B. illinita</i>	analgésico	Extracto hexánico	baurenol, alfa-spinasterol y ácido oleanólico	<i>Freitas y col., 2009</i>
<i>B. trimera</i>	antimutagénico	Extracto metanólico,	Flavonoides: genkwanina, cirsimaritina, huspidualina y apigenina	<i>Verdi y col., 2005</i>
<i>B. usterii</i>	antioxidante	Extracto acuoso	Derivados de ácido quínico	<i>Simoes-Pires y col., 2005</i>



1.2.2. *Baccharis articulata* (Lamarck) Persoon

Baccharis articulata, conocida vulgarmente como "carqueja", "carquejilla", "carqueija", "crespa", "carqueja blanca" (en Uruguay) y también como "yerba del leopardo" (en Paraguay), ha sido y continúa siendo usada para combatir enfermedades según la tradición folclórica regional, [Soraru y Bandoni, 1978].

Baccharis articulata (Lam.) Pers., (Figura 1), es un arbusto perenne dioico que puede alcanzar hasta 1 m de altura, ramoso y glutinoso. Presenta ramificaciones desde la base, tallos bialados, alas planas y angostas de 0,5 – 3 mm con diminutos "nidos" pilosos formados por pelos "en látigo" y glandulosos. Sus hojas están reducidas a brácteas caducas. Presenta capítulos sésiles agrupados en laxas espigas que se disponen en el ápice de las ramitas. Sus brácteas son obtusas o semiobtusas, las externas aovadas, las internas angostamente obovadas. Tiene flores con corola tubulosa, limbo ensanchado, estilo con ramas oblongas y separadas; y papus crespo, blanco, con cerdas de ápice apenas engrosado, [Ariza Espinar, 1973; Barboza y col., 2006].



Figura 1: Aspecto morfológico de la especie *Baccharis articulata*.



La clasificación taxonómica permite ubicarla en:

- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Orden: *Asterales*
- Familia: *Asteraceae*
- Subfamilia: *Asteroideae*
- Tribu: *Astereae*
- Género: *Baccharis*
- Especie: *Baccharis articulata*

Su distribución geográfica es exclusivamente americana, desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el extremo austral de Argentina y Chile. En esta vasta área se encuentra profusamente diversificada, ocupando gran variedad de ambientes y constituyendo un importante elemento en numerosas formaciones vegetales. En la República Argentina se desarrolla en las llanuras y sierras de Córdoba, también en San Luis y Catamarca (Sierra de Ancasti); además en Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, Chaco, Corrientes, La Pampa, Misiones, Santiago del Estero, Tucumán y Jujuy. Frecuentemente crece en campos, montañas, a orillas de caminos, en lugares de suelo fértil con buena estructura y alto contenido de humedad, [Ariza Espinar, 1973; Giuliano, 2001; Barboza y col., 2006].

1.2.2.a. Usos medicinales

En América del Sur *B. articulata* es ampliamente utilizada en medicina folclórica como extracto acuoso preparado con partes aéreas de la planta para tratar afecciones estomacales por sus propiedades digestivas, colagogas, protectoras del hígado, diuréticas y patologías tales como obesidad y hasta hemorragias cerebrales. Es utilizada por los campesinos de nuestro país para la impotencia masculina y esterilidad femenina siendo también empleada como afrodisíaca.

Otras propiedades atribuidas a esta especie es la de ser efectiva en infecciones respiratorias y urinarias, enfermedades de piel, lepra, reumatismo y diarreas. Además se le han asignado propiedades tónicas, antihelmínticas, febrifugas, estimulante gástrica, antiséptica, secante de úlceras y llagas sifilíticas, [Soraru y Bandoni, 1978; Pío Correa, 1984; Di Stasi y col., 2002; Mangiaterra, 2005, Juliani y col., 2007].



B. articulata, al igual que *B. crispa*, está incorporada en la Farmacopea Nacional Argentina (6ª edición) y por resolución N° 2673/99 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) se ha autorizado su consumo por el hombre, [Alonso y Desmarchelier, 2006].

1.2.2.b. Propiedades bioactivas

Estudios realizados con *B. articulata* han reportado un contenido relativamente alto de ácidos cafeoilquínicos (mayor al 1% de peso seco) en extractos hidroalcohólicos. Existe abundante bibliografía sobre las actividades biológicas de estos ácidos por ejemplo: hepatoprotectoras y colagogo-coleréticas, antioxidantes, antiinflamatorias y también como antivirales. Se ha demostrado que estos ácidos ejercen su acción antiviral por inhibir la enzima integrasa del HIV-1, [Palacios y col., 1999; Juliani y col., 2007].

Por otra parte, Vivot Lupi y colaboradores (2009) estudiaron la actividad antifúngica de extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de 6 especies vegetales de Entre Ríos, entre ellas *Baccharis articulata* mediante el método de microdilución en caldo, frente a cepas de *Aspergillus niger* y *Trichophyton rubrum*, siendo activa *in vitro* frente a dichas cepas fúngicas.

Estudios realizados por Zanon y colaboradores (1999) informaron la actividad antiviral de extractos alcohólicos de plantas medicinales de Córdoba, frente al virus *Herpes suis* cepa RC/79. Ocho extractos de plantas, entre ellas *Baccharis articulata*, presentaron la capacidad de inhibir al menos en 2 log, la infectividad viral.

Estudios realizados por De Oliveira y colaboradores en (2003) con extractos etanólico y acuoso de *B. articulata*, permitieron aislar un compuesto fenólico llamado Ball con importante actividad antioxidante.

En el entorno de la medicina homeopática se informa sobre un producto de origen vegetal, compuesto por tres tinturas provenientes de *Rosmarinus officinalis*, *Plantago major* y *Baccharis articulata* como poseedor de acción antiproliferativa sobre líneas celulares tumorales; sin embargo, este producto aún no ha sido avalado por la ANMAT, [www.homeopatia.com.mx/congreso26/con26p33.doc].



1.3. Familia Herpesviridae

1.3.1. Características generales

Los virus pertenecientes a la familia Herpesviridae se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza de gran impacto en el reino animal. Estos agentes virales pueden resultar letales cuando afectan a personas inmunodeprimidas, y a animales, dependiendo del tipo de virus Herpes que se trate, [Field y Whitley, 2005].

Los miembros de esta familia viral comparten la misma arquitectura del virión y la capacidad de establecer un estado de latencia.

La estructura viral está constituida por:

- Genoma a ADN lineal doble cadena que codifica aproximadamente para 70 proteínas que replica en el núcleo celular.
- Cápside icosaédrica constituida por 162 capsómeros y con un diámetro de 80 – 100 nm.
- Tegumento fibroso que comunica la cápside con la envoltura.
- Envoltura lipídica con al menos 12 proteínas glicosiladas y varias proteínas virales no glicosiladas.
- La partícula viral completa tiene un diámetro total de 180-200 nm.

En el estado de latencia el virus no replica, su genoma se encuentra circularizado y solo algunos genes se expresan. Estos genomas, bajo ciertas circunstancias, pueden comenzar a replicarse nuevamente y causar una recidiva de la enfermedad. La reaparición del cuadro clínico está íntimamente relacionada con la depresión de la respuesta inmune del huésped afectado.

Entre las diferencias que se destacan para los miembros de la familia están aquellas relacionadas a las características genéticas, a la duración de sus ciclos de replicación y a los tipos celulares donde estos agentes establecen su latencia. Estas diferencias permiten clasificar taxonómicamente a esta familia en tres subfamilias: α - herpesvirinae, β - herpesvirinae y γ - herpesvirinae, [De Cristofano y col., 1996; Carballal y Oubiña, 1998; Field y Whitley, 2005]. La **Tabla 6** exhibe las características biológicas de cada subfamilia de la familia Herpesviridae.



Tabla 6: Características biológicas de los Herpesvirus

Subfamilia	Características Biológicas				
	Células diana	Tropismo celular	Latencia	Tiempo ciclo replicativo	Virus representativos
<i>α - herpesvirinae</i>	mucoepiteliales	Neurotrópicos	neuronas ganglionares	18 - 24 h	<i>Herpes simplex tipo 1</i> <i>Herpes simplex tipo 2</i> <i>Varicela zoster</i> <i>Herpes suis tipo 1</i>
<i>β - herpesvirinae</i>	monocitos, linfocitos y células epiteliales	linfotrópicos	Glándulas salivales, riñones y tejido linfoide	72 h	<i>Citomegalovirus</i> <i>Herpes humano tipo 6</i> <i>Herpes humano tipo 7</i>
<i>γ - herpesvirinae</i>	células linfoblásticas y epiteliales	linfotrópicos	tejido linfoide	variable	<i>Epstein – Barr</i> <i>Herpes humano tipo 8</i>

1.3.2. Ciclo de replicación de los Herpesvirus

El ciclo de replicación de estos virus involucra diversos eventos que son comunes a todos los miembros de la familia. A continuación se detallan las etapas del ciclo replicativo (Figura 2), [Carballal y Oubiña, 1998; Field y Whitley, 2005].

- **Adsorción viral:** unión de las proteínas de envoltura viral (glicoproteínas C y D) a receptores celulares específicos como el proteoglicano heparán sulfato.
- **Penetración y desnudamiento:** se produce por endocitosis mediada por receptores o por fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática permitiendo el ingreso de la nucleocápside que es transportada hacia el núcleo donde es liberado el ADN el que inmediatamente es circularizado por sus extremos repetidos e invertidos.
- **Biosíntesis de macromoléculas:** comienza con la transcripción viral a través de la ARN polimerasa celular y con factores virales, se forman al menos tres ARN mensajeros (α , β y γ) de manera organizada y secuencial. Las proteínas tempranas inmediatas (α) y las tempranas (β) tienen función de regulación y otras



participan en la replicación del genoma viral. Esto ocurre mediante el modelo del círculo rodante con la participación también de proteínas celulares. Las proteínas tardías (γ) poseen en su mayoría función estructural que luego de su síntesis en el citoplasma, migran al núcleo para formar las cápsides.

- **Armado y Maduración:** en el interior del núcleo celular el ADN viral se incorpora al interior de la cápside preformada. La nucleocápside formada se asocia a la membrana nuclear interna de donde adquiere la envoltura que tiene las glicoproteínas virales insertas y el tegumento. Desde esta ubicación la partícula viral comienza a gemar.
- **Liberación:** este evento ocurre cuando los viriones envueltos y acumulados en el espacio perinuclear traspasan hacia el citoplasma y salen al exterior de la célula por el proceso de exocitosis o bien por disrupción de la membrana plasmática. Las células que sufren infección productiva, principalmente por el virus *Herpes simplex*, no sobreviven. En todo el ciclo de replicación se afectan tanto la estructura como los procesos bioquímicos celulares los que concluyen con la muerte celular.

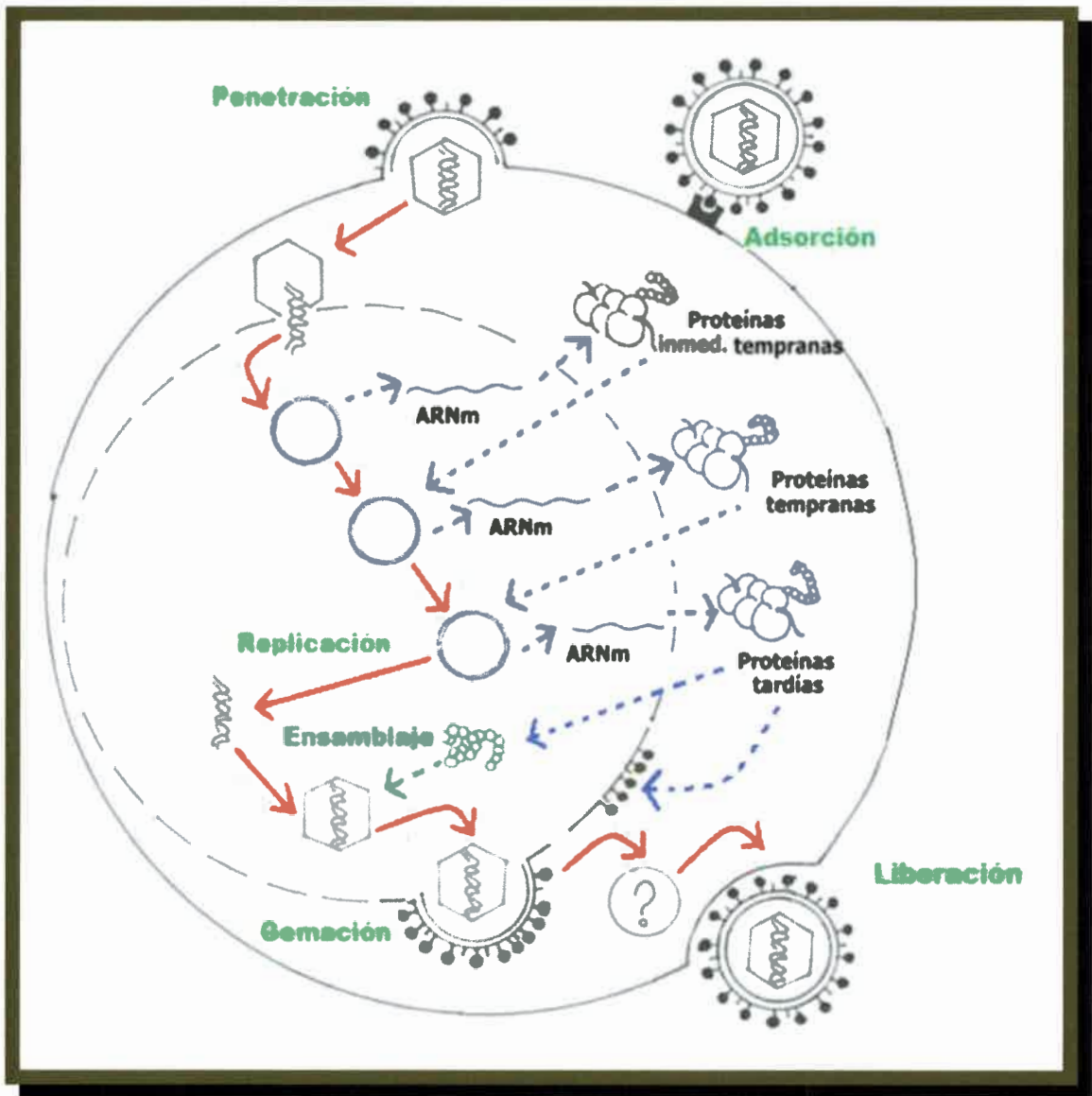


Figura 2: Ciclo de replicación de los Herpesvirus. Basado en www.ffyb.uba.ar/gxpsites/hgxppdwn.aspx.



1.3.3. Virus *Herpes suis* tipo 1, cepa RC/79

Este virus es el agente causal de la enfermedad de Aujeszky en porcinos, la infección provoca distintos grados de severidad de acuerdo a la edad del individuo infectado y la virulencia de la cepa viral. Fue detectado por primera vez en Hungría en 1902 por Aladar Aujeszky quien le dio el nombre a la enfermedad. Esta afección es también conocida como enfermedad de la pseudorabia porcina por su similitud con la rabia canina, **Figura 3**.

Este virus produce cuadros respiratorios en cerdos jóvenes y adultos, encefalitis en lechones, abortos en cerdas preñadas. En cerdos jóvenes de menos de 2 semanas de vida se ha detectado el mayor índice de mortalidad. Otras especies animales, tanto salvajes como domésticas (bovinos, ovinos, caprinos, caninos, felinos, ratas, ratones, conejos, venados y zorros), pueden ser afectadas también por este virus y causar la muerte de los individuos afectados ya que son huéspedes terminales. Para el virus de la enfermedad de Aujeszky se han identificado a nivel mundial diversas cepas con distintos grado de virulencia.

En Argentina la cepa reconocida de esta enfermedad se ha nombrado como RC/79, fue aislada por primera vez en Río Cuarto en 1979 en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo a partir de macerado de sistema nervioso central de cerdos afectados durante un brote epidémico, con un título de $1 \times 10^{3,5}$ dosis infectiva cultivo celular 50% por mL (DICC50/ml), [Ambrogi y col., 1981; Ceriatti y col., 1992; Echeverría y Nosetto, 2000].

Como se indicó en la **Tabla 6**, este patógeno está ubicado taxonómicamente en la subfamilia α - herpesvirinae, por lo que sus propiedades biológicas son comunes a los demás miembros de este grupo taxonómico. Estos virus tienen como características poseer un ciclo de replicación lítico de menos de 24 h de duración, rápida diseminación en el cultivo y eficiente destrucción de las células infectadas. La infección comienza con una primoinfección sintomática o no, seguida de un período de latencia en las neuronas de los ganglios sensoriales cercanos, donde persiste indefinidamente sin producir síntomas clínicos. Bajo la influencia de ciertos factores que desestabilizan la actividad inmunitaria del huésped, los virus tienen la oportunidad de reactivarse y multiplicarse activamente, por lo que se desencadenan episodios de recurrencia. Frecuentemente esto ocurre ante una situación de estrés, inmunosupresión por otras infecciones (VIH) o por tratamientos con quimioterápicos, [De Cristófano y col., 1996; Sabini, 1996; Echeverría y Nosetto, 2000].

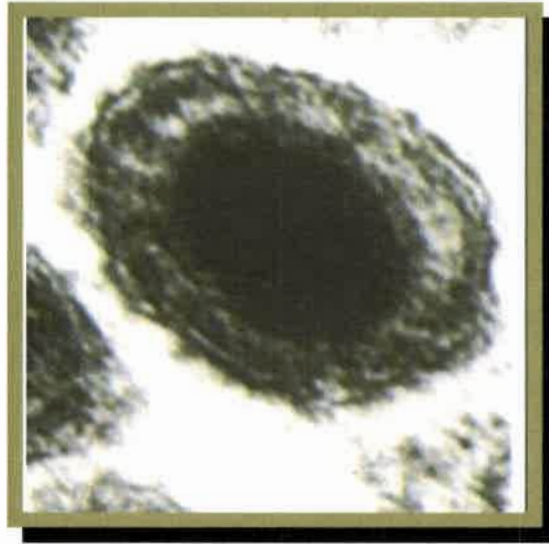


Figura 3: *Virus Herpes suis* tipo 1. Microscopía electrónica. Fuente: Universidad Santiago de Compostela, España. Autor: A. Eiras.

1.3.4. Terapia antiviral

Las infecciones de etiología viral pueden provocar altas tasas de morbilidad y mortalidad en la población mundial, particularmente en aquellos pacientes inmunocomprometidos, por lo que resulta necesaria una amplia disponibilidad de drogas antivirales, especialmente cuando no se dispone de vacunas. Un ejemplo de esta situación y muy conocida son las grandes complicaciones que se generan en inmunodeprimidos a causa de las infecciones por Herpesvirus, [Fatahzadeh y Schwartz, 2007].

Una droga que logra interferir con el ciclo de replicación de un virus impidiendo la producción de la progenie viral, es considerada una droga antiviral.

Los sitios vulnerables que tienen los virus en su ciclo de replicación constituyen los puntos de acción de las drogas antivirales y estos son:

- + Adsorción de la partícula viral a los receptores celulares y penetración a la célula.
- + Compromiso de las funciones genéticas:
 - ◆ transcripción del genoma
 - ◆ traducción de la información
 - ◆ replicación del genoma
- + Movilización de macromoléculas virales en la célula.
- + Ensamblaje y liberación de las partículas virales.



El desarrollo de nuevas fórmulas químicas con esta propiedad antiviral siempre ha sido un problema muy complejo, debido a que al atacar a estos patógenos se compromete también el metabolismo celular y por ende la fisiología del sistema huésped, [Carballal y Oubiña, 1998; Field y Whitley, 2005].

Hasta hace 4 décadas se consideraba que la terapia antiviral no sería posible, debido a que los virus son patógenos intracelulares obligados y que la inhibición de las funciones virales necesariamente significaría también la muerte celular. Este concepto no es sostenido en la actualidad ya que los avances en la biología molecular han permitido identificar diferencias tanto a nivel estructural y/o funcional entre enzimas virales, esenciales para su perpetuación, respecto de las de origen celular estableciendo así nuevos blancos de acción sin perjudicar la fisiología de las células huésped. Por tal motivo, se define como agente antiviral efectivo a aquel que es capaz de impedir la multiplicación viral en un sitio específico y esencial del ciclo replicativo, sin afectar el metabolismo celular normal del hospedador, [Barreto Penié y col., 1998; Crumacker, 2001].

El desarrollo de una quimioterapia antiviral específica tiene como propósito inactivar o eliminar por completo la capacidad infecciosa de la partícula viral, por ende, su atención se centra básicamente sobre los siguientes puntos, [De Torres y col., 1998]:

- ✦ Interferir con el ciclo replicativo, afectando procesos bioquímicos esenciales para la replicación y evitando la formación de progenie viral: **ANTIVIRAL**
- ✦ Inactivar la partícula viral a nivel extracelular, es decir previo ingreso a la célula huésped, eliminando su capacidad infecciosa: **VIRUCIDA**
- ✦ Modificar la respuesta inmune del huésped: **INMUNOMODULADOR**

Los puntos críticos de acción de los antivirales variarán molecularmente de acuerdo a la constitución genética y enzimática que posean los virus a tratar. Los antivirales más reconocidos y utilizados en la actualidad en la clínica se muestran en la **Tabla 7**.



Tabla 7: Antivirales de uso clínico, aprobados por FDA.

Droga	Blanco de acción	Para el tratamiento de	Efectos adversos
Aciclovir (análogo de guanósina)	ADN polimerasa viral	<i>Virus: Herpes simplex y Varicela zoster</i>	Alteraciones gastrointestinales, cefaleas, erupciones, insuficiencia renal, encefalopatía, flebitis e inflamación en la zona de infusión. Escosor ocular leve y transitorio, edema parpebral o corneal.
Amantadina/Rimantadina (amina tricíclica)	Adsorción, penetración y decapsidación.	<i>Virus Influenza A</i>	Alteraciones del sistema nervioso central
Azidotimidina (análogo de timidina)	Transcriptasa reversa	<i>VIH</i>	Mielosupresión, miopatía y neutropenia.
Foscarnet ¹ (análogo de pirofosfato)	ADN polimerasa viral	<i>Virus: Herpes simplex, Varicela zoster y Citomegalovirus.</i>	Alteraciones gastrointestinales, cefalea, toxicidad renal, anemia, fiebre, ulceraciones genitales y alteraciones electrolíticas.
Ganciclovir ² (análogo de guanósina)	ADN polimerasa viral	Todos los Herpesvirus	Alteraciones gastrointestinales, erupciones, nefrotoxicidad, neutropenia, trombocitopenia, anemia, fiebre y hepatotóxica. Irritación transitoria ocular o queratitis superficial punteada.
Idoxuridina/trifluorotimidina (análogo de timidina)	Timidilato sintetasa viral	<i>Virus Herpes simplex</i>	Irritación ocular, conjuntivitis, edema, queratitis superficial, y retraso de la cicatrización.
Ribavirina (análogo de guanósina)	Transcripción viral	<i>Virus: Respiratorio Sincicial, Sarampión, Influenza A y B, Parainfluenza, Hepatitis A y C y VIH</i>	Anemia transitoria, elevados niveles de bilirrubina, reticulocitosis, erupción y conjuntivitis.
Vidarabina ³ (análogo de adenina)	ADN polimerasa viral	<i>Virus: Herpes simplex, Varicela zoster, Citomegalovirus y Epstein-Barr</i>	Gastrointestinales (nauseas, vómitos y diarrea), neurológicos (parestesia y ataxia), anemia megaloblástica, leucopenia y trombocitopenia.

¹: En infecciones con virus resistentes a Aciclovir. ²: Principalmente en pacientes inmunodeprimidos con infecciones a *Citomegalovirus*. ³: En pacientes inmunocomprometidos; [Giménez Arnau, 1994; Carballal y Oubiña, 1998; Tuset y col., 2003; Field y Whitley, 2005; Andrés, y col., 2008; Razonable, 2011].



1.3.4.1. Avances en la quimioterapia antiviral

Los avances en la quimioterapias antimicrobianas en los últimos cuarenta años han permitido el desarrollo de un gran número de sustancias con actividad farmacológica comprobada en infecciones bacterianas, micóticas y parasitarias. A nivel virológico este avance ha sido menor debido a múltiples razones aún así hay moléculas activas descubiertas que pueden inhibir los virus tanto *in vitro* como *in vivo*. Sustancias de síntesis química aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) y efectivas para el tratamiento de infecciones causadas por Herpesvirus se muestran en la misma **Tabla 7**.

Aún así las drogas antivirales con valor clínico demostrado son escasas sumado a ello la aparición de resistencia en tratamientos sostenidos en infecciones crónicas conducen a la búsqueda de nuevos antivirales.

Los antivirales disponibles actualmente se incluyen en categorías: los antirretrovirales (anti-VIH), y drogas activas frente a virus que generan mayores trastornos a la salud humana como los Herpesvirus, los que generan hepatitis (particularmente el virus de la hepatitis C) y los virus Influenza, [Razonable, 2011].

1.3.4.2. Inconvenientes en la terapia antiviral

Las dificultades para encontrar sustancias con actividad antiviral efectiva de aplicación clínica se deben, entre otros factores, al éxito evolutivo de los virus, debido a las variaciones genéticas de estos agentes infecciosos, la variedad en los medios de transmisión y su eficaz replicación dentro de las células del huésped. Además, en muchos casos hay virus que tiene la habilidad de siempre permanecer asociado al huésped, tal como acontece con los Herpesvirus.

La quimioterapia antivírica afronta importantes obstáculos que justifican su lento progreso y los escasos éxitos alcanzados debidos a que:

- ◆ Muchas enfermedades víricas se diagnostican demasiado tarde para un tratamiento eficaz, normalmente los primeros síntomas de las enfermedades víricas aparecen durante la etapa final de la multiplicación del virus.
- ◆ El índice terapéutico, definido como la relación eficacia/toxicidad, debe ser elevado para que un tratamiento sea aceptable, [Barreto Penié y col., 1998; Carballal y Oubiña, 1998].

Si bien muchas enfermedades virales pueden prevenirse mediante la inmunización, existen diversas virosis para las que no hay vacunas efectivas, en cuyo caso la única forma de enfrentar la enfermedad es mediante la quimioterapia. Un ejemplo de ello lo constituyen los miembros de la familia *Herpesviridae*, porque inducen



infecciones latentes, permaneciendo asociados a la célula que infectan y pudiendo reactivar infecciones luego de meses o años de la primoinfección, [Carballal y Oubiña, 1998; Rosenberg, 2004].

El uso de antivirales en tratamientos prolongados y/o las actitudes de automedicación promueven el surgimiento de cepas virales resistentes principalmente en pacientes inmunocomprometidos, lo que ha llevado en numerosos casos al fracaso del tratamiento, [Erich y col., 1989; Nugier, y col., 1992; Safrin y col., 1994; Richman, 1996; Crumpacker, 2001; Razonable, 2011].

Es bien conocida la resistencia a Aciclovir de cepas virales mutadas que son deficientes en timidina quinasa (incapaces de activar el aciclovir) o pueden por alteraciones en la ADN polimerasa que se ve reducida en la afinidad por el aciclovir trifosfato. Cabe destacar que las cepas resistentes se han aislado en pacientes trasplantados o infectados con VIH, [Illán, y col., 2002; Rosenberg, 2004; Razonable, 2011]. A este inconveniente se le suma los efectos secundarios indeseables que llevan a la administración de otros medicamentos para contrarrestar su acción. Es bien conocido que los tratamientos con Acyclovir y Ganciclovir pueden llevar a neurotoxicidad, particularmente en los casos de disfunciones renales, [De Loug, y col., 2000].

Se han evidenciado interacciones farmacológicas en pacientes que tratados con antirretrovirales a los que se les suma drogas antiherpéticas o antivirales contra el virus causal de la Hepatitis C como telaprevir o boceprevir, [Soriano y col., 2011].

En pacientes trasplantados, la reactivación de infecciones herpéticas resulta bastante frecuente y estos virus alteran la respuesta inmunitaria asociándose al establecimiento de infecciones oportunistas y con episodios de rechazo agudo, [Humar y col., 2002].

Otro inconveniente es el precio de estos medicamentos lo que disminuye la posibilidad de acceso a los mismos por gran parte de la población. Todo esto demuestra la necesidad de disponer de nuevas drogas para el tratamiento de las infecciones virales herpéticas, [Rosenberg, 2004].



1.4. Medicamentos herbarios

Diversas sustancias químicas aisladas de extractos vegetales han sido establecidas como medicamentos por su acción biológica y su escasa toxicidad; así, podemos mencionar a la aspirina extraída de *Filipendula ulmaria* (familia Rosaceae), la reserpina una droga tranquilizante y antiesquizofrénica derivada del arbusto *Rauwolfia serpentina* (Apocynaceae), entre otras, [Nuñez y Cantero, 2000].

A los medicamentos de origen vegetal se le atribuyen ciertas ventajas; son más económicos, ofrecen una amplia diversidad de moléculas químicas y en general presentan escasa toxicidad. La primera aproximación para la selección del vegetal surge de evaluar antecedentes etnobotánicos o etnofarmacológicos que resumen el conocimiento acumulado y transmitido a nivel popular desde los pueblos indígenas [Cowan, 1999; Nuñez y Cantero, 2000].

El descubrimiento de nuevas drogas con acción terapéutica es netamente empírico, donde el método tradicional para obtener este conocimiento se basa en la búsqueda de la actividad biológica en muchas sustancias obtenidas por procesos químicos, derivados de microorganismos o de extractos vegetales. Así también pueden hacerse modificaciones químicas a la estructura a fin de potenciar la efectividad o especificidad, evaluándose nuevamente las acciones biológicas y propiedades químicas, como es el caso de la penicilina.

La farmacognosia es la ciencia que estudia los principios activos de origen natural con acción terapéutica potencial, aislando, identificando y describiendo el uso terapéutico de por ejemplo: las drogas vegetales. Como consecuencia contribuye a ampliar el conocimiento de nuevas drogas para su aplicación en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia, [Cortez Gallardo y col., 2004].

Cuando un producto de origen vegetal (drogas vegetales, extractos o bien compuestos activos purificados) tiene un efecto farmacológico determinado demostrado y es utilizado para atenuar alguna afección suave o crónica se lo conoce como fitoterápico o fitofármaco y es elaborado de acuerdo a formas farmacéuticas tradicionales. En estos productos no siempre se conoce con certeza la composición de sus principios activos, [Cañigüeral, y col., 2003].

Estos medicamentos herbarios deben caracterizarse por su seguridad, eficacia y calidad establecidas para todo medicamento, así lo impulsa la OMS que instó a todos los países a realizar evaluación de la medicina tradicional para poder incorporarla dentro de las farmacopeas, [OMS, 2005]. Sin embargo, a nivel internacional no se ha demostrado de manera completa la caracterización fitoquímica y farmacológica de las variadas drogas



vegetales que se conocen y que figuran en diversas farmacopeas, como lo son valeriana, manzanilla y pasiflora, entre otras.

Las drogas vegetales están constituidas por mezclas de compuestos en distintas proporciones que ejercen diversas acciones terapéuticas pudiendo en algunos casos contener mutágenos que se relacionen con procesos carcinógenos, teratogénicos y/o alteraciones genéticas heredables. Lo mismo ocurre con la evaluación farmacológica de diferentes compuestos puros aislados de drogas vegetales, principios activos, que podrían inducir el mismo daño biológico, [Calixto, 2000; Sánchez Lamar y col., 2000; Mangiaterra, 2005]. En consecuencia, es necesario evaluar la genotoxicidad de estas drogas a fin de completar su caracterización antes que sean postuladas como fitofármacos. Además los compuestos pueden actuar en forma sinérgica o antagónica para las distintas acciones biológicas de la droga, como por ejemplo para la actividad citogenotóxica.

Para que un fitoquímico pueda ser utilizado como medicamento para el tratamiento de alguna dolencia es premisa establecer la eficacia de la acción biológica beneficiosa para este agente, demostrándose simultáneamente la baja o nula toxicidad del mismo, tal como lo establece la OMS, [OMS, 2005].

1.4.1. Estudios de seguridad de medicamentos herbarios

En la búsqueda de nuevos compuestos químicos de origen vegetal para ser aplicados en la medicina, se deben realizar en primera instancia estudios preclínicos que garanticen, aparte de su eficacia, su seguridad *in vitro*. Estos estudios preclínicos incluyen: selección e identificación botánica de la planta medicinal, caracterización fitoquímicas de la misma y su evaluación farmacológica y toxicológica, [Sánchez Lamar y col., 2000].

Actualmente, se considera que dentro de los estudios de toxicidad de compuestos químicos de aplicación humana es importante la incorporación de técnicas que evalúen su posible capacidad mutagénica, debido a que está ampliamente demostrado que la alteración de la proliferación celular es una importante causa de neoplasias.

La evaluación genotóxica es un paso importante para completar el análisis toxicológico de nuevos medicamentos y consiste en determinar los posibles efectos mutagénicos provocados por posibles sustancias químicas y las consecuencias para la salud humana. Este análisis considera mutaciones génicas (cambio en uno o pocos pares de bases), alteraciones cromosómicas estructurales (cambios mayores en la estructura) o



numéricas (aneuploidía o poliploidía) o bien alteraciones en el ADN (formación de ductos, alquilación de bases), entre otras, [Sánchez Lamar y col., 2000].

El test de *Allium cepa*, para la evaluación de alteraciones cromosómicas está validado por el Programa Internacional sobre Seguridad Química apoyado por la OMS como un test eficiente y estandarizado para el monitoreo de sustancias ambientales genotóxicas, [Cabrera y Rodríguez, 1999; Rani y col., 2005].

1.5. Evaluación de Genotoxicidad: test de *Allium cepa* L.

Se ha demostrado que las plantas vasculares como *Allium cepa* L., tienen la capacidad de manifestar alteraciones en su morfología, bioquímica, fisiología y etología frente a cambios ambientales. Estos vegetales detectan cambios químicos permitiendo el estudio de toxicidad de diversos compuestos puros o en mezclas. El test de *Allium cepa* es muy utilizado para estudiar la toxicidad total y genotóxica de contaminantes ambientales en función de la valoración tanto del crecimiento de sus raíces como también de las alteraciones cromosómicas durante el desarrollo del proceso de mitosis en las células meristemáticas de la raíz. Estas células al no fotosintetizar y estar libres de cloroplastos se asemejan a los procesos que ocurren en células de vertebrados por lo que potencia aún más al test para estudios de toxicidad. Además proveen de procesos enzimáticos de activación de ciertos promutágenos, [Fiskesjö, 1985; Fiskesjö, 1997; Urteaga y Lallana, 2005; Leme y Marín Morales, 2009].

El empleo del test de *Allium cepa* L. fue establecido por primera vez por Levan A. (1938), quien demostró las anomalías en el huso mitótico por el empleo de colchicina (c-mitosis), además indicó que otras sustancias como las sales orgánicas provocan alteraciones cromosómicas en las células meristemáticas de esta especie vegetal. Desde entonces esta técnica ha sido modificada para que permita el análisis de otras sustancias químicas puras o en mezclas. En la actualidad es muy utilizada para evaluar la acción citotóxica y actividad genotóxica de varios compuestos o mezclas como son los extractos vegetales, [Bidau y col., 2004; Akinboro, 2007; Leme y Marín Morales, 2009].

El fundamento de este test se basa en la estimulación del crecimiento radicular por rehidratación de bulbos de *Allium cepa*, lo que permite la elongación de las raíces y el estudio del proceso de mitosis en sus distintas fases. Cuando se rehidrata en diferentes soluciones problemas pueden evaluarse variaciones del crecimiento radicular, alteraciones en el proceso de mitosis o la muerte celular, al compararse con los bulbos



del sistema control negativo no expuestos a la droga en estudio, [Fiskesjö, 1985; Fiskesjö, 1997].

1.5.1. Criterios de valoración del test de *Allium cepa* L.

Los parámetros evaluables a través del test *Allium cepa* L. ($2n = 16$), que demuestran acción directa de agentes químicos, permiten inferir daños tóxicos tales como alteraciones macroscópicas definidas en función de la inhibición del crecimiento radicular y la presencia de tumores, entre otros. Por otra parte también permite evaluar los daños genotóxicos por alteraciones microscópicas tales como modificaciones del índice mitótico, aberraciones cromosómicas, anormalidades nucleares y presencia de micronúcleos.

✦ Alteraciones macroscópicas (índice de toxicidad):

Entre estos parámetros se encuentran:

- ❖ *Longitud de las raíces*: demuestran las variaciones que se pueden producir con respecto al control negativo. Los valores promedios pueden graficarse en función de las concentraciones de sustancia ensayadas y establecer la concentración inhibitoria del crecimiento 50% (CI_{50}).
- ❖ *Estructura de raíz*: tumoración, agrandamiento de la raíz, curvatura de raíces o puntas.
- ❖ *Turgencia*: dureza de las puntas de las raíces indica efecto tóxico y puntas muy blandas muestran muerte celular.
- ❖ *Cambio de color*: también es indicativo de toxicidad pudiendo llegar a la muerte celular.

✦ Alteraciones microscópicas (índice de genotoxicidad):

La determinación del **Índice mitótico** se utiliza para evaluar la acción genotóxica de varios agentes, en él se contabiliza el número total de células en división dentro del ciclo celular por cada 1.000 células observadas. El incremento o la disminución de este índice, con respecto al control negativo, demuestra el nivel de genotoxicidad del agente en estudio. Una disminución reflejará alteración en el ciclo celular y un aumento, un desorden de proliferación celular con inducción a la formación de tejido tumoral. Pueden también determinarse los **Índices de fases** establecidos como el número de células en



cada una de las fases por el total de las células que se encuentran en división, en al menos 1.000 células observadas.

Las alteraciones cromosómicas se caracterizan por cambios en la estructura de los cromosomas o en el número de ellos durante la mitosis. Tales alteraciones pueden producirse por ruptura del ADN o por modificaciones en el proceso que lleva a su síntesis. Una anomalía en la segregación cromosómica conduce a la aparición de aneuploidía y / o poliploidías, las que pueden ocurrir espontáneamente o por acción de algunos agentes químicos. Todas estas alteraciones deben analizarse las diferentes fases de la división celular (profase, metafase, anafase y telofase). La presencia de puentes y las rupturas cromosómicas indican una acción clastogénica, mientras que las pérdidas, retrasos, adherencia, multipolaridad y la c-mitosis reflejan un efecto aneugénico.

En las fases de la división celular pueden detectarse las siguientes anomalías:

- ❖ Anafase con grupos de cromosomas no completamente separados.
- ❖ Cromosomas pegajosos: parámetro que indica un fuerte efecto tóxico y usualmente no reversible llevando probablemente a la muerte celular.
- ❖ Fragmentos o puentes cromosómicos: que resultan de la ruptura de cromosomas o cromátides.
- ❖ Cromosomas aislados o rezagados: surgen de un débil efecto de c-mitosis indicando un riesgo de aneuploidía.
- ❖ C-mitosis: efecto tóxico débil probablemente reversible a nivel cromosómico y ocurre después de la alteración estructural del huso mitótico, [Fiskesjö, 1985].

Las anomalías nucleares son alteraciones posibles de detectar durante la interfase celular y se manifiestan como núcleos lobulados, núcleos con gemaciones, células polinucleadas, entre otras. La presencia de núcleos lobulados y células polinucleadas indican muerte celular, en el caso de las gemaciones podrían deberse a la eliminación de material genético excedente generado por el proceso de poliploidización.

La presencia de **micronúcleos** (MN) refleja el daño producido en la célula parental sin reparación y que evidencia en las células hijas porque poseen un núcleo de menor tamaño. Esto ocurre posiblemente por alguna alteración cromosómica previa o como consecuencia de la eliminación de material genético en la poliploidización al restaurar la ploidía normal. En el caso de MN de mayor tamaño podrían indicar efecto



aneugénico resultado de la pérdida de cromosoma mientras que los MN muy pequeños podrían ser producto de ruptura cromosómica manifestando efecto clastogénico, [Leme y Marín Morales, 2009].

1.6. Planteamiento del problema

La enfermedad de Aujeszky producida por virus *Herpes suis* de distribución mundial tiene un alto impacto sanitario y económico en los países con una alta productividad ganadera porcina industrializada, por ser esta la especie más afectada. Esta enfermedad produce pérdidas en cuanto a la producción y a un mayor gasto en planes de control y erradicación de la enfermedad. Esta enfermedad caracterizada por desarrollar formas clínicas nerviosas, respiratorias y reproductivas sigue siendo en la actualidad un problema difícil de resolver, [Ruiz-Fons y col., 2007; Boadella y col., 2012].

Las plantas medicinales proveen de una amplia variedad de sustancias químicas bioactivas con potenciales acciones antimicrobianas y sus productos derivados son consumidos cada vez más en todo el mundo. A esto se debe el incremento de investigaciones realizadas en el campo de las plantas medicinales y la medicina tradicional para la búsqueda y desarrollo de nuevos medicamentos.

La especie *Baccharis articulata*, particularmente abundante en las serranías cordobesas, es muy empleada por la medicina folclórica regional para la cura de diversas dolencias y se encuentra además incorporada en variados productos herbales de gran consumo alimenticio humano. Para esta especie vegetal no se ha demostrado científicamente sus propiedades antiherpéticas frente al virus *Herpes suis*.

Para que las sustancias aisladas o drogas vegetales con acción biológica comprobada científicamente puedan ser utilizadas como fitofármacos debe garantizarse, a través de estudios preclínicos, su calidad y seguridad. Estos estudios se dirigen a la evaluación de la potencial capacidad de ejercer daño tóxico y a nivel genómico, como se demuestran en diversas publicaciones, [Leme y Marín Morales, 2009; Battacharya y Haldar, 2010].

Conforme al potencial establecimiento de un nuevo fitofármaco con acción antiviral frente a Herpesvirus se torna indispensable la evaluación de posibles efectos tóxicos y genotóxico como evaluación de inocuidad. Estas valoraciones permiten determinar la selectividad de la acción antiviral de extractos vegetales activos y establecer su posible aplicación como fitofármaco.



1.7. Hipótesis

Compuestos con bioactividad de interés médico-veterinario para combatir afecciones de etiología herpética pueden ser encontrados en extractos de *Baccharis articulata*, a concentraciones no citogenotóxicas.

Objetivos



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Demostrar que diferentes extractos provenientes de *Baccharis articulata*, poseen actividad antiviral frente al virus *Herpes suis tipo 1*, a concentraciones no citogenotóxicas, e investigar su posible blanco de acción en su ciclo de replicación evaluado sobre monocapas de células Vero.

2.2. Objetivos específicos

1. Obtener diferentes extractos de *Baccharis articulata*.
2. Estudiar la capacidad citotóxica de extractos a través de la determinación de:
 - a. La máxima concentración no citotóxica (MCNC).
 - b. La concentración citotóxica 50% (CC₅₀) por captación de rojo neutro.
 - c. La concentración citotóxica 50% (CC₅₀) por reducción de sal de tetrazolio MTT.
3. Evaluar la actividad antiviral y virucidal de extractos no citotóxicos frente a virus *Herpes suis* tipo 1 cepa RC/79 y su posible blanco de acción, a través de la determinación de:
 - a. Acción antiviral posterior a la etapa de adsorción y penetración viral.
 - b. Acción antiviral sobre la etapa de adsorción y penetración viral.
 - c. Acción antiviral en pre-tratamiento de los cultivos celulares con extracto vegetal.
 - d. Actividad virucidal.
 - e. La máxima concentración efectiva 50% (CE₅₀).
 - f. Determinación del Índice de Selectividad.
 - g. La Inhibición del rendimiento viral a una multiplicidad de infección de 0,1 y 0,01.
 - h. Acción antiviral del té de *B. articulata* sobre la etapa de adsorción y penetración viral.
4. Estudiar el potencial genotóxico de extractos bioactivos y no citotóxicos de *B. articulata* a través de:
 - a. Determinación de muerte celular y fragmentación nuclear en linfocitos humanos.
 - b. Ensayo in vivo a través del test de *Allium cepa* L.



Objetivos

5. Caracterización fitoquímica parcial de compuestos presentes en extractos bioactivos de *B. articulata* a través de:
 - a. Técnicas cromatográficas, espectroscópicas y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Materiales



3. MATERIALES

3.1. Medios

3.1.1. Medio de Crecimiento para células Vero (MC)

Medio esencial mínimo de Eagle (MEM) en solución salina balanceada de Earle, con glutamina (medio sintético GIBCO), suplementado con 8% de suero fetal bovino inactivado a 56°C por 30 minutos y 30 µg/ml de gentamicina; pH 7,2-7,4.

3.1.2. Medio de Crecimiento (MC) para células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs)

Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (SIGMA-ALDRICH Inc., St. Louis, USA) suplementado con 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, solución de penicilina, estreptomina y neomicina y 10% de suero fetal bovino, pH 7,2 - 7,4.

3.1.3. Medio de Mantenimiento para células Vero (MM)

Medio Esencial de Eagle (MEM) en solución salina balanceada de Earle, con glutamina (medio sintético de GIBCO), suplementado con 2% de suero fetal bovino inactivado a 56°C por 30 minutos y 30 µg/ml de gentamicina; pH 7,4-7,8.

3.1.4. Medio para placas (MP)

a) MEM 2X, suplementado con 2% de solución de glutamina, 4% de SFB, 2% de solución de penicilina - estreptomina y bicarbonato de sodio al 5% hasta pH 7,4-7,8.

b) Solución de metil celulosa al 1,5%

Las soluciones a y b se conservaron a 4°C y ambas se mezclaron en volúmenes iguales al momento de usar, ajustando el pH a 7,2 - 7,4.

3.1.5. Medio thioglicolato

Thioglicolato DIFCO 29 g

Agua destilada c.s.p 1000 ml

Se esterilizó a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 20 minutos y se conservó a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su uso. Este medio se utilizó para el control de esterilidad de los distintos medios y soluciones empleadas en los cultivos celulares.



3.2. Soluciones

3.2.1. Solución de ácido clorhídrico 1 N

HCl.....	36 g
Agua destilada.....	1000 ml

3.2.2. Solución de agua mineral

Se utilizó agua de manantial, conteniendo los siguientes minerales:

NaCO ₃ H	325 mg/l
Ca(CO ₃ H) ₂	130 mg/l
Mg(CO ₃ H) ₂	130 mg/l
Na ₂ SO ₄	78 mg/ml
CaSO ₄	78 mg/ml
MgSO ₄	78 mg/ml
NaCl	16 mg/ml
CaCl ₂	16 mg/ml
MgCl ₂	16 mg/ml
CaF ₂	1,4 mg/ml
Oligoelementos	1,5 mg/ml

3.2.3. Solución de azul tripán al 0,5%

Azul tripán	0,5 g
Agua bidestilada.....	100 ml

Se disolvió por agitación y se conservó a 4°C.

3.2.4. Solución balanceada de fosfatos (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0,200 g
Na ₂ PO ₄ H + 2 H ₂ O	1,44 g
KPO ₄ H ₂	0,200 g
Agua bidestilada c.s.p.	1000 ml

La solución se fraccionó en frascos de 200 ml aproximadamente, se esterilizó a 3/4 atmósfera durante 30 minutos y se conservó a 4°C hasta su uso.



3.2.5. Solución de bicarbonato de sodio al 5%

NaCO₃H 5 g
Agua bidestilada c.s.p. 100 ml

Se disolvió por agitación y se fraccionó en tubos de ensayo. Se esterilizó a ¾ atmósfera durante 20 min. y se conservó a 4°C hasta su uso.

3.2.6. Solución de buffer de lisis de ADN

SDS 2%
EDTA..... 10 mM
Tris-HCl..... 10 mM
El pH se ajustó a 8,5.

3.2.7. Solución de cristal violeta

Cristal violeta..... 10 g
Fenol 20 g
Etanol..... 100 ml
Agua destilada c.s.p. 1000 ml

El colorante se maceró en un mortero con fenol, se incorporó poco a poco el etanol, luego se agregó agua destilada hasta completar el volumen final. Se dejó estacionar a 37°C por 48 h en oscuridad. Se filtró con papel Whattman N°2 y se conservó a temperatura ambiente en frascos color caramelo hasta su uso.

3.2.8. Solución desteñidora de Rojo Neutro

Agua destilada 49 ml
Etanol absoluto 50 ml
Acido acético 1 ml
Esta solución fue preparada al momento de usar.

3.2.9. Solución etanol absoluto: ácido acético glacial

La solución de trabajo utilizada correspondió a la proporción 3:1 de etanol absoluto: ácido acético glacial.



3.3.10. Solución etanol 70°

Etanol absoluto..... 70 ml
Água destilada c.s.p. 100 ml

3.3.11. Solución de gentamicina

Sulfato de gentamicina 0,83 g
Agua bidestilada 100 ml

Se esterilizó por filtración fraccionándose en pequeños volúmenes. Se conservó a 4°C hasta su uso.

3.2.12. Solución de glutamina

Glutamina 3 g
NaCl 0,85 g
Agua bidestilada 100 ml

Se agitó hasta disolución en baño a 37°C. Se esterilizó por filtración y fraccionada, se conservó a -20°C hasta su uso.

3.2.13. Solución de metil celulosa al 1,5 %

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

Se disolvió en un erlenmeyer y se esterilizó en autoclave a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 25 min. Se conservó a 4°C hasta su uso.

3.2.14. Solución de orceína aceto-acética

Orceína 1 g
Ácido acético 45 ml
Agua destilada 100 ml

Se disolvió la orceína en el ácido acético a baño María (60°C). Una vez frío el sistema, se agregó agua destilada. Filtrada la solución, fue conservada a 4°C en frascos color caramelo hasta su uso.



3.2.15. Solución de Paracetamol 0,3 mg/ml

Paracetamol	500 mg
DMSO	3 ml
Agua destilada c.s.p.	500 ml

3.2.16. Solución de Rojo Neutro (RN)

Se agregaron 0,5 ml de RN estéril (GIBCO) a 30 ml de MM estéril, se dejó en estufa 24 h. Luego se centrifugó durante 30 minutos a 3500 rpm. Se prepararon 50 ml para las placas de 24 pocillos o 20 ml para las placas de 96 pocillos.

3.2.17. Solución de rojo fenol al 0,5%

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

Se maceró el rojo fenol en un mortero con un pequeño volumen de solución de OHNa N/20, la que se continuó agregando por gotas hasta obtener una solución completa que mantuvo su color rojo intenso. Una vez disuelto se ajustó a volumen final con agua bidestilada. Se fraccionó en frascos color caramelo y se esterilizó a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 30 min. Se conservó a 4 °C hasta su uso.

3.2.18. Solución de tripsina + EDTA 2X (solución stock)

NaCl	16 g
KCl	0,8 g
Dextrosa	2 g
NaCO ₃ H	1,16 g
Tripsina	1,5 g
Versene	0,4 g
Agua bidestilada c.s.p.	1000 ml.

Se disolvieron los componentes por agitación magnética agregando luego 4 ml de la solución de rojo fenol al 0,5%. Se esterilizó por filtración y se fraccionó en volúmenes de 50 o 100 ml. Se conservó a -20°C hasta su uso.



3.3. Material biológico

3.3.1 Cultivos celulares

En el desarrollo de las experiencias se empleó la línea celular VERO, clon 76 (línea continua de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) adquirida en la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC) de la ciudad de Pergamino, provincia de Buenos Aires.

3.3.2. Material vegetal

Se empleó la especie *Baccharis articulata* que fue colectada durante el período 2007-2009 en el mes de marzo en su hábitat natural en la zona de las serranías cordobesas, Alpa Corral y región aledaña Villa Jorcoricó, provincia de Córdoba, Argentina. La identificación taxonómica fue realizada por la Profesora Margarita Grosso de la UNRC. Un espécimen del vegetal fue depositado en dicho Herbario nombrado con el vaucher N° RCV 1810.

3.3.3. Virus

Se empleó el virus *Herpes suis tipo 1, cepa RC/79* que fue aislado en Río Cuarto en el año 1979, [Ambroggi, y col., 1981]. Una parte de esta semilla viral fue conservada a 4°C y mantenida en el laboratorio por pasajes sucesivos, mientras que otra se conservó como stock a -80°C fraccionada en eppendorf.

3.3.4. Bulbos de *Allium* sp.

Se utilizaron bulbos de cebollas *Allium cepa* L. variedad valenciana. Las cebollas seleccionadas fueron de color tostado y pequeñas (5-8 cm diámetro) de morfología uniforme y sin alteraciones que demostraran afección alguna.

3.3.5. Material biológico humano

En todos los experimentos se emplearon muestras de sangre humana extraídas de voluntarios sanos cuyas edades oscilaron entre 18 y 26 años. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron separadas de las muestras de sangre por gradiente de densidad con Histopaque. Las extracciones se realizaron en el



Centro de Salud de la UNRC de acuerdo a las normas de ética. Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS) de la UNRC, según Expediente 73/2012.

3.4. Reactivos

Para la preparación de los extractos vegetales se utilizaron los siguientes reactivos:

- + n- Hexano
- + Cloroformo
- + Metanol
- + Dimetilsulfóxido (DMSO)

Para los ensayos de citotoxicidad se emplearon los siguientes reactivos:

- + Rojo neutro (GIBCO)
- + 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromuro, (MTT). Equipo de Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen).

Para el estudio de apoptosis y fragmentación de ADN se emplearon los siguientes reactivos:

- + Hystopaque® - 1077 (Ficoll-Hypaque)
- + Reactivo de Hoechst 33258
- + Proteinasa k (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- + RNAasa A (Boehringer Mannheim, Germany)

Para la realización de cromatografías que permitieran la identificación de algunos constituyentes del EAC se utilizaron los siguientes reactivos, tanto para placas de cromatografía en papel como en capa fina (TLC):

- + Compuestos testigos para HPLC: acacetina, luteolina, quercetina y ácido clorogénico de Sigma-Aldrich.
- + Acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)
- + Acido acético (CH_3COOH)
- + Acido clorhídrico (HCl)
- + Agua destilada
- + Eter etílico ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)
- + Metanol (CH_3OH)



- ✦ Mg (limadura)
- ✦ n-butanol (C₄H₉OH)
- ✦ Sílica gel 60 F254 sin indicador de fluorescencia.

Métodos



4. METODOS

4.1. Obtención de los extractos a partir de *Baccharis articulata*

Partes aéreas, secas y finamente molidas fueron sometidas a tratamiento secuencial durante 48 h a temperatura ambiente con *n*-hexano, cloroformo y metanol. Después de la filtración los productos fueron concentrados a sequedad por vacío para generar los extractos *n*-hexánico (EH), clorofórmico (EC) y metanólico (EM), (**Diagrama 1**). Las soluciones iniciales de trabajo de estos extractos (1 mg/ml) fueron logradas disolviéndolos en MM conteniendo DMSO.

Para la obtención del extracto acuoso frío (EAF) el material vegetal fue sometido a extracción con agua a 4°C por 48 h, filtrado y el percolado fue recolectado. El residuo vegetal fue dejado en remojo en agua destilada a 70°C por 48 h más, fue filtrado y el percolado constituyó el extracto acuoso caliente (EAC). Ambas soluciones acuosas fueron liofilizadas, (**Diagrama 2**). Estos extractos fueron disueltos en MM a concentración inicial de trabajo de 10 mg/ml, los que se esterilizaron con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro

Todas las soluciones de trabajo fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.



Diagrama 1: Obtención de extractos n-hexánico, clorofórmico y metanólico de *B. articulata*.

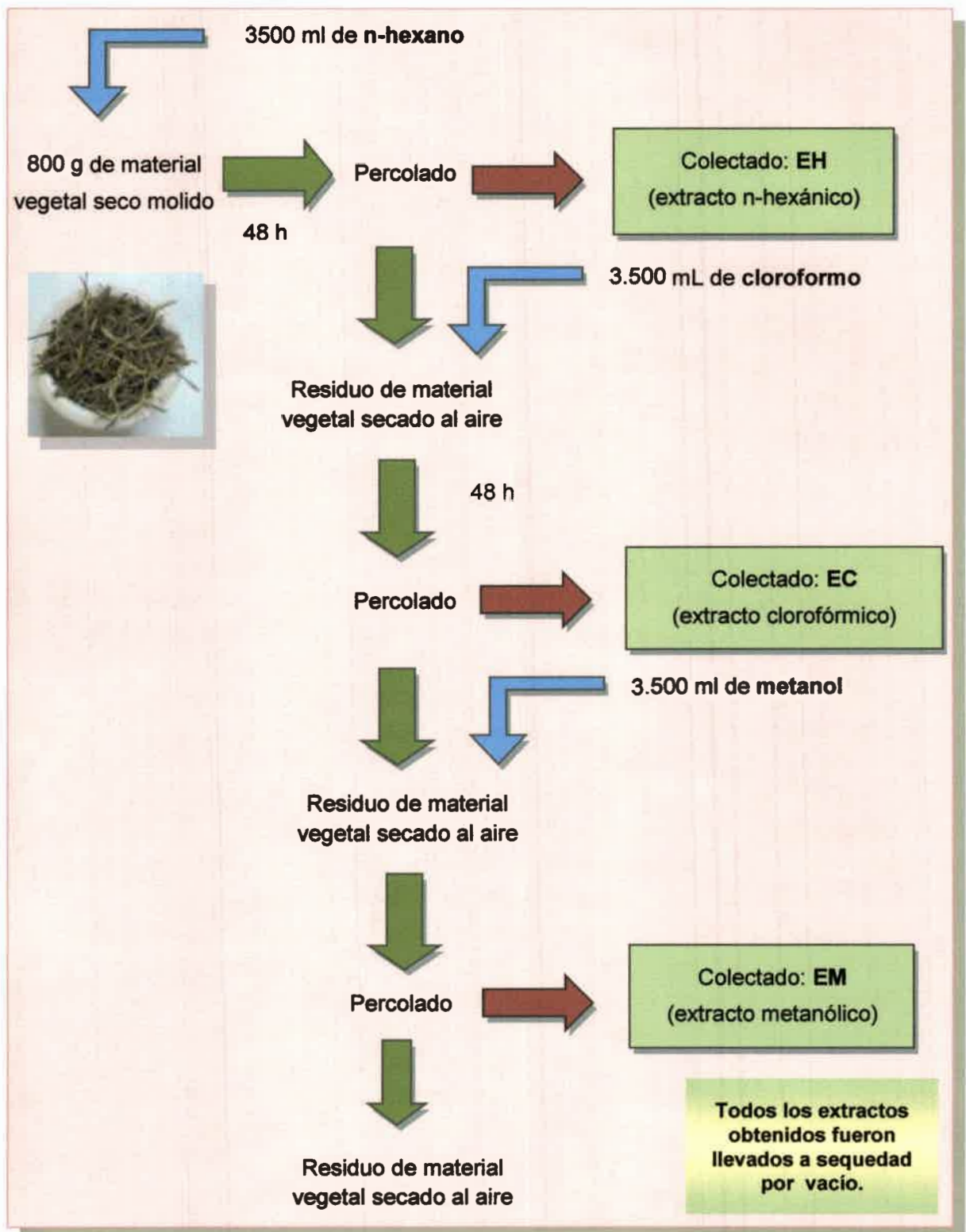
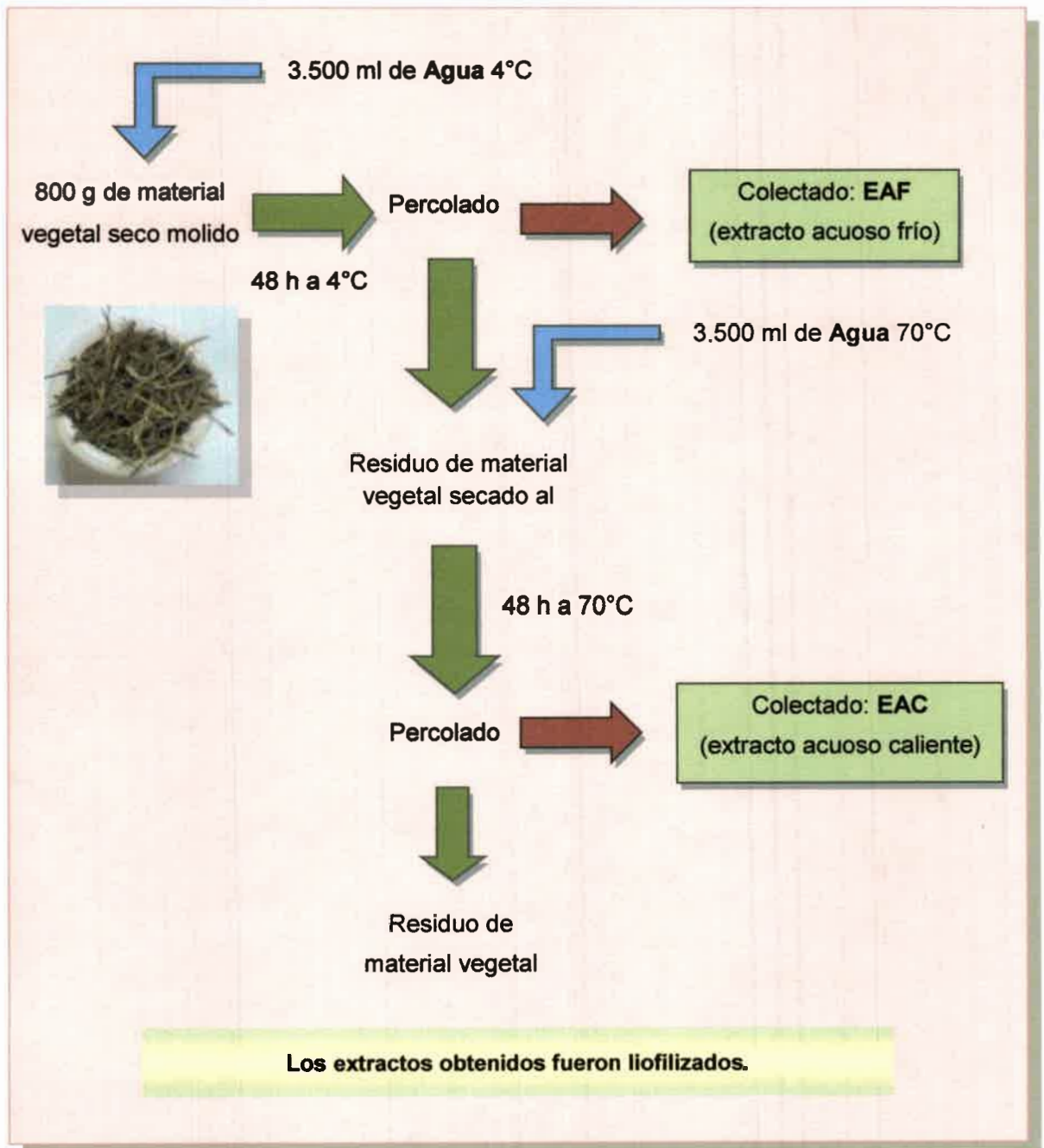




Diagrama 2: Obtención de extractos acuosos de *B. articulata*.





4.2. Propagación y mantenimiento de la línea celular Vero

La línea celular Vero fue sembrada en botellas tipo Cellstar de 25 o 75 cm² de superficie. Cuando la monocapa celular alcanzó la confluencia se lavó dos veces con PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ y se dispersó con solución de tripsina + EDTA 2X. Posteriormente se agregó un volumen adecuado de MC para obtener una concentración aproximada de 2x10⁵ células/ml, la que se sembró en botellas de cultivo estériles y se incubó a 37°C hasta la formación de la monocapa, [Vanella, 1964; Lennette y Schmidt, 1979].

Cuando esta fue conservada por tiempos prolongados el MC fue reemplazado por MM. Para todas las operaciones los reactivos se precalentaron a 37°C.

4.3. Ensayos de citotoxicidad

4.3.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)

Cultivos celulares confluentes crecidos en policubetas de 96 pocillos fueron incubados, en ensayos independientes, con MM conteniendo diferentes concentraciones de cada extracto vegetal en rango de 50-10.000 µg/ml. Como controles del sistema se emplearon:

- ✚ *Control celular*: monocapas celulares cubiertas solamente con MM, sin el extracto vegetal, como indicador de la morfología celular normal.
- ✚ *Control de inocuidad de DMSO*: cultivos celulares cubiertos con MM conteniendo DMSO a la máxima concentración empleada indicada como no tóxica, [Spesia, 2004].

Los cultivos controles y los tratados fueron mantenidos en estufa a 37°C durante 72 h y examinados diariamente al microscopio óptico invertido para evaluar el daño celular. La MCNC fue definida como la máxima concentración del extracto problema que no generó ninguna alteración visible en el sistema celular empleado, [Fukuma, y col., 1991; Calvin, y col., 2000].



4.3.2. Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) por captación del Rojo Neutro

La viabilidad celular fue monitoreada usando el test de captación del Rojo Neutro (RN) según las descripciones de *Borenfreund y Puermen (1985)*, con modificaciones.

El ensayo de captación del RN es un ensayo quimiosensible que evalúa la sobrevivencia y viabilidad celular, basada en la capacidad de las células viables de incorporar y unir el RN, un colorante supravital.

El RN es un colorante catiónico débil que penetra fácilmente las membranas celulares por difusión no iónica, acumulándose intracelularmente en los lisosomas donde se une con sitios aniónicos en la matriz lisosomal. Alteraciones de la superficie celular o de la membrana sensible del lisosoma conduce a una fragilidad lisosomal y a otros cambios que gradualmente se tornan irreversibles. Tales cambios provocados por la acción de xenobióticos resultan en una disminución de la captación y unión del RN. Así, es posible distinguir células muertas, dañadas y vivas, lo cual es la base de este ensayo.

Las células Vero fueron sembradas en policubetas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^4 células/pozo en MC dejándoselas incubar a 37°C durante 48 h. Las monocapas celulares confluentes fueron tratadas durante las siguientes 72 h con diferentes concentraciones de cada extracto, ensayadas por triplicado. Las soluciones fueron luego removidas desde las placas y las células fueron lavadas con 200 ul de PBS/pozo. Luego se agregaron 200 µl/pocillo de una solución de RN (30 µg/ml en MEM) y la placa se llevó a incubar a 37°C por 2 h más para favorecer la incorporación del colorante por las células. Al cabo de ese tiempo las células fueron lavadas 3 veces con PBS. El colorante dentro de las células fue liberado por extracción con una mezcla de ácido acético, etanol y agua (1:50:49). Después de la agitación de los cultivos por 20 minutos se midieron los valores de absorbancia (D.O.) a 540 nm en un lector de ELISA (*Labsystems Multiskan MS*).

Se realizó análisis estadístico para la determinación de un coeficiente de regresión >0.90 (*software Prism 5.0*). El sistema incluyó como control, células sin tratar con los extractos. La viabilidad relativa en los tratamientos fue expresada como porcentaje de RN captado por las células controles y la fracción de sobrevivencia (FS) fue calculada según la siguiente fórmula:

$$FS \% = \frac{\text{D.O. de las células tratadas}}{\text{D.O. de las células control}} \times 100$$



4.3.3. Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) por reducción de sales de tetrazolio (MTT)

La viabilidad celular fue monitoreada usando el test de reducción del MTT. A tal fin se utilizó el equipo Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies, Eugene, Oregon, USA). El MTT es una sal de tetrazolio [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromuro], la cual es clivada por las mitocondrias de las células vivas, dando origen a un producto (formazán) de color azul, el cual puede ser detectado en un espectrofotómetro a 570 nm [Mosmann, 1983].

Las células Vero fueron sembradas en policubetas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^4 células/pozo en MC dejándoselas incubar a 37°C durante 48 h. Las monocapas celulares confluentes fueron tratadas durante las siguientes 72 h con diferentes concentraciones de cada extracto, ensayadas por triplicado. Las soluciones fueron luego removidas desde las placas y las células fueron lavadas con 200 µl de PBS/pozo. Luego se agregaron 100 µl de MM sin suero y 25 µl de la solución MTT (1mg/ml de MTT en PBS 0,01 M pH 7,2) a cada pocillo y la placa fue incubada a 37°C durante 3 h más. Al cabo de ese tiempo, las monocapas son lavadas con 200 µl de PBS por pocillo y descartado éste se agregaron 100 µl de DMSO por pocillo, para disolver los cristales de formazán que resultaron de la conversión del MTT. Se interpretó el resultado por lectura en espectrofotómetro (*Labsystems Multiskan MS*) a 540 nm en un lector de ELISA. Los datos obtenidos por este método fueron sometidos al mismo análisis estadístico de aquellos logrados con RN.

4.4. Producción de stock del virus *Herpes suis* tipo 1

Células Vero crecidas en botellas planas de 25 cm² de superficie se infectaron con una multiplicidad de infección (MI) de 0,2 UFP/célula. Luego de 1 h de adsorción a 37°C se descartó el inóculo y se cubrieron las células con 6 ml de MM, que posteriormente se incubaron a 37°C. A las 72 h post-infección (p.i), los cultivos infectados que mostraban un alto grado de efecto citopático (ECP), se sometieron a 2 ciclos de congelamiento y descongelamiento. Luego, se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 minutos y el stock obtenido a partir del sobrenadante fue conservado a - 40°C. Esta semilla viral fue cuantificada en su título mediante el método de *Dulbecco (1962)* por recuento de placas de lisis permitiendo así conocer la concentración inicial de virus a utilizar en ensayos posteriores.



4.4.1. Titulación de la infectividad viral

La titulación de la infectividad viral se realizó por el método de formación de placas (UFP). Para esto, monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con un inóculo de 100 μ l de diluciones seriadas al décimo, por duplicado, del stock viral o de la muestra a titular. Luego de 1 h de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrió cada cavidad con 0,5 ml de medio de plaqueo. Las microplacas se incubaron a 37°C durante 3 días. Finalmente, se fijaron las células con formol al 10% durante 15-20 min y se revelaron las placas por tinción con cristal violeta al 1% durante 20 minutos.

El título viral se determinó de la siguiente forma:

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

Donde: n = número promedio de placas contadas.

v = volumen del inóculo viral.

d = dilución viral empleada.

4.5. Ensayos antivirales

Con el propósito de estudiar la acción de los extractos vegetales sobre el virus *Herpes suis tipo 1* se llevaron a cabo diferentes ensayos que consistieron en la incorporación de las muestras en los cultivos celulares, en experiencias independientes, a diferentes tiempos del ciclo de multiplicación viral. Se realizó además, la determinación de concentración efectiva 50% y de la inhibición del rendimiento viral.

4.5.1. Estudios de actividad antiviral de los extractos acuosos en distintas etapas del ciclo de replicación viral

4.5.1.a. Posterior a la adsorción y penetración viral

Monocapas confluentes de células Vero desarrolladas en policubetas de 24 pocillos se infectaron con 100 μ l de concentración fija de virus (del orden de 10^5 o 10^6 UFP/ml), por duplicado. Se llevó a incubar por 90 min a 37°C para permitir la adsorción y penetración viral. Luego se descartó el inóculo remanente y los cultivos infectados se incubaron con MP conteniendo la muestra vegetal a su MCNC.



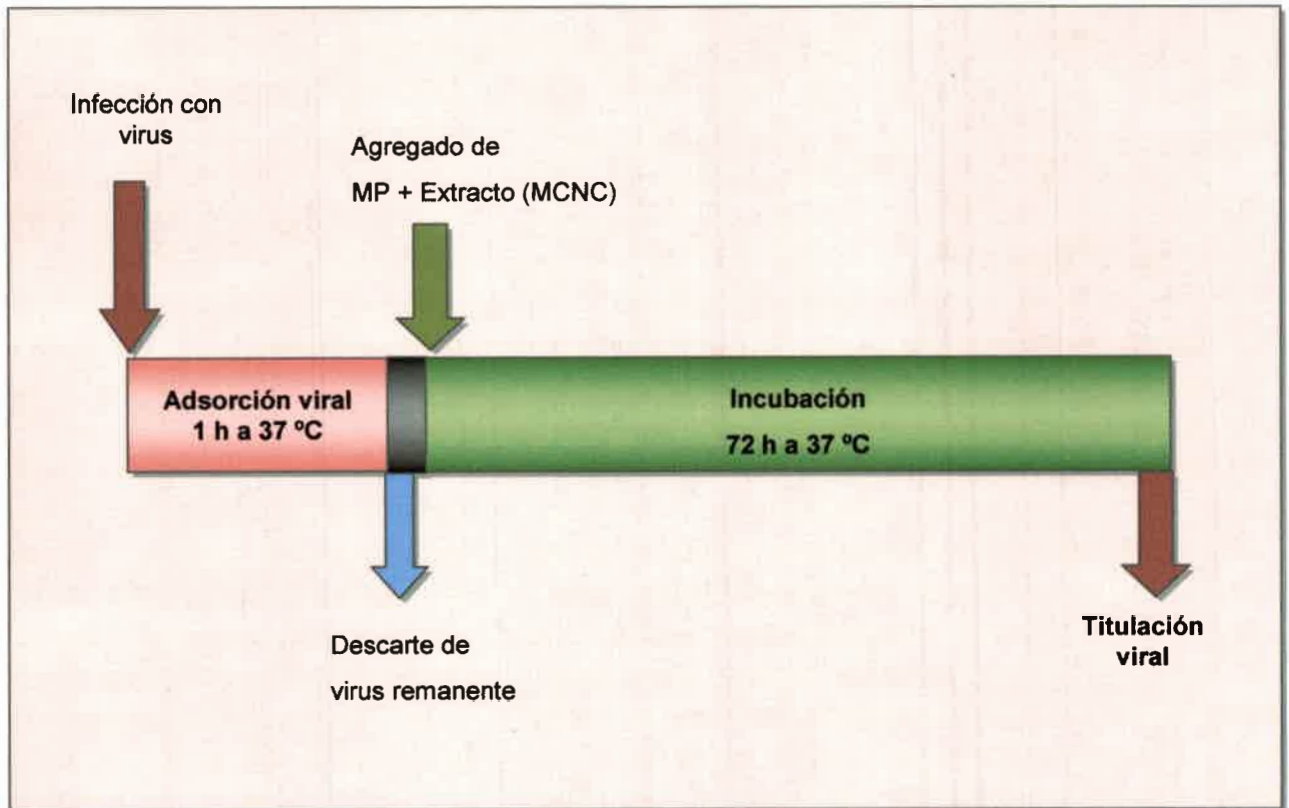
En simultáneo se realizaron los siguientes controles:

- ✓ **controles celulares:** cultivos no infectados ni tratados con la muestra en estudio.
- ✓ **controles virales:** cultivos sólo infectados con virus a la misma concentración.
- ✓ **control de inocuidad de la fracción vegetal:** cultivos no infectados pero tratados con el extracto problema a su MCNC.

Todos los cultivos celulares fueron incubados a 37°C por 72 h, momento en el que se calcularon los títulos virales, (control y tratado) por recuento de placas de lisis, como se describió en el apartado 4.4.1.

En el **Diagrama 3** se presenta un esquema de la metodología aquí detallada.

Diagrama 3: Ensayo de actividad antiviral post-adsorción y penetración viral, de extracto acuoso a su MCNC





El porcentaje de inhibición viral, es decir la actividad antiviral, fue calculado en función de la reducción de la infectividad viral en los cultivos tratados respecto a los controles virales. Para esta determinación se empleó la siguiente fórmula, [García, 1990]:

$$\text{Inhibición Viral (\%)} = 100 - \frac{A}{B} \times 100$$

Siendo A = título viral en los cultivos tratados con la muestra.

B = título viral en los cultivos no tratados.

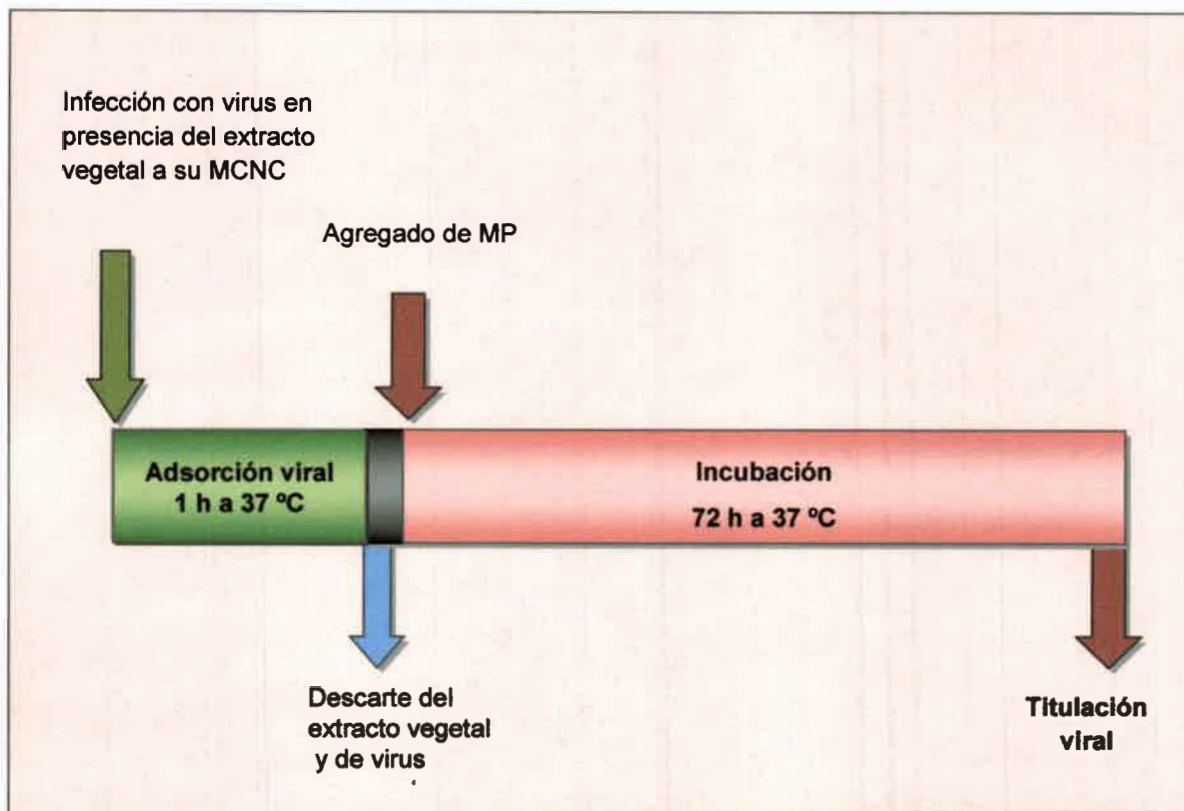
4.5.1.b. Durante la adsorción y penetración viral

Cultivos celulares confluentes desarrollados en policubetas de 24 pocillos se infectaron con 100 μ l de concentración fija de virus (del orden de 10^5 o 10^6 UFP/ml) en presencia del extracto problema a su MCNC, por duplicado. Después de incubar 90 min a 37°C, se descartó el virus residual y los cultivos se cubrieron con MP. En esta experiencia se realizaron los mismos controles que en el ensayo anterior.

Todos los cultivos celulares se incubaron a 37°C por 72 h y posteriormente se calcularon los títulos virales (control y tratado), tal como se indica en el apartado 4.4.1. El siguiente diagrama resume el procedimiento descripto.



Diagrama 4: Ensayo de actividad antiviral durante la adsorción y penetración viral, de extracto acuoso a su MCNC.



La actividad antiviral fue determinada empleando la fórmula indicada en el punto 4.5.1.a.

4.5.2. Pre-tratamiento de los cultivos celulares con extractos acuosos

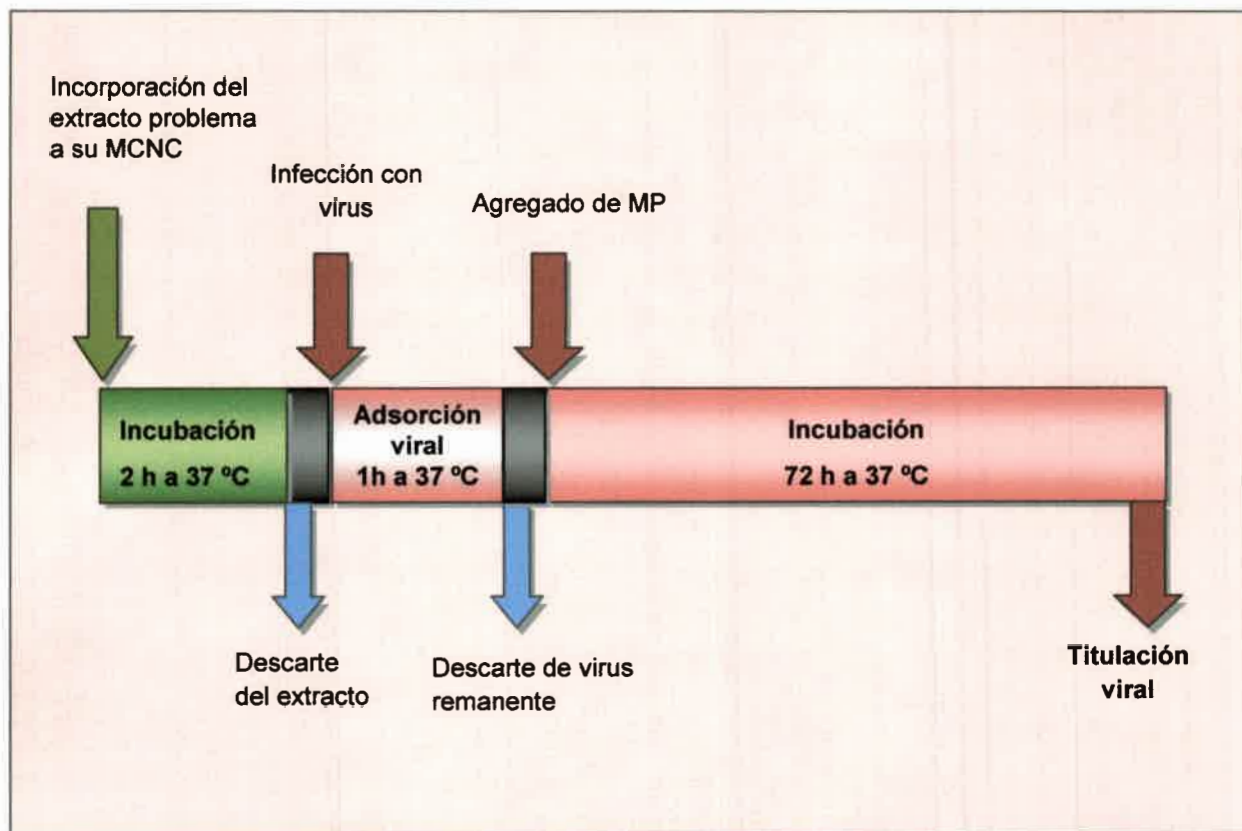
Monocapas celulares crecidas en policubeta de 24 pocillos se trataron con el extracto problema a su MCNC durante 2 h a 37°C. Cumplido ese tiempo se removió la solución de los cultivos y se infectaron con 100 µl de concentración fija de virus (del orden de 10^5 o 10^7 UFP/ml) por pocillo, por duplicado. Luego de transcurrido el periodo de adsorción y penetración viral, se descartó el virus remanente y los cultivos fueron cubiertos con MP. El ensayo incluyó idénticos controles que en el apartado anterior, [Zanon, 2005].

Todas las monocapas fueron incubadas a 37°C por 72 h; posteriormente se calculó el título viral como se describió en el apartado 4.4.1.

Esta metodología se exhibe en el Diagrama 5.



Diagrama 5: Ensayo de tratamiento celular con el extracto acuoso, previo a la infección viral.



El porcentaje de inhibición viral fue calculado según la fórmula detallada en el apartado 4.5.1.a.

4.5.3. Actividad virucida con extractos acuosos

Con el objeto de analizar la capacidad virucida de los extractos, se midió la inactivación del virus por contacto directo de éste con el extracto problema utilizado a 1 o 2 veces su valor de MCNC, en ensayos independientes.

Para llevar a cabo esta experiencia se mezclaron volúmenes iguales de extracto, a una determinada concentración, y de una suspensión viral (título aproximado 10^6 UFP/ml). Esta mezcla se incubó a 37°C durante 2 h. Paralelamente, como control de infectividad viral se empleó la misma suspensión de virus pero sin el extracto vegetal problema, el que fue sometido a idénticas condiciones experimentales, [Hayashi, 1995].

Finalizado el periodo de incubación y con el propósito de cuantificar el grado de inactivación ejercido por la muestra vegetal, se efectuaron diluciones seriadas factor 10 del



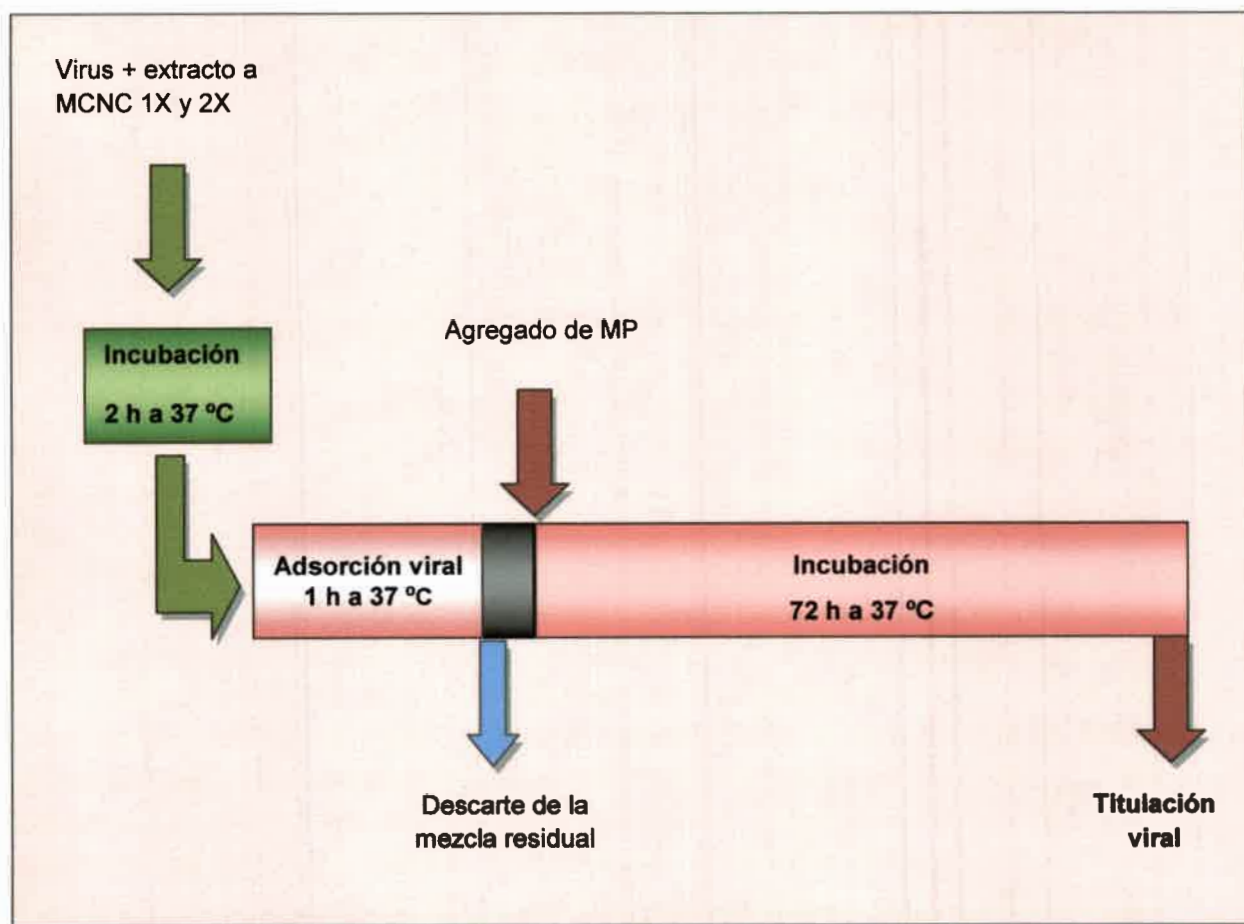
virus tratado y virus control con las cuales se infectaron las monocapas celulares preformadas. En este ensayo los controles fueron:

- ✓ **controles celulares:** cultivos no infectados ni tratados con la muestra en estudio.
- ✓ **controles de inocuidad de la fracción vegetal:** cultivos no infectados pero tratados con el extracto problema a la concentración ensayada.

Todos los cultivos celulares fueron incubados a 37°C por 72 h. A continuación se calculó el título viral como se describió en el punto 4.4.1.

El **Diagrama 6** exhibe el procedimiento antes descrito.

Diagrama 6: Ensayo de la acción virucida de los extractos acuosos.





A partir de los títulos virales obtenidos en esta experiencia fue posible calcular el porcentaje de acción virucida del extracto empleando la siguiente fórmula, [Zanon, 2005]:

$$\text{Acción virucida (\%)} = 100 - \frac{T}{C} \times 100$$

Siendo T = título viral en los cultivos tratados con la muestra.

C = título viral en los cultivos no tratados.

4.5.4. Determinación de la Concentración Efectiva 50% (CE₅₀)

La CE₅₀ del EAC se estableció a través de la reducción del número de placas de lisis. Monocapas de células Vero desarrolladas en policubeta de 24 pocillos fueron infectadas por duplicado con 60 UFP/pocillo de virus *Herpes suis tipo 1*, en presencia del EAC utilizado a distintas concentraciones (400-700 µg/ml) e incubadas por 1 h a 37°C. Luego, se descartó el virus residual con la muestra vegetal y los cultivos se cubrieron con MP.

Se incluyeron en este ensayo:

- **controles celulares:** cultivos no infectados ni tratados con la muestra vegetal.
- **controles virales:** células infectadas con 60 UFP/pocillo de virus.
- **Controles de inocuidad de extracto:** Incluyeron células con MM solo a las que luego se les adicionó MP conteniendo concentraciones crecientes de extracto.

Los controles fueron cubiertos con MP e incubados durante todos los pasos del ensayo en las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

Todos los tratamientos se realizaron por duplicado. Los cultivos tratados y controles se incubaron durante 72 h a 37°C, tiempo en que se procedió al recuento de placas de lisis.

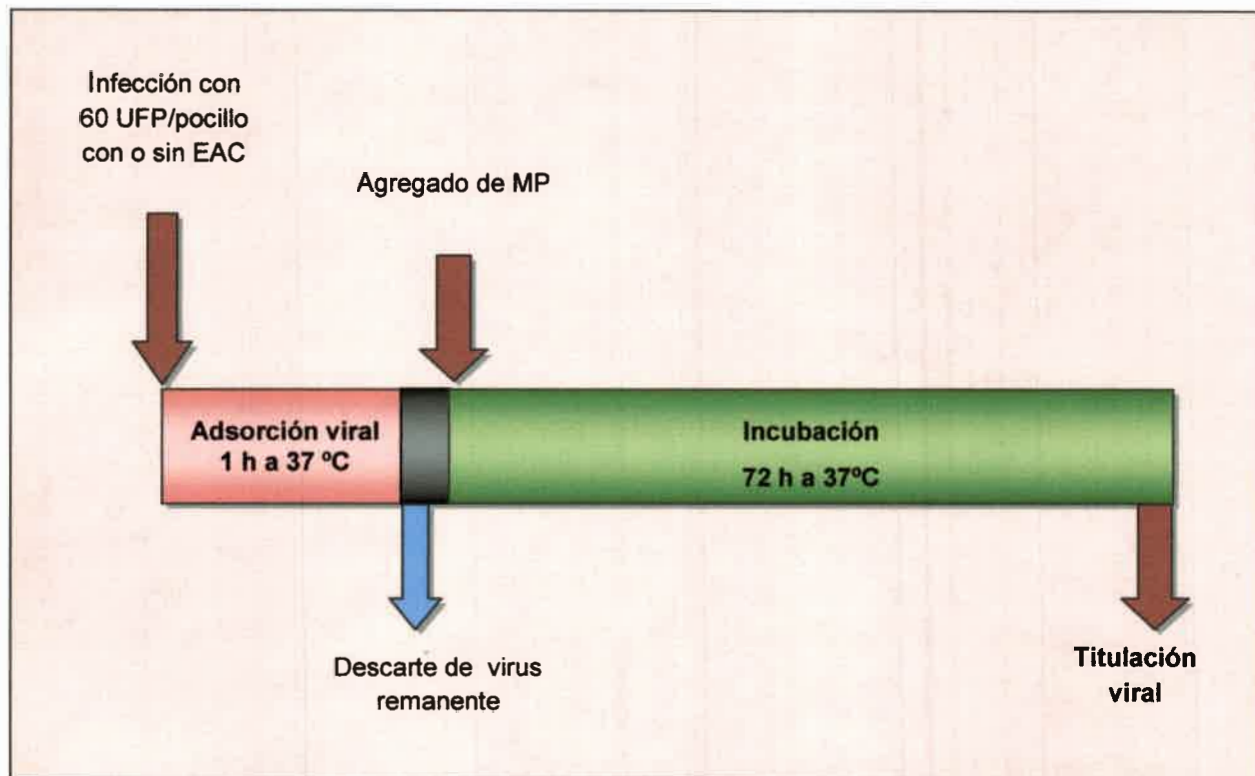
El porcentaje de inhibición viral, se determinó de la misma manera a como se indica en el apartado 4.5.1.a

Los distintos porcentajes de inhibición viral obtenidos permitieron construir la curva dosis-respuesta a partir de la cual se determinó la CE₅₀. Este parámetro se define como la concentración del compuesto en estudio (extracto acuoso) que reduce la multiplicación



viral (número de UFP) a un 50% con respecto al control viral. El siguiente diagrama se resume el procedimiento desarrollado.

Diagrama 7: Ensayo de la actividad antiviral para la determinación de la CC_{50} por EAC.



4.5.5. Cálculo del Índice de Selectividad

Este índice revela la relación que existe entre la acción tóxica que ejerce un determinado compuesto sobre un sistema celular y la capacidad del mismo para inhibir al virus en estudio. Este valor es imprescindible para establecer la toxicidad selectiva de un nuevo agente antiviral.

Con los valores de CC_{50} obtenidos por ambas técnicas de citotoxicidad y CE_{50} , se calculó el índice de selectividad (IS) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de selectividad (IS)} = \frac{CC_{50}}{CE_{50}}$$



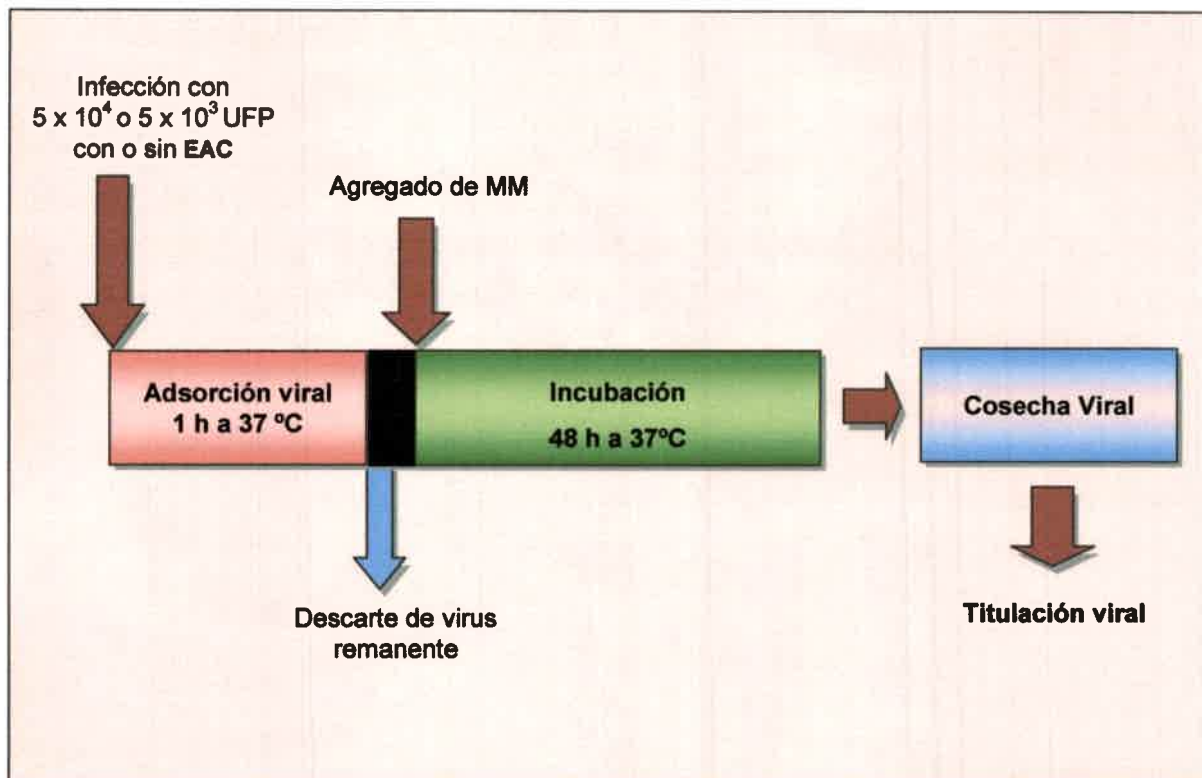
4.5.6. Determinación de la Inhibición del rendimiento viral

En esta metodología se trabajó con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 y de 0,01. La MOI es la relación que existe entre la dosis viral y la cantidad de células expuestas a esa dosis. Las MOI de 0,1 y de 0,01 equivalen a una relación de 10 y 100 células por partícula viral, respectivamente.

Cultivos celulares confluentes (5×10^5 células viables) desarrollados en botellas de cultivo de 2 ml de capacidad, fueron inoculados con 200 μ l de 5×10^4 o de 5×10^3 UFP de virus *Herpes suis* tipo 1 en presencia y/o ausencia del EAC. Las concentraciones del EAC ensayadas fueron 550 y 700 μ g/ml. Los cultivos tratados y controles se llevaron a incubar por 1 h a 37°C para permitir la adsorción de los virus a las células. Posteriormente, se procedió a descartar el inóculo no adsorbido y se agregó 2 ml de MM, incubándose por 48 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo los cultivos se sometieron a 1 ciclo de congelación y descongelación para facilitar la liberación de todas las partículas virales (cosecha viral). A continuación, se centrifugó a 2.000 rpm por 15 minutos a fin de descartar los restos celulares y se procedió a determinar el título viral en los sobrenadantes obtenidos, mediante ensayo de unidades formadoras de placas. El porcentaje de inhibición viral fue calculado de la misma manera que en lo indicado en el punto 4.5.1.a. El **Diagrama 8** se presenta un esquema de la metodología aquí detallada.



Diagrama 8: Ensayo de la Inhibición del rendimiento viral durante la adsorción viral por el EAC.



4.5.7. Determinación de la actividad antiviral de té de *B. articulata*

Se preparó una infusión con 1 g de partes aéreas molidas de *B. articulata* en 100 ml de agua a 70°C, dejándose reposar 25 min. La infusión fue esterilizada por filtro millipore de 0,22 µm, [Alonso y Desmarchelier, 2006]. Para la determinación de la actividad antiviral durante la adsorción y penetración viral, se procedió como se indicó en metodología, apartado 4.5.1.b.



4.6. Estudio del potencial genotóxico del extracto acuoso caliente de *B. articulata*

4.6.1. Estudios *in vitro*: determinación de muerte celular por tinción y por fragmentación nuclear en linfocitos humanos

Para la realización de estos estudios fue necesario obtener y preparar las células mononucleares y someterlas a cultivos en policubetas. A tal fin, se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica extraída con anticoagulante de individuos voluntarios sanos de 20 a 30 años de edad. Este protocolo está avalado por el comité de ética N°075/12. La sangre se colocó en tubos cónicos estériles que contenían Hystopaque® - 1077 (Ficoll-Hypaque) en una relación 1:1 para separar las células mononucleares por gradiente de densidad. La solución de Hystopaque® contiene polisacarosa, diatrizoato de sodio y $\delta = 1077$. La polisacarosa produce la aglutinación de los eritrocitos logrando que éstos sedimenten y el diatrizoato de sodio le confiere a la mezcla la densidad requerida para la separación de las células mononucleares.

La sangre se centrifugó a 2.000 rpm por 30 min a temperatura ambiente. Durante la centrifugación, los eritrocitos y granulocitos sedimentaron a través del Hystopaque®, mientras que las células mononucleares permanecieron sobre él formando un halo opaco el que fue luego aspirado cuidadosamente con pipeta Pasteur. Las células mononucleares fueron colocadas en un tubo cónico y lavadas 2 veces, durante 10 min, con medio RPMI-1640 adicionado de 25 mM de Hepes, 2 mM de L- glutamina, 5 % de SFB, 50 mM de 2-mercaptoetanol (2-ME), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin (RPMI-1640 completo), [Mongini y Waldner, 1996]. Luego fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 completo.

El recuento de células viables se realizó mediante la técnica de tinción por exclusión al azul tripán según describe Mongini y Waldner (1996). El azul de tripán se preparó al 0,2 % (p/v) en agua destilada, y en el momento de usar se mezclaron 4 partes del colorante con 1 parte de NaCl al 4,5 %. El recuento de células viables se efectuó en cámara de Neubauer. Se calculó el porcentaje de células viables aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células viables}}{\text{N}^\circ \text{ total de células}} \times 100$$



4.6.1.a. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC₅₀) mediante tinción por exclusión al azul tripán

Las células mononucleares (PBMCs) aisladas fueron enfrentadas a diferentes concentraciones del EAC de *B. articulata*: 100, 200, 400, 600, 800, 1000 y 1500 µg/ml durante un periodo de 18 a 24 h. Al cabo de ese tiempo se determinó la viabilidad celular mediante recuento por tinción por exclusión al azul tripán.

4.6.1.b. Tinción nuclear con Hoechst 33258 para la visualización de apoptosis en células mononucleares humanas

Fundamento:

Los colorantes Hoechst (bis-benzimidaz) son parte de una familia de colorantes fluorescentes empleadas para detectar el ADN celular en un microscopio de fluorescencia o mediante un citómetro de flujo. Debido a que son capaces de unirse al ADN son utilizados comúnmente para visualizar núcleos y mitocondrias. Los dos colorantes más usados son Hoechst 33258 y Hoechst 33342. Ambos son excitados por luz ultravioleta cerca de los 350 nm y emiten una luz fluorescente azul/violeta cerca de los 460 nm. Este tipo de colorantes puede usarse sobre células vivas o fijadas y son también utilizados para sustituir a otros colorantes de ácidos nucleicos, como el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Debido a que los colorantes Hoechst se unen al ADN, pueden interrumpir su replicación durante la división celular, por lo que consecuentemente, son potencialmente mutagénicos y carcinogénicos. Se debe tener cuidado durante su manipulación.

Procedimiento:

Una vez obtenidas las células mononucleares se realizó el cultivo de las mismas en placa estéril de 96 pocillos. Se colocaron las células empleando una concentración de 2×10^5 por pocillo en un volumen final de 200 µl de RPMI-1640 completo conteniendo la CC₅₀ del EAC de *B. articulata*. Se incluyó como control positivo el tratamiento de células PBMCs enfrentadas a una solución de H₂O₂ previamente calibrada. Como control de todo el sistema se emplearon células sin H₂O₂ ni EAC, con RPMI-1640 completo. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Se incubó la placa en estufa con tensión de CO₂ a 37°C durante 18-24 h. Al cabo de ese tiempo se recolectaron las células en eppendorf estériles y se centrifugaron en una micro-centrífuga durante 10 min a 1000 rpm, descartándose el sobrenadante. Posteriormente, para fijar las células se agregaron 30 µl de una solución fría (a -20°C) de



metanol. Luego se agregaron 5 μ l de Hoechst 33258 (1 mg/ml en agua destilada). Los eppendorf con la suspensión celular fueron conservados a -20°C hasta su visualización.

Para el análisis del daño celular se colocó una alícuota de la suspensión celular sobre un portaobjetos que se cubrió con un cubreobjetos para visualizar las células en el microscopio de fluorescencia con filtro de longitud de onda de 330 a 380 nm.

Se contaron 100 células totales y se calculó el porcentaje de células apoptóticas, las que se caracterizan por presentar cambios en su morfología nuclear tales como núcleos arriñonados, condensación de cromatina, fragmentación del ADN y pequeñas ampollas nucleares [Genhong y col., 2006].

4.6.1.c. Ensayo de fragmentación de ADN

El aislamiento de ADN fragmentado a partir de las células cultivadas en las policubetas se efectuó de acuerdo a las descripciones metodológicas de Amirghofran y col. (2007) con modificaciones. Brevemente, las células (2×10^5 células/pocillo) fueron expuestas a diferentes concentraciones del EAC de *B. articulata* (600-1500 $\mu\text{g/ml}$) y luego fueron colectadas por centrifugación durante 15 min a 2600 rpm. Células cultivadas solo con el medio RPMI representaron el sistema control. El precipitado fue resuspendido en 0,5 ml de buffer de lisis de ADN. El lisado fue inmediatamente incubado con 0,1 mg/ml de proteinasa K y 0,5 mg/ml de RNAasa A durante 3 h a 37°C . Luego se agregaron 200 μ l de CINa 3 M y se centrifugó por 15 min a 3000 rpm. Posterior a la adición de isopropanol, el ADN fue precipitado con etanol al 70 %. Las muestras fueron sembradas en gel de agarosa al 2 % y sometidas a electroforesis. El patrón de bandas de ADN fue visualizado con luz UV efectuando previamente tinción con bromuro de etidio.



4.6.2. Estudio *in vivo* de citogenotoxicidad mediante el test de *Allium cepa* L.

Se desarrolló el test de *Allium* descrito por Fiskesjö, (1993, 1994, 1997) en el que se emplean bulbos de cebolla de la especie *Allium cepa* L. Las concentraciones ensayadas de EAC para este ensayo fueron 600, 1200, 2400, 3600 y 4800 µg/ml.

1. A las cebollas seleccionadas se les extrajeron las catáfilas externas coloreadas, con el cuidado de no producir daño en las catáfilas blancas.
2. Se eliminó con un corte neto el brote apical y las porciones necrosadas del disco inferior.
3. Con bisturí se raspó el disco por sus bordes hasta visualizar los primordios radiculares.
4. Los bulbos se lavaron con abundante agua corriente y se colocaron individualmente en frascos de vidrios con agua mineral hasta un nivel que cubriera el disco radicular. Luego de un par de horas generalmente fue necesario reponer el agua a su nivel adecuado, debido al fenómeno de absorción de la misma por parte de los bulbos.
5. Los bulbos se mantuvieron en estas condiciones durante 48 h a temperatura ambiente, renovando el agua cada 24 h y lavando suavemente la porción inferior del bulbo con agua corriente en cada cambio.
6. Transcurridas las 48 h, aquellos bulbos que desarrollaron raíces entre 1-2 cm de longitud fueron seleccionados para el ensayo.
7. Los bulbos se dividieron en 5 lotes para el tratamiento con las concentraciones de extracto a ensayar, reservando un lote como control negativo (sólo con agua mineral) y otro para el control positivo (Paracetamol). Se utilizaron 4 bulbos por lote.
8. Se renovaron las soluciones de prueba y de los controles cada 24 h.
9. Transcurridas 48 h (dos ciclos celulares), se extrajeron 3 raicillas por bulbo y se fijaron en una mezcla de etanol absoluto: ácido acético glacial por 12-15 h y hasta un máximo de 24 h a 4°C. Luego las raicillas se transfirieron a una solución de etanol 70° y se siguieron conservando a la misma temperatura hasta el momento del estudio citogenético que permitiera definir, entre otros parámetros, el valor del primer Índice Mitótico (IM1).



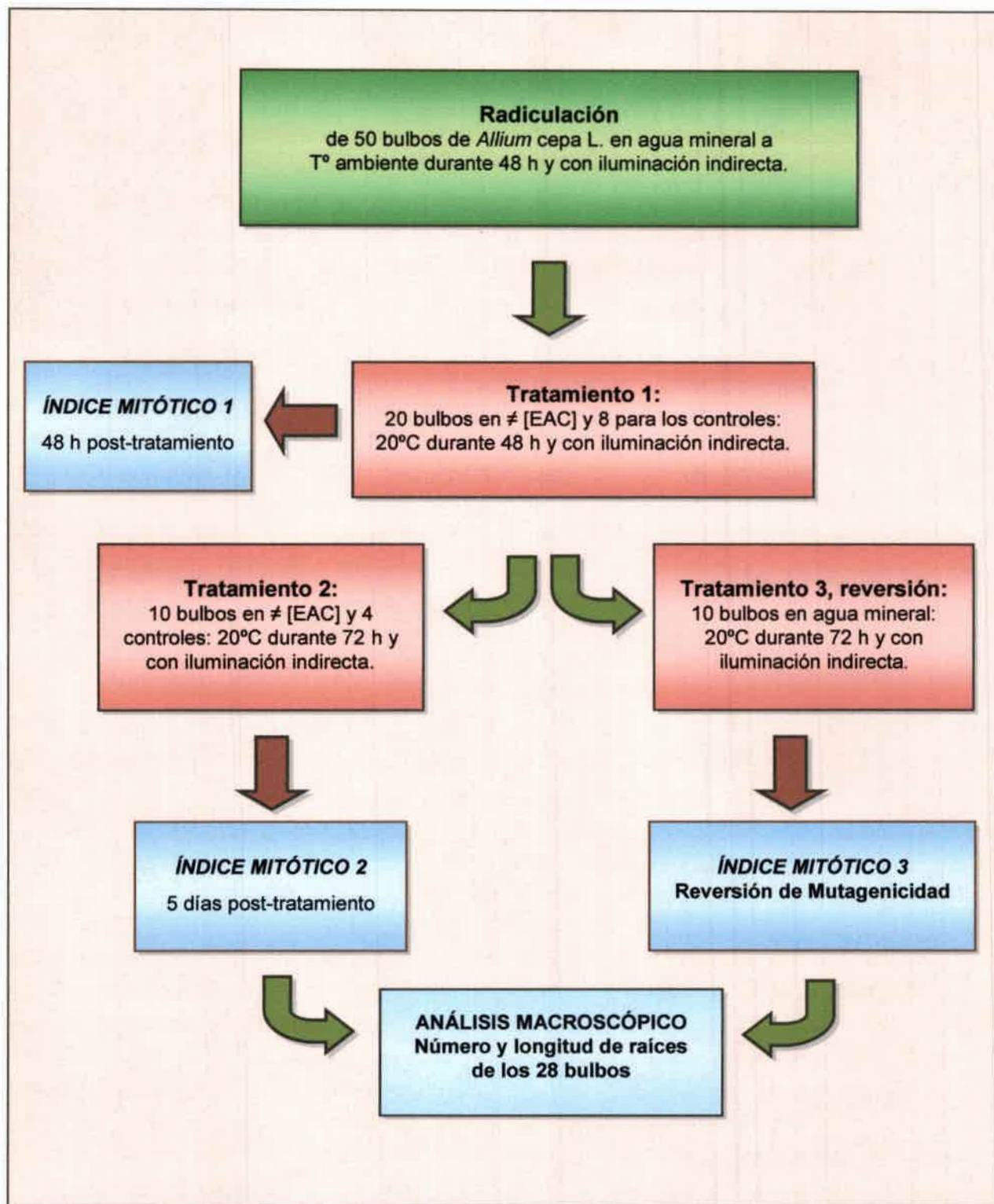


10. De los 4 bulbos por lote, 2 de ellos se mantuvieron en tratamiento diario con los extractos hasta completar 5 días. Finalizado ese tiempo, todas las raíces fueron analizadas macroscópicamente y 3 de ellas fueron sometidas a fijación, tal como se describe en el punto anterior, para definir un nuevo valor de índice mitótico, IM2.
11. Desarrollo de la prueba de reversión de mutagenicidad: Este estudio implicó someter los 2 bulbos restantes, tratados durante 2 días con extracto, a la acción de agua mineral durante 3 días. Al final del ensayo (quinto día del inicio de la prueba) se extrajeron 3 raicillas las que fijadas como se indicó, fueron sometidas a estudios citogenéticos para el cálculo del IM3.

La metodología descrita se resume en el siguiente **Diagrama**.



Diagrama 9: Ensayo *in vivo* de la evaluación del potencial citogenotóxico del EAC de *B. articulata* mediante el Test de *Allium cepa* L.





4.6.2.a. Análisis de parámetros macroscópicos

Al final del ensayo, todas las raíces de cada bulbo se cortaron por su base y se almacenaron en envases independientes en etanol a 70° para completar el estudio de los parámetros macroscópicos.

Los daños macroscópicos evaluados se refirieron a modificaciones en la estructura de las raíces: cambio de forma, aparición de ganchos radiculares, tumores, gelatinización, pigmentación, necrosis; así como modificaciones en el número y longitud de dichas raíces, [Bidau y col., 2004]. Se efectuó análisis estadístico desarrollando el test de ANOVA (1 way ANOVA. Tukey's Multiple Comparison test) mediante aplicación del software *GraphPad Prism 5.0*.

4.6.2.b. Análisis de parámetros microscópicos

Para cumplir este objetivo se emplearon las raíces conservadas en la solución de fijación etanol 70°, desarrollándose la técnica de tinción con orceína aceto-acética, [Dyer, 1963].

1. Las raicillas de cada bulbo se extrajeron del etanol, se les eliminó la cofia bajo lupa usando como soporte un portaobjetos.
2. Las células del tejido apical se hidrolizaron en ácido clorhídrico 1N a temperatura ambiente por tiempos variables, no más de 3 min, y luego se efectuó la tinción con orceína aceto-acética durante 5-10 min, macerando el tejido con golpes suaves aplicados con varilla de vidrio esmerilada en su extremo.
3. Se agregó una gota más de orceína, se colocó un cubreobjetos y se realizó el *squash*. Los preparados se sellaron con cera vegetal y se rotularon. Se mantuvieron en recipientes de plástico para evitar la deshidratación, hasta su análisis al microscopio de luz.
4. Para cada bulbo tratado se contaron no menos de 2.000 células. Se evaluó la presencia de alteraciones en las distintas fases del ciclo celular: Interfase (I), Profase (P), Metafase (M), Anafase (A) y Telofase (T). Estos datos fueron utilizados para cuantificar alteración en el IM y en el índice de fases (IF) vs. evaluación de los mismos datos en el sistema testigo. Las fórmulas para el cálculo de dichos parámetros fueron las siguientes, [Rank, 2003]:



$$IM = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células en división}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células totales}} \times 100$$

$$IF = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células en c / fase}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células en división}} \times 100$$

Basado en la literatura [Rani, 2005], se analizaron:

Aberraciones fisiológicas: c-mitosis, cromosomas pegajosos, células binucleadas, cromosomas retardados y/o adelantados en anafase.

Aberraciones clastogénicas: puentes entre cromosomas, ruptura de cromosomas y presencia de micronúcleos.

Todos los datos se evaluaron estadísticamente mediante la aplicación del software *GraphPad Prism 5.0*.

4.6.2.c. Registro de imágenes

Las imágenes de las alteraciones microscópicas fueron registradas en un microscopio óptico de campo brillante complementado con cámara fotográfica digital marca Sony Cyber-shot con lente Carl Zeiss Vario Tessar 2,8-5,2/6-18 y 4,1 mega pixels MPEGMovie VX y Picture Package versión 1.6. La misma cámara digital fue empleada para documentar las alteraciones macroscópicas.

4.7. Caracterización fitoquímica parcial de compuestos presentes en el extracto acuoso caliente de *B. articulata*

4.7.1. Ensayos preliminares de caracterización fitoquímica: técnicas cromatográficas y espectroscópicas

De acuerdo a registros bibliográficos sobre los compuestos químicos con actividad biológica de *Baccharis articulata* se resolvió buscar las siguientes familias de compuestos: terpenoides, ácidos orgánicos y flavonas en el EAC de esta especie vegetal y compararlos con compuestos testigos, [De Oliveira, 2003; Gianello y col., 2000; Verdi y col., 2005, Martino y col., 1989; Torres Osuna y col., 2005, Abad y col., 2005].

A fin de separar e identificar los componentes que se encuentran en el EAC de *B. articulata* se realizaron cromatografías en papel (CP) y en capa delgada (CCD), espectroscopia UV-Visible y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). A través de estas técnicas los componentes del extracto se separan en función de la afinidad que



tienen con las distintas fases y estos se correlacionan o no con las sustancias de referencia.

Para determinar la presencia de cada familia de compuestos, el EAC fue procesado de forma particular de acuerdo a cada tipo de compuestos químicos.

Con el fin de obtener los compuestos apolares presentes en la compleja matriz del extracto acuoso, estos fueron extraídos con éter etílico. Mediante la reacción de coloración para flavonoides (Shinoda) [Geissman, 1962], las flavonas fueron preliminarmente identificadas.

4.7.1.a. Reacción de Shinoda

Esta reacción permite la detección de flavonas, [Geissman, 1962]. A unas trazas de EAC se le agregaron 3 ml de agua destilada llevándose a sonicar para lograr la disolución total. Se realizó una partición en éter etílico de la solución obtenida en una ampolla (presión reducida) en campana de extracción y mezclando suavemente las dos fases sin llegar a la emulsión, permitiendo la liberación de vapores y dejando la ampolla en posición vertical para la separación de fases. Este procedimiento fue repetido durante 20 min. A continuación se descartó la fase acuosa y la fase etérea se llevó a un balón de rotavapor para la extracción del éter. El residuo del balón fue recuperado con 2 ml de agua destilada y se colocó en un tubo de hemólisis para efectuar la reacción de Shinoda.

A los compuestos recuperados se le agregaron gotas de HCl concentrado y luego limadura de Mg bajo campana de extracción. Cuando la reacción terminó (no se evidencian burbujas) se realizó una partición con 0,5 ml de n-butanol, mezclándose cuidadosamente. De acuerdo a la coloración obtenida de la mezcla en n-butanol se infirió el tipo de familias de compuestos presentes.

Se efectuó una CP en dos dimensiones para evidenciar la presencia de flavonas (manchas de coloración amarilla) como confirmación de la reacción de Shinoda.

4.7.1.b. Cromatografía en papel en dos dimensiones del EAC

Con una pequeña cantidad de EAC disuelto en etanol se sembró en papel Whatman N°1. El cromatograma con la siembra de la muestra vegetal fue llevado a una cuba cromatográfica con mezcla de solventes BAW (n-butanol-acido acético-agua destilada 50 ml (4:1:5) con corrida de forma ascendente (de abajo hacia arriba) y bajo campana extractora.



Una segunda corrida se realizó también de forma descendente pero con una solución de ácido acético al 5 % (de izquierda a derecha), bajo campana extractora.

Posterior al secado de la cromatografía en campana extractora se iluminó con UV para la observación de los compuestos separados.

4.7.1.c. Cromatografía en papel del EAC

Para la identificación de las flavonas se realizó una CP frente a las sustancias de referencias que fueron: acacetina y luteolina (flavonas) y quercetina (flavonol). Para este ensayo se tomó una pequeña cantidad de EAC al que se le agregó unas gotas de etanol, y para la disolución total se llevó a un sonicador por unos minutos. Se realizó la siembra en papel Whatman N°1. Los valores de relación de frente (R_F) fueron calculados en tres fases móviles diferentes, [Mabry y col., 1970; Harborne y col., 1984]:

- BAW = n-butanol- ácido acético- agua (4:1:5).
- TBA = n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1).
- Solución de ácido acético (15%).

La CP fue tratada con vapores de NH_3 y revelada con luz UV. Luego, se realizó una CP preparativa en papel Whatman N°3, con extracto etéreo y fue desarrollado en TBA. Las manchas con valores de R_F coincidentes con las sustancias de referencia fueron eluidas con metanol y caracterizadas por espectrofotometría UV-visible.

Considerando la frecuente aparición de ácidos cafeoilquínicos, especialmente ácido clorogénico en las especies del género *Baccharis* [Martino y col., 1989], se llevó a cabo la determinación de este metabolito en el EAC. Así, otra fracción del extracto acuoso seco fue disuelta en etanol y analizada por dos diferentes técnicas cromatográficas (CP y CCD) usando ácido clorogénico e isoclorogénico como sustancia de referencia. La CP fue desarrollada en una solución de ácido acético al 15 %.

En todos los casos se trabajó en campana extractora y luego del secado de la cromatografía, se trató con vapores de NH_3 e iluminó con UV y para la observación de los compuestos separados.

4.7.1.d. Cromatografía en capa delgada

Una pequeña cantidad de EAC se disolvió en etanol y para la disolución total se llevó a un sonicador por unos minutos. Se realizó la siembra del EAC frente a dos testigos: ácido clorogénico e isoclorogénico sobre placa de sílica gel 60 F₂₅₄ sin indicador de



fluorescencia. La fase móvil consistió en un sistema de solvente conformado por acetato de etilo–metanol-agua (10:1,7:1). Posterior al secado de la cromatografía, se iluminó con UV para la observación de los compuestos del EAC (manchas) y comparación con los testigos.

Para determinar la presencia de Bacchotricuneatina A, una fracción del EAC se disolvió en metanol-agua (7:3) y se realizó una extracción desde esa solución con Cl_3CH . La fase Cl_3CH obtenida se analizó por CCD en placa de sílica gel 60 F₂₅₄, por comparación con el compuesto testigo y usando benceno-diozono-ácido acético (30:5:1) como fase móvil. La placa de CCD fue revelada mediante el tratamiento con ácido sulfúrico-ácido acético-agua (4:20:1), vaporizado e inmediatamente se calentó a 110°C, [Gianello y col. 2000].

Para determinar la presencia de Santonina se tomó una fracción del EAC y se disolvió en agua y desde allí se realizó una extracción en Cl_3CH . Con la fase Cl_3CH obtenida se realizó una CCD contra testigo donde se utilizó como fase móvil:

- Benceno-acetato de etilo (95:5)
- Cl_3CH -acetato de etilo (1:1)
- Benceno-acetato de etilo (8:2)

La placa de CCD fue observada con luz UV y vapores de yodo para la comparación con la sustancia testigo.

4.7.1.e. Determinación cuantitativa de ácido clorogénico en el EAC

Para determinar la cantidad de ácido clorogénico presente en el extracto se realizó una curva de calibración con soluciones de distintas concentraciones de ácido clorogénico ($1,1428 \times 10^{-5}$ - $4,5712 \times 10^{-5}$ M) en función de los valores de absorbancia a 322 nm. Esta curva permite establecer el valor de ϵ (pendiente de la curva) y obtener desde la siguiente fórmula la concentración de ácido clorogénico presente en el EAC:

$$A: \epsilon \times b \times C$$

Donde: A es el valor de absorbancia de la muestra
b es $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ($1 \cdot 10^5$)
C concentración de la muestra



Se realizó también la determinación de la presencia de taninos en otra alícuota del EAC de *B. articulata* y fue llevada a cabo mediante la reacción del color con sales férricas, [Harborne, 1984]. Una fracción de EAC se disolvió en agua y se le agregó una gota de la solución de FeCl_3 (1%). La presencia de taninos se evidencia por la formación de coloración pardo-verdoso de la reacción.

4.7.2. Identificación y cuantificación por HPLC

En base a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares de caracterización fitoquímica del extracto en estudio, los compuestos: luteolina, quercetina, acacetina y ácido clorogénico fueron identificados y cuantificados por HPLC.

Para el análisis cualitativo y cuantitativo por cromatografía HPLC se preparó una solución metanólica del EAC a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$. También fueron preparadas soluciones madres de los testigos: acacetina ($2,2 \times 10^{-2}$ M), luteolina ($1,9 \times 10^{-2}$ M), quercetina ($1,35 \times 10^{-3}$ M) y ácido clorogénico ($1,8 \times 10^{-2}$ M). Todas las muestras fueron filtradas utilizando filtros de membrana de acetato de celulosa de 0,2 μm (Micro Filtration System) antes del análisis por HPLC-PDA. La identificación de estos compuestos en el extracto acuoso caliente se realizó por comparación con los tiempos de retención (t_R) de los compuestos referentes.

Para la cuantificación de cada compuesto en el extracto se utilizó el método de calibración con estándar externo. Para ello fueron confeccionadas las curvas de trabajo de cada compuesto de referencia, graficándose así el área bajo la curva (ABC) en función de cada concentración del estándar, [Núñez Montoya y col., 2008]. Las curvas de trabajo construidas con cinco concentraciones de cada compuesto de referencia ($n=3$) fueron lineales (coeficiente de correlación = 0,99). La concentración de cada uno de estos compuestos (quercetina, luteolina, acacetina y ácido clorogénico) en el extracto acuoso caliente se obtuvo por interpolación del ABC obtenida, en las curvas de calibración. Los datos se analizaron por el programa Origin 6.0.

Para este ensayo se utilizó un cromatógrafo Varian Pro Star modelo 210, serie 04171, equipado con detector de diodos UV-Visible y una columna C_{18} Hypersil 5 (30 x 4,6 mm, Phenomenex). La fase móvil empleada fue ácido fórmico 0,1% - acetonitrilo (75:25) en un flujo constante (1,5 ml/min). La detección se realizó a 365 nm.

Resultados y discusión



5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Obtención de extractos a partir de *Baccharis articulata*

El estudio a nivel científico de plantas medicinales con antecedentes etnomedicinales comienza, generalmente, con el análisis de extractos acuosos y/o alcohólicos porque a nivel popular es el agua el principal solvente utilizado por la población. Por tal motivo, entre las muestras a estudiar se incluyeron aquellas extraídas con agua en frío o en caliente. Respecto de los extractos obtenidos con solventes orgánicos, la selección de dichos solventes estuvo basada en la revisión de datos bibliográficos efectuados en conjunto con profesionales Químicos del INTEQUI, UNSL.

En función de la relación de peso inicial vs. final de material vegetal fue posible cuantificar el rendimiento porcentual para cada extracto, que se exhiben en la Tabla 8.

Tabla 8: Rendimiento de peso seco obtenido a partir de partes aéreas de *B. articulata* sometidas a extracción con solventes de diferentes polaridad.

Tipo de extracto	Material vegetal inicial	Material al final de la extracción	Rendimiento (%)
EAF	28 g	11 g	39,3
EAC	17 g	1,49 g	8,76
EH	ND	ND	ND
EC	ND	ND	ND
EM	ND	ND	ND

ND: No disponible

Claramente se observa que el rendimiento del EAF de *B. articulata* ofreció mayor cantidad de residuos sólidos que el extracto acuoso caliente, resultados diferentes a lo esperado debido a que se asume que en general el calor aumentaría la capacidad extractiva del solvente al permitir la disolución de un mayor número de moléculas, si estuvieran presentes, tales como ceras y/o grasas.



Se desconoce la calidad química de las moléculas que se encuentran en cada uno de estos extractos. Sin embargo, la literatura indica que en diferentes extractos acuosos vegetales es posible encontrar almidón, antocianinas, saponinas, terpenoides, polipéptidos y lectinas, [Cowan, 1999]. En particular para miembros del género *Baccharis* se ha indicado la presencia de **Terpenos**: articulina, articulinol, α -cadinol, β -cariofileno, κ -nerolidol, germacreno D, T cadinol, δ -cadineno, α -pineno, aromadendreno, acariofileno, β -guaiano, γ -elemeno; y de **Flavonoides** tales como luteolina, quercetina, salvigenina, acacetina, cirsimaritina, salvigenina, genkwanina, 7-4'-dimetilapigenina. Además, **Acidos** como el alfa, beta y gamma resínicos, crisosapónicos y cafeilquínicos entre otras sustancias, [Soraru y Bandoni, 1978; Ratera y Ratera, 1980; Glasby, 1991; De Oliveira y col., 2003; Mangiaterra, 2005; Rodríguez y col., 2009].

Las publicaciones que incluyen referencias sobre los rendimientos porcentuales peso/peso de diferentes extractos de plantas indican valores diversos. Se ha informado que el rendimiento en peso seco de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) fue del 10,71%, en el extracto fluido al 40%, [Martínez Guerra y col., 2000]. Lagarto Parra y colaboradores en 1999, lograron rendimientos de 7,7, 14,8 y 9,7% para las Labiadas *Mentha spicata* L., *Mentha arvensis* L. y *Ocimum gratissimum* L., respectivamente, en extractos similares. Porcentajes aún menores fueron obtenidos por Vizoso Parra y colaboradores 1997, a partir de la extracción alcohólica de dos miembros de la familia Lamiaceae: *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Mentha piperita* L. (toronjil de menta), con valores de 3,72 y 2,55%, respectivamente, mientras que Domínguez Suárez y col. (2001), lograron un rendimiento de 4,5% en el extracto fluido de hojas de Siempreviva (Crassulaceae). En estudios realizados con extractos de varias especies de macroalgas el rendimiento de extractos metanólicos no superó 3,5%, [Echavarría y col., 2009].

Comúnmente, para un extracto acuoso frío no se registran valores porcentuales tan altos como los aquí obtenidos con el extracto acuoso de *B. articulata*, [Adzu y col., 2002]. En cambio para extractos acuosos obtenidos con calor hay cierta similitud en los valores porcentuales de rendimiento. Así, estudios realizados por Koh y col. (2009) reportan un rendimiento de decocción de la planta *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) del 11%, o del 11,5% para el extracto obtenido en caliente de *Teucrium polium* (Lamiaceae), como informa Shtukmaster y col. (2010).

Para la especie *Vernonia condensata* Baker perteneciente a la familia Asteraceae se reportó sólo un 3% p/p, de rendimiento de sólidos presentes en el extracto acuoso obtenido a 60°C, [Monteiro y col., 2001]. Para extractos acuosos de *Amaranthus muricatus*



(Amarantaceae), *Smilax campestris* (Liliaceae) y *Bauhinia candicans* (Leguminosae) se obtuvieron valores porcentuales de rendimientos de 7,14, 8,35 y de 6,05, respectivamente, resultando similares a los aquí obtenidos, [Debenedetti y col., 2000].

Sin embargo, valores de rendimientos mayores para extractos acuosos, obtenidos por distintas metodologías, resultaron con *Galipea longiflora* (Rutaceae) donde se encontraron entre 18 y 37,2%, [Llanos Medina, 2009].

Normalmente las plantas de carqueja son recolectadas de "bolsones" naturales (Kg) en campos abandonados o a orillas de caminos y comercializados como hierbas secas y picadas en envases de 50-100 g de material vegetal, [Martínez, 2005]. Esto puede llevar a la variación en su composición química o en su rendimiento, además de otros factores condicionantes como son: el lugar de procedencia, la edafología del terreno, la época de recolección, las condiciones climáticas del año, el periodo vegetativo en que se recolecta, etc.

La importancia de la determinación del rendimiento en un extracto vegetal se interpreta desde la bioactividad que el mismo pudiera estar presentando. Así, si se demuestra que los extractos ejercen acción antimicrobiana, desde el potencial terapéutico es más importante aquella planta que permite extraer de ella mayor cantidad de principios activos. Por lo cual si el EAF de *B. articulata* ejerciera acción antiviral promete ser un candidato ideal como fitofármaco.

De los datos vertidos en la **Tabla 8** se observa que para este extracto, su rendimiento estuvo cerca del 40%. Este valor es muy superior al reportado por Zanon (2005), para la misma especie crecida en las mismas serranías cordobesas (10%). No obstante esta investigadora menciona haber utilizado una mezcla de agua y alcohol como solvente de extracción y además la procedencia del vegetal en su caso fue Piedra Blanca, mientras que el vegetal aquí utilizado se colectó, como se indicó, en Alpa Corral. Ambos lugares pertenecen a la misma región fitogeográfica pero distan entre ellos 23 km aproximadamente. Hay numerosa información referida al concepto de quimiotipos indicando modificaciones químicas en la relación entre componentes terpénicos de aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas, [Zygadlo y Juliani, 2000; Edris y col., 2003; Merle y col., 2004; Sartorato y col., 2004; Gil y col., 2007; Sefidkon y col., 2007]. Si dichas diferencias en las muestras oleosas se atribuyen al clima, al tipo de suelo, a las variaciones edáficas, etc. puede suponerse también que otros compuestos químicos, presentes en los extractos podrían estar variando y así justificar también las diferencias de rendimientos registradas para la especie en estudio.



5.2. Propagación y mantenimiento de la línea celular Vero

De acuerdo a la metodología descrita en el punto 4.2 fue posible obtener monocapas celulares confluentes alrededor de las 48 h post siembra y evidenciaron la morfología poliédrica y uniforme característica de esta línea celular, coincidente con la descripción de *Hsiung y Fong* (1982), (**Figura 4**).

Una vez lograda la confluencia fue posible conservar la línea celular por un tiempo más prolongado manteniendo los cultivos con MM a 28°C durante aproximadamente 20-25 días, sin que se altere su morfología ni su fisiología.

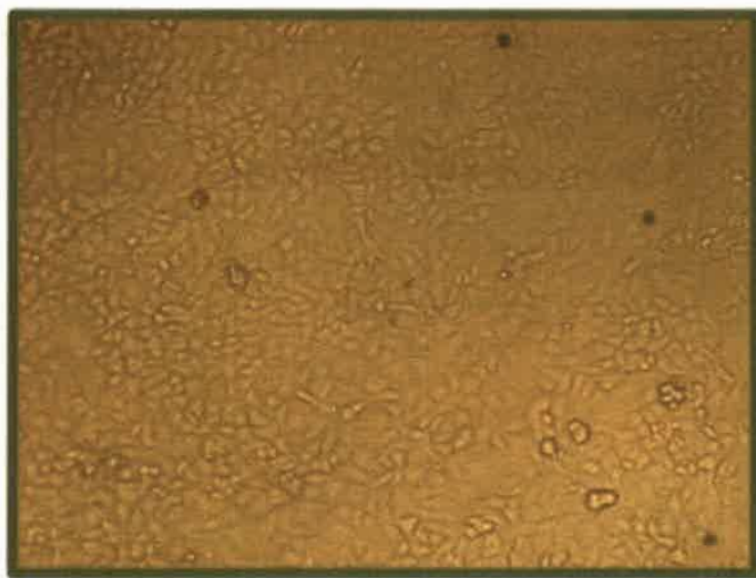


Figura 4. Monocapa de células Vero sin infectar, normales. 10X



5.3. Ensayos de citotoxicidad

5.3.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)

La interpretación de este concepto implica definir cuál es la máxima concentración del extracto vegetal posible de utilizar sin que ocasione alteraciones visibles al microscopio sobre los cultivos celulares pudiendo, en consecuencia, ser empleada en los ensayos de actividad antiviral. Los cultivos celulares expuestos a las diferentes concentraciones de los extractos fueron observados diariamente hasta las 72 h por ser éste el periodo de tiempo límite para la cuantificación de la infectividad del virus Herpes suis utilizado en este trabajo.

La determinación de la MCNC garantiza que la inhibición de la multiplicación del virus problema sea debida exclusivamente a la acción del extracto y no a un efecto tóxico ejercido por el mismo sobre las células tratadas e infectadas, [Andrei y col., 1985; Hudson, 1990; García, 1999].

Para cumplir este objetivo, monocapas celulares se incubaron con diferentes concentraciones de extractos siguiendo la metodología detallada en el apartado 4.3.1.

La visualización diaria de las monocapas hasta las 72 h de tratamiento permitió caracterizar el daño celular ejercido por todos los extractos. La **Figura 5** muestra que a concentraciones tóxicas el EC alteró la morfología de las células induciendo retracción del cultivo celular. Respecto del EH, esta fracción vegetal indujo agrandamiento celular y fuerte refringencia; mientras que el EM produjo una marcada ruptura celular, con pérdida de la confluencia del tejido.

Estos 3 extractos fueron altamente tóxicos a partir de concentraciones superiores a 100 µg/ml. Este resultado condicionó seriamente la evaluación de sus capacidades antivirales.

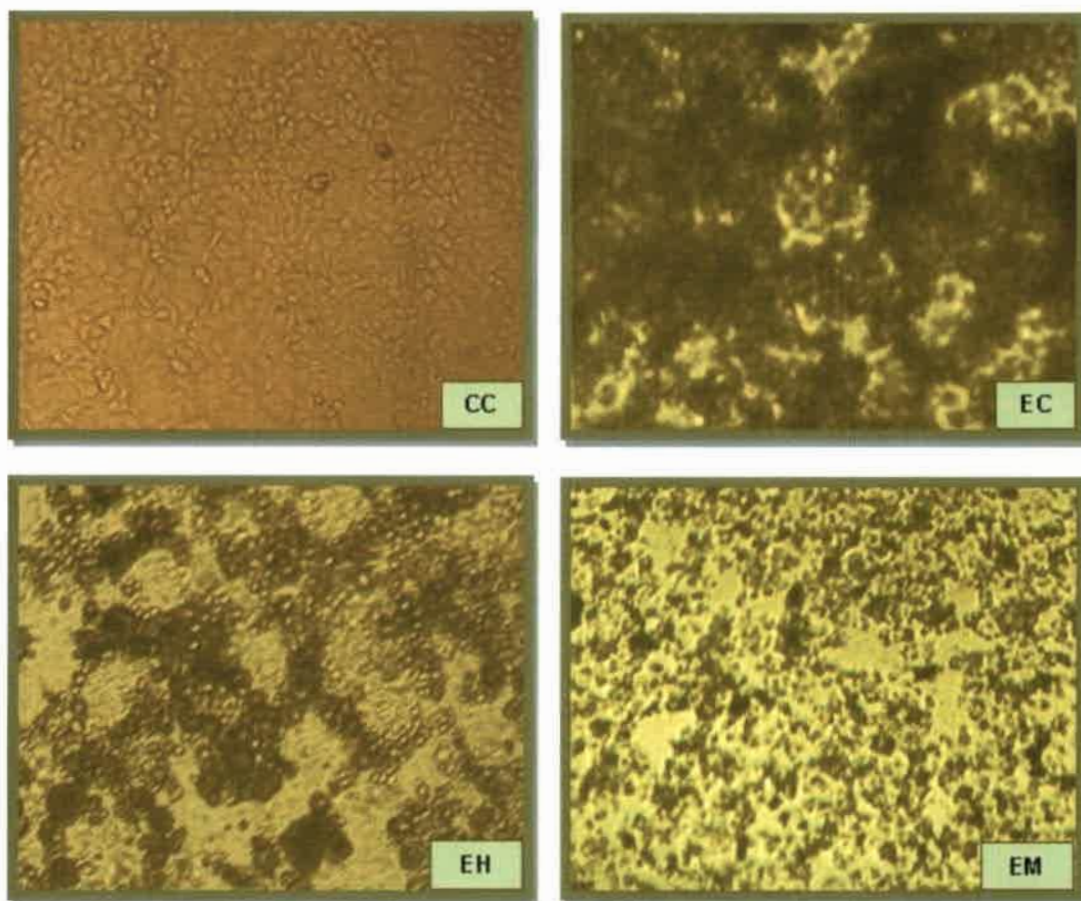


Figura 5: Aspecto morfológico de células Vero tratadas con extractos de *B. articulata*. CC control celular; Extracto clorofórmico (EC) a 500 $\mu\text{g/ml}$; extracto n-hexánico (EH) a 500 $\mu\text{g/ml}$; extracto metanólico (EM) a 500 $\mu\text{g/ml}$, (12X).

En relación al daño ejercido por concentraciones tóxicas de los extractos acuosos obtenidos en frío y en caliente las modificaciones encontradas fueron muy similares a las registradas para el EM, (Figura 6).

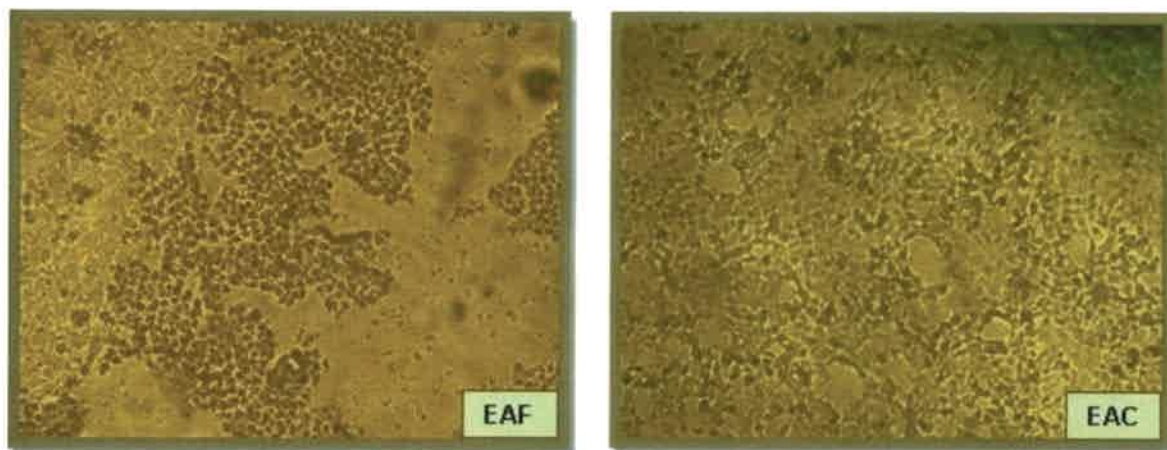


Figura 6: Aspecto morfológico de células Vero tratadas con extractos acuosos de *B. articulata*: Extracto acuoso frío (EAF) a 2.000 µg/ml; extracto acuoso caliente (EAC) a 700 µg/ml. (12X).

A las concentraciones no tóxicas de cada extracto ensayado, las células de las monocapas exhibieron una morfología similar a las células del sistema control.

Luego de la lectura al microscopio óptico se pudieron determinar los valores de MCNC para cada muestra vegetal ensayada, los que se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 9: Valores de Máxima Concentración No Citotóxica determinados en células Vero para los extractos acuosos y los obtenidos con solventes orgánicos a partir de *Baccharis articulata*.

Parámetro de toxicidad	Extractos de <i>B. articulata</i>				
	EAF	EAC	EH	EC	EM
MCNC (µg/ml)	1000	600	100	100	100

Las concentraciones ensayadas para los extractos obtenidos con los solventes orgánicos no pudieron ser evaluadas a valores superiores a 2500 µg/ml debido a la escasa solubilidad del residuo vegetal en el medio de mantenimiento celular. A muy bajas concentraciones empleadas de dichos extractos la toxicidad ejercida por ellos sobre las células fue muy marcada de allí que los valores de MCNC fueron los más bajos registrados en estos ensayos.

Estudios realizados por *Abad* y colaboradores (1999) con el empleo de especies del mismo género *Baccharis* (*B. genistelloides* y *B. rubricaulis*) para la preparación de



extractos acuosos, mostraron que sobre células HeLa los valores de MCNC fueron de 50 µg/ml, indicando ser más tóxicos que la especie aquí estudiada. Este resultado podría atribuirse a una mayor sensibilidad de las células HeLa, y/o a una variación en la calidad química de estas especies.

Es posible también comparar valores de toxicidad para la misma especie *B. articulata* de diferente procedencia. Así, *Montanha y col. (2004)*, informaron para el extracto acuoso caliente (60°C) para la especie recolectada en Brasil, un valor de MCNC 2,5 mg/ml. Este dato respecto del obtenido en este trabajo (0,6 mg/ml) revela que la especie recolectada en aquel país es menos tóxica que la de nuestras serranías. A pesar de esta aseveración, la importancia de *B. articulata* en la medicina folclórica regional, la actividad antiherpética de su extracto etanólico ya demostrada (*Zanon, 2005*) y la abundancia en nuestra zona serrana, justifican el estudio de la actividad antiviral de sus extractos acuosos.

5.3.2. Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) por captación del Rojo Neutro

Aplicando la metodología descrita en el apartado métodos 4.3.2., se logró calcular a partir de los valores de densidad óptica (D.O.), el porcentaje de viabilidad celular resultante del tratamiento de los cultivos con cada una de las concentraciones de los extractos ensayados, (Tablas 10 a 14).



Tabla 10: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero, tratadas con distintas concentraciones de EC de *B. articulata*, determinados por captación de RN.

EC (µg/ml)	D.O.* (540 nm) Promedio** (± DS)	Viabilidad celular (%) Promedio (± DS)
Control	0,90 (± 0,05)	100,07 (± 6,02)
50	0,16 (± 0,007)	18,1 (± 0,77)
100	0,10 (± 0,01)	11,29 (± 1,42)
500	0,16 (± 0,04)	18,5 (± 4,54)
1500	0,16 (± 0,001)	18,54 (± 0,11)
2000	0,12 (± 0,01)	14,30 (± 1,71)

*: Densidad óptica, **n=3.

Tabla 11: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero, tratadas con distintas concentraciones de EH de *B. articulata*, determinados por captación de RN.

EH (µg/ml)	D.O.* (540 nm) Promedio** (± DS)	Viabilidad celular (%) Promedio (± DS)
Control	0,90 (± 0,05)	100,07 (± 6,02)
50	0,93 (± 0,01)	103,19 (± 1,84)
100	0,67 (± 0,06)	74,31 (± 8,10)
500	0,08 (± 0,01)	9,75 (± 1,16)
1000	0,07 (± 0,01)	8,31 (± 1,44)
1500	0,07 (± 0,01)	8,09 (± 1,27)
2000	0,11 (± 0,06)	8,16 (± 1,71)

*: Densidad óptica, **n=3.



Tabla 12: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero, tratadas con distintas concentraciones de EM de *B. articulata*, determinados por captación de RN.

EH (µg/ml)	D.O.* (540 nm) Promedio** (± DS)	Viabilidad celular (%) Promedio (± DS)
Control	0,90 (± 0,05)	100,07 (± 6,02)
50	0,76 (± 0,05)	84,87 (± 6,50)
100	0,74 (± 0,06)	81,86 (± 6,96)
500	0,59 (± 0,20)	65,93 (± 22,13)
1000	0,28 (± 0,05)	31,71 (± 5,95)
1500	0,19 (± 0,01)	21,88 (± 1,46)
2000	0,16 (± 0,06)	18,06 (± 6,79)

*: Densidad óptica, **n=3.

El análisis de los datos presentados en las tablas precedentes referidos a los extractos obtenidos con solventes orgánicos muestra claramente que el EC fue el más tóxico de los tres. Para este extracto y a la menor concentración ensayada (50 µg/ml) se reveló una tasa de mortalidad celular del 82%, lo cual lo excluye para estudios antimicrobianos posteriores que impliquen la participación de células eucariota. La literatura indica que cuando se evalúa la acción antiviral de extractos crudos los rangos de concentraciones ensayadas suelen ser de tres o más dígitos (500 a 3000 µg/ml), [Montanha y col., 2004; Taborda y col., 2007].

Por otra parte pudo observarse que aún aumentando las concentraciones de prueba no hubo consistencia entre los datos que muestren relación dosis-respuesta pues el grado de toxicidad registrado indicó que la misma fue prácticamente constante y muy alta (70-90%). Se asume que a las más altas concentraciones hubo también mala disolución del extracto pues era una masa consistente y viscosa debiendo haberse empleado DMSO para lograr su homogeneización; esta droga no debe superar una concentración final del 1% v/v cuando se lo emplea sobre células vivas [Vanden Berghe y Vlietinck, 1991].

El mismo análisis se aplica a los datos referidos a toxicidad ejercida por el EH, sólo que resultó ser fuertemente tóxico a partir de 500 µg/ml. Este extracto también ofreció las mismas dificultades de disolución que el EC.



Finalmente para el EM pudo demostrarse una relación dosis-respuesta respecto de la toxicidad que indujo sobre las células Vero. Fue de los tres extractos considerados el menos tóxico, a 500 µg/ml las células estuvieron viables por arriba del 50%.

Tabla 13: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero, tratadas con distintas concentraciones de EAF de *B. articulata*, determinados por captación de RN.

EAF (µg/ml)	D.O.* (540 nm) Promedio** (± DS)	Viabilidad celular (%) Promedio (± DS)
Control	1,09 (± 0,16)	100,01 (± 15,06)
1000	0,94 (± 0,11)	94,53 (± 8,35)
1500	0,66 (± 0,07)	72,10 (± 20,38)
2000	0,65 (± 0,04)	64,31 (± 3,55)
2250	0,63 (± 0,02)	58,02 (± 2,17)
2500	0,58 (± 0,08)	53,80 (± 6,11)
2750	0,54 (± 0,07)	50,35 (± 5,78)
3000	0,49 (± 0,06)	45,74 (± 5,13)
3500	0,26 (± 0,02)	24,50 (± 1,86)

*: Densidad óptica, **n=3.



Tabla 14: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero, tratadas con distintas concentraciones de EAC de *B. articulata*, determinados por captación de RN.

EAC (µg/ml)	D.O.* (540 nm) Promedio** (± DS)	Viabilidad celular (%) Promedio (± DS)
Control	1,12 (± 0,007)	100,02 (± 0,69)
300	1,03 (± 0,02)	91,79 (± 2,19)
400	1,06 (± 0,14)	93,88 (± 13,22)
500	0,79 (± 0,06)	70,03 (± 5,89)
600	0,68 (± 0,03)	60,55 (± 3,19)
700	0,65 (± 0,03)	57,69 (± 3,18)
800	0,37 (± 0,12)	32,85 (± 10,84)
900	0,31 (± 0,01)	27,72 (± 1,30)
1000	0,14 (± 0,008)	13,25 (± 0,73)
1100	0,08 (± 0,008)	7,73 (± 0,75)
1200	0,05 (± 0,003)	4,89 (± 0,31)
1300	0,05 (± 0,002)	4,95 (± 0,23)

*: Densidad óptica, **n=3.

El comportamiento de los extractos acuosos obtenidos de *B. articulata* sobre la viabilidad de las células Vero fue diferente al encontrado para los extractos orgánicos EC y EH. Tanto para el EAF como para el obtenido en caliente se pudo demostrar una relación dosis-respuesta, similar al ejercido por el EM.

La comparación entre los valores de toxicidad alcanzados con el EAF vs. el EAC muestra claramente que este último fue el más tóxico de ambos. Se observa que el rango de concentraciones ensayadas para el EAC fue más estrecho pues su poder tóxico se reveló en los ensayos de *screening* previos indicando ausencia de viabilidad ya con 2000 µg/ml de muestra vegetal utilizada. Puede notarse que a 1000 µg/ml del EAF todas las células del sistema permanecieron viables; a esa misma concentración el EAC indujo una mortalidad celular del 87 %.



Todos los datos vertidos en las 5 tablas precedentes se utilizaron para la construcción, en forma independiente, de las gráficas de viabilidad celular que permitieron, por intrapolación, calcular el valor de CC_{50} de cada muestra vegetal ensayada, (**Figura 7 y 8**). Se define a la Concentración Citotóxica 50 % (CC_{50}) como aquella concentración de extracto que ejerce daño en un 50 % de las células tratadas.

Los valores analizados estadísticamente permitieron determinar R^2 de cada ensayo.

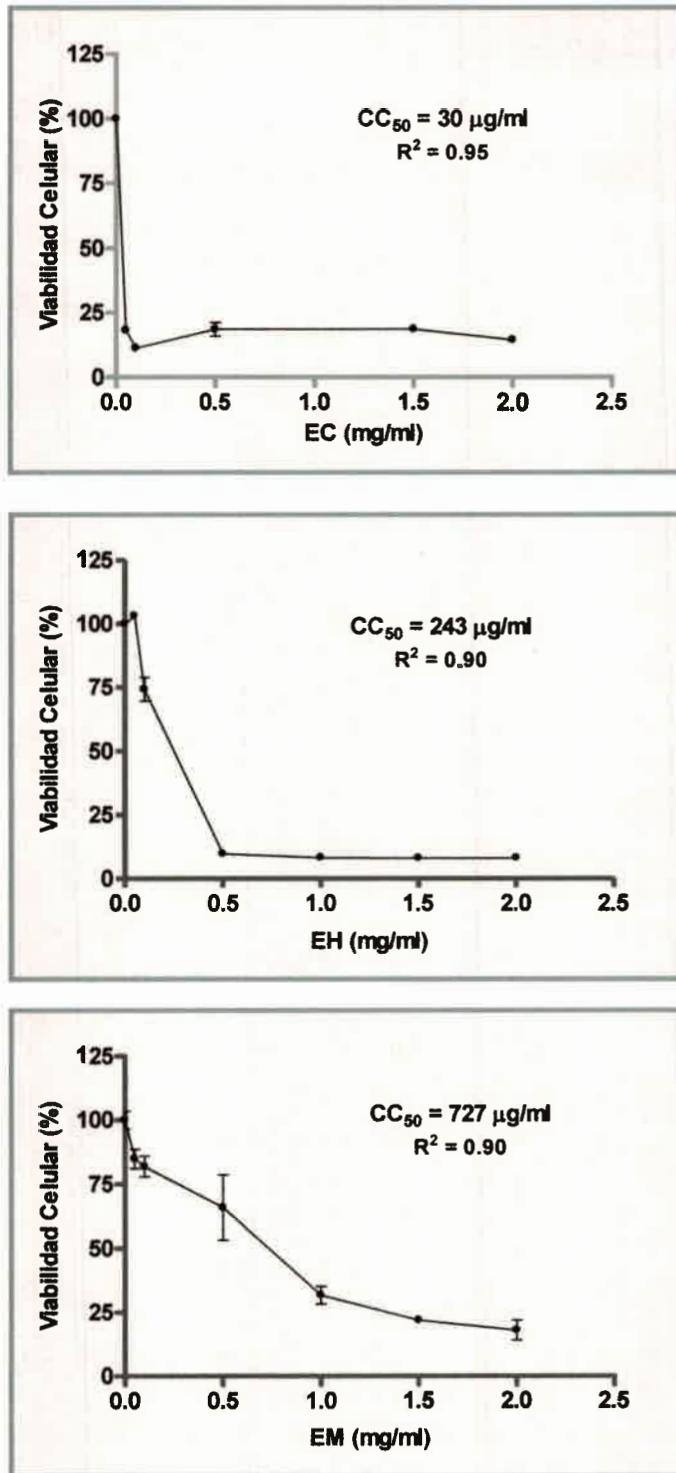


Figura 7: Viabilidad porcentual de Células Vero tratadas con extractos de *B. articulata* por método de RN. A) Extracto clorofórmico (EC); B) Extracto hexánico (EH) y C) Extracto metánolico (EM).

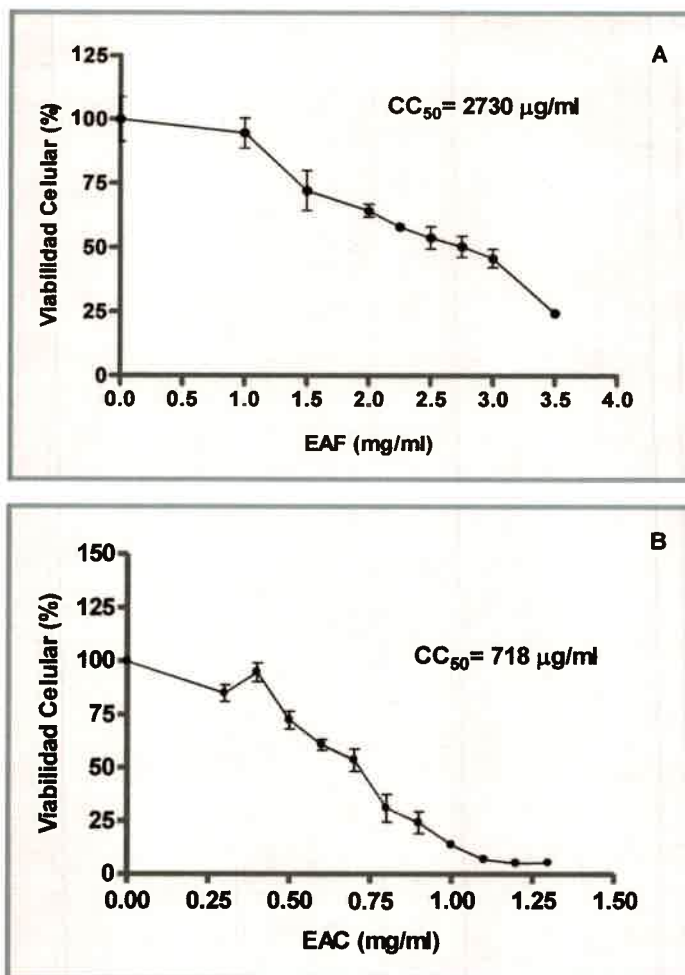


Figura 8: Viabilidad porcentual de Células Vero tratadas con extractos acuosos de *B. articulata*, por método de RN. A) Extracto acuoso frío (EAF), B) Extracto acuoso caliente (EAC).

El análisis estadístico de las curvas precedentes revelaron valores de R^2 superiores a 0,90 en todos los casos. Estos datos estadísticos por estar próximo a 1 validaron el método desarrollado para el estudio de citotoxicidad por captación de rojo neutro.



5.3.3. Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) por reducción del MTT

En virtud de los datos precedentes y aplicando la metodología descrita en el apartado métodos 4.3.3. se logró calcular, a partir de los valores de D.O., el porcentaje de viabilidad celular resultante sólo del tratamiento de los cultivos con cada una de las concentraciones de los extractos acuosos ensayados, (Tablas 15 y 16).

Tabla 15: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero tratadas con concentraciones de EAF de *B. articulata*, determinados por reducción de MTT.

EAF (µg/ml)	D.O.* (540 nm) Promedio** (± DS)	Viabilidad celular (%) Promedio (± DS)
Control	0,26 (± 0,02)	100 (± 7,65)
1000	0,26 (± 0,01)	99,6 (± 7,27)
1500	0,22 (± 0,007)	86,74 (± 2,73)
2000	0,15 (± 0,02)	58,33 (± 8,57)
2250	0,10 (± 0,009)	39,64 (± 3,58)
2500	0,09 (± 0,008)	35,73 (± 3,17)
2750	0,08 (± 0,02)	31,56 (± 8,39)
3000	0,07 (± 0,02)	29,41 (± 7,98)
3500	0,07 (± 0,005)	28,53 (± 1,90)

*: Densidad óptica, **n=3.



Tabla 16: Valores porcentuales de viabilidad de células Vero tratadas con concentraciones de EAC de *B. articulata*, por reducción de MTT.

EAC (µg/ml)	D.O.* (540 nm) Promedio** (± DS)	Viabilidad celular (%) Promedio (± DS)
Control	0,23 (± 0,01)	99,99 (± 8,31)
300	0,20 (± 0,01)	89,07 (± 5,73)
400	0,19 (± 0,01)	83,61 (± 6,50)
500	0,13 (± 0,04)	55,17 (± 9,38)
600	0,079 (± 0,006)	33,90 (± 3,29)
700	0,077 (± 0,01)	33,18 (± 5,70)
800	0,064 (± 0,007)	27,72 (± 3,23)
900	0,068 (± 0,009)	29,59 (± 4,00)
1000	0,064 (± 0,009)	27,86 (± 4,00)
1100	0,062 (± 0,005)	26,86 (± 2,21)
1200	0,062 (± 0,007)	27,01 (± 3,11)
1300	0,065 (± 0,004)	28,01 (± 1,88)

*: Densidad óptica, **n=3.

El análisis de los datos vertidos en las tablas precedentes revela que fue posible demostrar nuevamente para ambos extractos acuosos una relación dosis-respuesta, por este método. Esta aseveración es válida para el EAF en todas las concentraciones evaluadas, mientras que para el EAC no hubo consistencia entre los datos a partir de la concentración 700 µg/ml en donde la viabilidad celular se conservó constante y del orden del 26-33 %. Para una concentración de 1000 µg/ml de EAF se alcanzó un 100 % de viabilidad celular mientras que para esa misma concentración de EAC la viabilidad celular se redujo al 27 %. Estos ensayos han confirmado entonces que el EAC de *B. articulata* resulta ser más tóxico sobre células Vero, que el EAF de esta especie vegetal en estudio.

A partir de los resultados vertidos en las 2 tablas precedentes se construyeron las gráficas de viabilidad celular que, por intrapolación, permitieron definir el valor de CC₅₀ de cada muestra vegetal ensayada, (Figura 9).



Los datos fueron analizados estadísticamente para validar los ensayos mediante la determinación del R^2 , cuyo valor en ambos casos, fue superior a 0,95 indicando confiabilidad de los resultados.

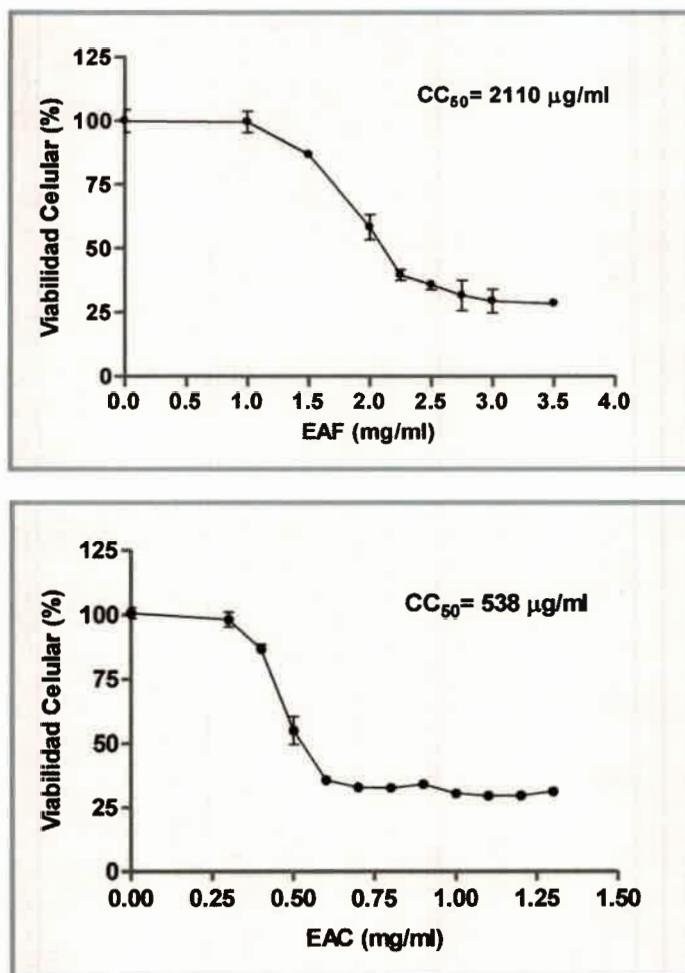


Figura 9: Viabilidad porcentual de Células Vero tratadas con extractos acuosos de *B. articulata*, por método de MTT. A) Extracto acuoso frío (EAF), B) Extracto acuoso caliente (EAC).

Los valores de CC_{50} nuevamente confirmaron que el EAC de *B. articulata* resulta más tóxico (540 vs 2110 $\mu\text{g/ml}$) indicando que se requiere de él cuatro veces menor cantidad para ejercer la misma tasa de mortalidad celular que del EAF.

Teniendo en cuenta que las técnicas desarrolladas para la evaluación de toxicidad son catalogadas como ensayos *in vitro*, y que para todas se emplearon las células Vero como soporte celular, parece apropiado realizar un análisis comparativo entre los datos logrados con ellas. Sin embargo, también debe decirse que por un método se revelan



valores extremos de toxicidad (MCNC) mientras que por los otros se expresan valores tóxicos medios, lo que haría difícil su comparación.

Se asume que la CC_{50} , valorada por cualquier de los dos métodos colorimétricos seleccionados, representa un valor de toxicidad donde el 50% de las células están vivas, mientras que la MCNC indicaría un valor de concentración de cada fracción vegetal en la que el 100% de las células permanecen viables y tendrían un comportamiento similar al sistema control. Para verificar si esto fue real, se extrapolaron en cada curva de viabilidad celular post tratamiento con las distintas fracciones vegetales, el valor de cada MCNC, (Tabla 17). Pudo notarse que sólo hubo buena correlación para el EAF ya que la viabilidad de las células tratadas a la MCNC alcanzó valores cercanos al 100%, por ambos métodos colorimétricos.

Tabla 17: Correlación entre valores de viabilidad celular porcentual obtenidos por tres métodos diferentes empleando células Vero en monocapas.

Extractos de <i>Baccharis articulata</i>	MCNC ($\mu\text{g/ml}$)	Viabilidad celular porcentual alcanzada al valor de MCNC por	
		RN	MTT
Metanólico	100	52,18	ND
N-Hexánico	100	74,31	ND
Clorofórmico	100	11,29	ND
Acuoso Frío	1.000	94,50	99,60
Acuoso Caliente	600	60,50	33,90

ND*: No Determinado.

Por el contrario, el valor de MCNC del EAC indicó que a pesar que las células exhibieron morfología aparentemente normal con 600 $\mu\text{g/ml}$, las mismas sufrieron algún tipo de daño que disminuyó la viabilidad al 60,5 y 33,9%, según lo definido por RN y MTT, respectivamente. Esta diferencia de viabilidad detectada por los diferentes ensayos de citotoxicidad, indicarían efectos intracelulares debido a la exposición al extracto antes de que ocurra cualquier daño permanente en la membrana citoplasmática. Comparando además los valores de viabilidad celular alcanzados por RN y MTT para este extracto se puede aseverar que las sustancias químicas presentes en el mismo estarían entonces



ejerciendo un daño que comprometería más la capacidad respiratoria mitocondrial que la función lisosomal de las células tratadas.

La diferencia en sensibilidad entre la determinación de la MCNC respecto de los valores de CC_{50} puede ser debida a que MCNC solo refiere a modificaciones morfológicas y su cuantificación se hace por métodos menos precisos ya que están acotados a la visualización, con la limitante de la interpretación de quien la evalúa, mientras que la CC_{50} indica citotoxicidad por alteraciones fisiológicas y al evaluarse por métodos colorimétricos, su lectura depende de aparatos más sensibles que la simple visualización por un operador.

Tal como lo expresan *Fotakis y Timbrell (2006)* los ensayos de citotoxicidad mediante la captación del RN y la reducción del MTT tienen una alta sensibilidad para detectar rápidamente la toxicidad de un producto. En los ensayos aquí realizados esta aseveración ha sido verificada y puede notarse claramente en función de las diferencias marcadas encontradas con el EAC.

Existen numerosos estudios de citotoxicidad de extractos acuosos provenientes de partes aéreas de plantas medicinales determinados también por RN en cultivos de células Vero. Tal es el caso del trabajo realizado por *Schnitzler y col. (2008)*, quienes informaron valores de CC_{50} de 499 $\mu\text{g/ml}$ y 630,5 $\mu\text{g/ml}$ para extractos de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) procedentes de las localizaciones "Garden" y "Swabian Mountains", respectivamente.

Por otra parte, *Betancur Galvis y col., (1999)*, a partir de *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae) reportaron una CC_{50} de 7,1 $\mu\text{g/ml}$, a las 24 h.

Los resultados de este trabajo de Tesis demuestran que ambos extractos acuosos de *B. articulata* fueron sustancialmente menos tóxicos y más aún si se considera el tiempo de tratamiento celular empleado en los estudios de citotoxicidad con el extracto de *Chenopodium ambrosioides*.

Montanha y colaboradores (2004), en sus estudios de citotoxicidad con el extracto acuoso de *Baccharis articulata* procedente de Brasil, además de hallar una MCNC 2500 $\mu\text{g/ml}$, mayor que la aquí obtenida informaron un valor de CC_{50} de 7500 $\mu\text{g/ml}$. Este valor es nuevamente superior a los aquí obtenidos para ambos extractos acuosos, revelando que la especie de Brasil es menos tóxica que la que crece en la Argentina. Estas diferencias pueden atribuirse indudablemente, como se expresó, al tipo de moléculas químicas que ofrece la planta condicionada, entre otras variables, a la procedencia u origen del vegetal estudiado. Haciendo necesario que si hay un interés científico por una



especie determinada, la misma deba ser sometida a todos los ensayos biológicos que ameriten.

Según los datos vertidos por *Montanha, (2004)* al establecer la relación entre la MCNC (2500 µg/ml) y la CC₅₀ (7500 µg/ml) resulta un valor de 0,33. El mismo análisis efectuado con los resultados obtenidos con el EAF en esta tesis también se define una proporción similar (1000 µg/ml y 2480 µg/ml) de 0,40. Esto revela que los métodos han sido desarrollados adecuadamente por ambos grupos de trabajo validando los resultados de toxicidad y reafirmando que la especie de *B. articulata* colectada en Brasil es menos tóxica que la colectada en las serranías cordobesas.

5.4. Producción de stock del virus *Herpes suis* tipo 1

Se realizó mensualmente la amplificación y la titulación de la suspensión viral con el fin de mantener el stock de la cepa seleccionada, con un volumen y título importantes, que permitiera realizar los estudios antivirales y virucidales posteriores.

El virus de la enfermedad de Aujeszky tiene la particularidad de perder su título viral cuando se lo conserva a 4°C; razón por la cual la semilla original se debe conservar a -180°C y para mantener el título viral durante el desarrollo de todas las experiencias obligatoriamente se debe amplificar y titular regularmente.

Para la amplificación y cuantificación de la cepa fue necesario desarrollar monocapas celulares en botellas de pequeño tamaño que fueron infectadas con la semilla viral, siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.4. La observación diaria al microscopio óptico de los cultivos infectados con el virus *Herpes suis*, permitió identificar el ECP típico que caracteriza esta cepa viral, [*Sabini, 1996*].

Al comienzo fue posible distinguir la formación de grupos de células redondeadas, agrandadas y refringentes que originaron los típicos sincitios o células gigantes multinucleadas, (**Figura 10**). Posteriormente, a las 48-72 h post-infección, se constituyeron en focos de lisis con desprendimiento de las células de la superficie del recipiente, permitiendo observar verdaderos huecos en la monocapa. Un cierto número de células que no sufrieron lisis quedaron unidas a otras por conexiones citoplasmáticas, dando el aspecto de formaciones asteroides.

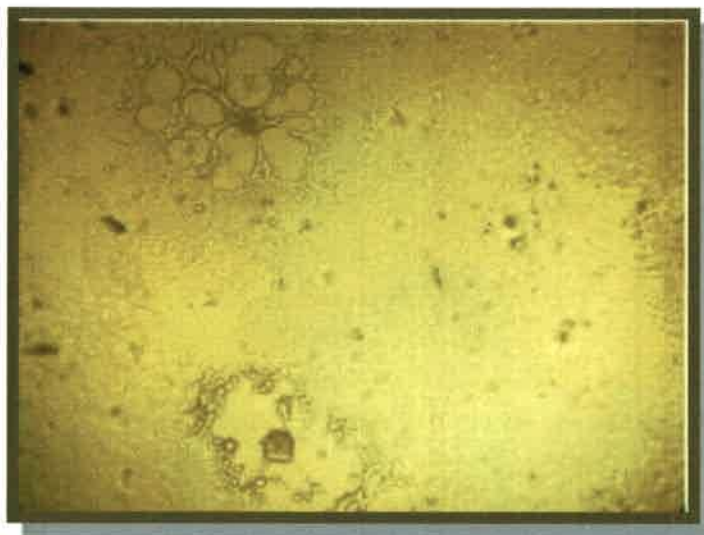


Figura 10: Células Vero infectadas con virus *Herpes suis* tipo 1, cepa RC/79, (12X).

Un 80-90 % de la monocapa celular presentó estas alteraciones a las 72 h post-infección momento en que se realizó la cosecha viral. Por el contrario, los cultivos no infectados, que constituyeron los controles celulares, mantuvieron la morfología y confluencia durante todo el tiempo que duró la experiencia.

5.4.1. Titulación de la infectividad viral

Una vez amplificada la semilla viral se procedió a cuantificar su infectividad a través del recuento de placas de lisis debido a que este método presenta simplicidad, exactitud y alta reproducibilidad, [Dulbecco, 1962]. Los títulos virales obtenidos en estas experiencias fueron del orden de 10^5 - 10^7 UFP/ml, valores semejantes a los obtenidos y utilizados en ensayos de actividad antiviral por Sabini, (1996) y por Zanon (2005) cuando trabajando con la misma cepa viral, realizaron estudios de caracterización de este agente.

En la Figura 11 se muestran las placas de lisis producidas por la multiplicación del virus en los cultivos celulares a las 72 h post infección, momento en el que fueron fijados y teñidos, tal como se detalla en la metodología. Estas placas presentaron bordes regulares y nítidos y fueron menos numerosas conforme el stock viral se diluyó.

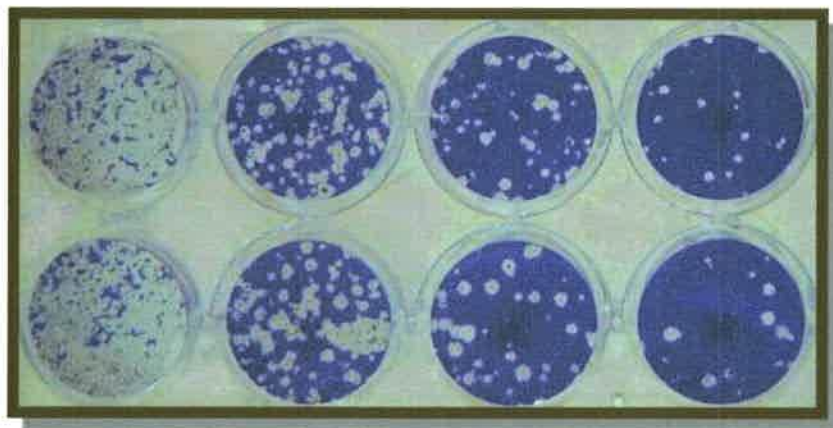


Figura 11: Placas de lisis producidas por el *Herpes suis* tipo 1 en células Vero, a las 72 h post infección.

5.5. Ensayos antivirales

El estudio de la actividad antiviral fue realizada solo con los extractos acuosos obtenidos en frío y en caliente de *B. articulata* en función de los resultados obtenidos en las determinaciones de citotoxicidad efectuadas.

5.5.1. Estudios de actividad antiviral de los extractos acuosos en distintas etapas del ciclo de replicación viral

La determinación de la actividad antiviral se logra evaluando la capacidad de un compuesto de reducir o anular la multiplicación viral en un sistema celular. Es decir, se mide la replicación viral en presencia y ausencia del producto vegetal y se las compara entre sí, [De Clercq, 1993].

Para analizar todos los ensayos de actividad antiviral se emplearon los extractos acuosos obtenidos en frío y en caliente de *B. articulata* a los valores de sus MCNCs, 1.000 $\mu\text{g/ml}$ y 600 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente o con otras concentraciones, dependiendo del ensayo.



5.5.1.a. Posterior a la adsorción y penetración viral

Siguiendo la metodología detallada en el apartado 4.5.1.a, que indica que el extracto fue incorporado a los cultivos celulares luego de la infección viral pudieron obtenerse los resultados que se indican en la **Tabla 18**.

Tabla 18: Inhibición de la multiplicación del virus *Herpes suis* tipo 1 por EAF y EAC de *B. articulata* incorporado a las células luego de la adsorción y penetración viral.

Extractos ($\mu\text{g/ml}$)	Título de virus (UFP/ml)		Inhibición Viral (%)	
	Control	Tratado		
EAC	600	$3,3 \times 10^5$	$3,07 \times 10^5$	6,8
EAF	1.000	$1,3 \times 10^6$	$8,71 \times 10^5$	33
	800	$1,3 \times 10^6$	1×10^6	23,07
	600	$1,3 \times 10^6$	$1,12 \times 10^6$	13,85
	400	$1,3 \times 10^6$	$1,15 \times 10^6$	11,53

Basado en el conocimiento que el extracto hidroalcohólico de la especie *B. articulata* ejerce una buena acción antiviral in vitro frente a *Herpes suis* tipo 1 (Zanon y col., 1999), se justificó el estudio de acción antiviral de extractos acuosos de esta especie. Los estudios efectuados por aquellos investigadores incluyeron extractos obtenidos con mezcla de agua y alcohol pero sin el empleo de calor por tal motivo, se asumió que el EAF de *B. articulata* tendría un grado de acción antiviral similar empleado a su MCNC, y bajo esta suposición se seleccionaron además 3 concentraciones menores de dicho extracto. Sorpresivamente y conforme expresan los valores de la tabla precedente, el EAF sólo ejerció un 33 % de inhibición viral a su MCNC. Si bien hubo una relación dosis-respuesta en la capacidad antiherpética de este extracto, a ninguna de sus concentraciones ensayadas se estimó una inhibición de la multiplicación del virus que alcanzara al menos un 50 %.

En relación al EAC de carqueja se evaluó el mismo a su MCNC por no tener registros previos que fracciones preparadas con calor para esta especie hayan inhibido al



virus problema. El resultado muestra también que la acción antiviral ejercida por este extracto no es importante.

Retornando al análisis de la acción antiviral evidenciada para el EAF debería decirse de él que tampoco sería un buen agente antiviral. Según Vanden Berghe (1991), se define como agente antiviral a aquel compuesto capaz de disminuir el título del virus en al menos 2 unidades logarítmicas (99 %) con respecto al control. Esta definición es muy estricta porque exige de la droga que sea muy potente de forma que una sola dosis elimine el 100 % de la carga viral. No obstante, es conocido que las terapias antimicrobianas no son absolutas, todo lo contrario, la mayoría de las terapias antimicrobianas implican el uso de dosis repetidas y sostenidas en el tiempo para controlar una enfermedad de etiología infecciosa.

No se han efectuado estudios de Farmacocinética y Farmacodinamia del EAF de *B. articulata*, pero se asume que cualquier droga administrada *in vivo*, conforme ataque al agente patógeno también puede ir sufriendo modificación, degradaciones, metabolizaciones que harían que no haya una cantidad real en el organismo que termine siendo tóxica para el huésped. Analizando el dato en este contexto general, un 33 % de inhibición no debería ser despreciado.

Dado la escasa inhibición ejercida por los extractos acuosos sobre la replicación del virus *Herpes suis* tipo 1, fue necesario profundizar los estudios mediante el diseño de otras experiencias que permitan determinar si otro(s) paso(s) de la replicación viral pudiera(n) verse afectado(s). Esto en virtud de que los medicamentos pueden ser clasificados de acuerdo al mecanismo de acción considerando la etapa de la replicación viral que es inhibida por el fármaco.

5.5.1.b. Sobre la adsorción y penetración viral

En esta experiencia se evaluó la capacidad del extracto de interferir en el proceso de reconocimiento del virus al receptor celular y/o penetración en la célula huésped, tal como se describe en el apartado 4.5.1.b. Los resultados alcanzados se muestran en la **Tabla 19**.

**Tabla 19:** Inhibición de la multiplicación del virus *Herpes suis tipo 1* por el EAF y EAC de *B. articulata* incorporados a las células durante la adsorción y penetración viral.

Extractos (MCNC)	Título de virus (UFP/ml)		Inhibición viral (%)
	Control	Tratado	
EAC (600 µg/ml)	2,65 x10 ⁵	1,22x10 ⁵	53,96
EAF (1.000 µg/ml)	3,32x10 ⁶	2,47x10 ⁶	25,60

Tal como puede observarse, el porcentaje de inhibición logrado por el EAF fue de 25,60 % cuando el extracto fue incorporado al momento de la adsorción y penetración del virus a la célula. El valor representa nuevamente un grado de actividad bajo, tal como aquellos alcanzados durante los ensayos de post-adsorción y penetración viral.

Con respecto al EAC no ocurrió lo mismo, el porcentaje de inhibición viral resultó ser mayor en esta etapa, superando más del 50 % de esta acción. En función de este resultado fue necesario diseñar una experiencia para evaluar acción antiviral empleando concentraciones decrecientes del EAC y partiendo desde su MCNC para determinar el valor de Concentración Efectiva 50% (CE₅₀). Este guarismo es ampliamente utilizado para definir la selectividad de acción de una droga antiviral pues es empleado para correlacionarlo a la concentración tóxica de la misma droga y permitir que se calcule el Índice de selectividad (IS = CC₅₀/CE₅₀), [del Barrio, 2000; Valdés García, 2003; Zandi, 2007; Schnitzler, 2008].

Numerosos investigadores han realizado estudios a partir de extractos acuosos de la familia *Asteraceae* demostrando capacidad antiviral frente a *VHS-1*, tal es el caso de *Abad y col. (1999)*, quienes trabajaron con *Baccharis genistelloides* y alcanzaron una inhibición viral de 50 % con una concentración de 50 µg/ml. Otros miembros de la familia *Asteraceae*, como por ejemplo la especie *Helichrysum aureonitens* también presentó actividad antiherpética a una concentración de 1350 µg/ml (*Meyer y col., 1996*), valor similar a la concentración activa de *B. articulata* empleada en este trabajo.

Es importante destacar que en América del Sur son también numerosos los estudios abordados con plantas medicinales en la búsqueda de drogas vegetales con actividad antiherpética. Los estudios efectuados por (*Montanha y col. 2004*) registran que de 51 especies de plantas medicinales del sur de Brasil sólo 9 presentaron actividad frente a *VHS-1* y de ellas algunas especies del género *Baccharis* inhibieron este virus pero no



B. articulata. En sus estudios el extracto acuoso de esta especie solo se le demostró el potencial citotóxico sobre células Vero y, como se indicó, resultó escasamente tóxico. El análisis comparativo entre el potencial citotóxico mostro que los extractos incluidos en este trabajo resultaron mas tóxicos, sin embargo pudo demostrarse una capacidad de inhibición antiviral del orden del un 33 % a 1000 $\mu\text{g/ml}$ y de 53,96 % a 600 $\mu\text{g/ml}$ para el EAF y el EAC respectivamente. Todo esto demuestra que el valor de toxicidad que arroja una sustancia no debe ser considerado un parámetro único y válido para hablar del futuro de esa droga, debe siempre considerarse la selectividad. Entre los dos extractos acuosos de *B. articulata* aquí estudiados pareciera entonces más promisorio el EAC, a pesar de su potencial tóxico.

5.5.2. Pre-tratamiento de los cultivos celulares con extractos acuosos

A fin de establecer si la incubación previa de las células con los extractos vegetales podría llegar a generar en ellas un estado antiviral o refractario a la infección viral, las monocapas celulares se incubaron a 37°C durante 2 h con cada extracto a su MCNC como se describió en el apartado 4.5.2. Los resultados de esta experiencia se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 20: Inhibición de la multiplicación del virus *Herpes suis* tipo 1 en células Vero pre-tratadas, en ensayos independiente, con EAF o EAC de *B. articulata*.

Extracto (MCNC)	Título de virus (UFP/ml)		Inhibición viral (%)
	Control	Tratado	
EAC (600 $\mu\text{g/ml}$)	2,65 x10 ⁵	2,37x10 ⁵	10,56
EAF (1000 $\mu\text{g/ml}$)	1,87x10 ⁷	1,87x10 ⁷	—

De los resultados aquí presentados pudo establecerse que el EAF de *B. articulata* no interfirió en la adsorción del virus al receptor celular. Como los ensayos fueron realizados a 37°C, el extracto vegetal tampoco estaría modificando el mecanismo de endocitosis que permite la entrada del virus a la célula.



5.5.3. Actividad virucida con extractos acuosos

Con el propósito de determinar si los extractos acuosos ejercen actividad virucida sobre el virus *Herpes suis*, se efectuaron ensayos en los que se midió la inactivación del virus por contacto directo con cada extracto vegetal en estudio, variando las concentraciones de los mismos; para este objetivo se desarrolló la metodología detallada en el apartado 4.5.3.

En consideración a que la acción virucida de un extracto ejercida sobre un virus depende de la cantidad de partículas virales presentes en la suspensión (Zanon y col., 2005) resultó necesario evaluar frente a un mismo y alto título viral, concentraciones elevadas de las muestras vegetales. Los resultados de estas experiencias se exhiben en la **Tabla 21**.

Tabla 21: Acción virucida del EAF y EAC de *B. articulata* frente al virus *Herpes suis* tipo 1.

Extracto (MCNC)	Título de virus (UFP/ml)		Inactivación viral (%)
	Control	Tratado	
EAF	1X (1000 µg/ml)	2,32x10 ⁵	31,46
	2X (2000 µg/ml)	2,32x10 ⁵	97,84
EAC	1X (600 µg/ml)	5,2x10 ⁵	78,37
	2X (1200 µg/ml)	2,87x10 ⁶	95,99

Como puede observarse, el tratamiento del virus en presencia del EAF a una MCNC (1000 µg/ml) ejerció una inactivación viral que no superó el 32 %. Puede notarse que cuando la concentración se duplicó (MCNC 2X) la acción virucida se incrementó notoriamente. En relación al EAC el mismo ejerció con una MCNC (600 µg/ml) una importante capacidad de inactivar el virus fuera de la célula registrándose además que este valor (78,37 %) sufrió un incremento una concentración doble de este extracto.

En este diseño experimental el virus no está aun en contacto con las células, se encuentra en un medio extracelular como estaría en el ambiente. La carga viral incluida en estas experiencias es importante y superior a la que podría encontrarse contaminando los espacios donde se crían los cerdos. En Argentina, las tres principales cuencas de



producción porcina nacional, incluyen el sistema de crianza intensiva o feedlot donde muchos animales están ubicados en un espacio reducido. Los resultados de acción virucida obtenidos en este trabajo revelarían un potencial empleo de los extractos acuosos de *B. articulata* como desinfectantes ambientales de baja capacidad tóxica, en particular si se considera el rendimiento de peso seco alcanzado con el EAF.

En virtud de los numerosas publicaciones en base de datos referidas a la evaluación de acción virucida, resulta apropiado comparar los resultados aquí obtenidos con los alcanzados por otros investigadores. Se ha reportado que extractos acuosos obtenidos a partir de *Phyllanthus orbicularis* (Euphobiaceae) han mostrado ejercer capacidad para inactivar al virus a VHS-1 fuera de la célula, [García, 2003] y *Herpes Bovino tipo 1*, [del Barrio, 2000]. Por otra parte, y tal lo informado por Córdoba y col., (1991), y Chang Qing y col. (2007) trabajando con extractos acuosos de *Cedrela tubiflora* y de *Grifola frondosa* respectivamente, demostraron coincidentemente con nuestros resultados una relación dosis respuesta.

Se vuelve a remarcar que estudios fitoquímicos de los extractos acuosos de *B. articulata* aquí evaluados no se han llevado a cabo. No obstante, de acuerdo a lo informado por Cowan, (1999), se ha demostrado que es posible encontrar en extracciones acuosas de vegetales una mezcla de sustancias que incluyen entre otras, antocianinas, almidón, saponinas, terpenoides, polipéptidos y lectinas. Muchas de estas sustancias ejercen comprobada e importante actividad virucida frente a miembros de la familia Herpesviridae. Chang Qing y col. (2007), reportaron que la proteína GFAHP purificada a partir de extracto acuoso de *Grifola frondosa* (Polyporaceae) fue activa frente a VHS-1. Por otra parte, Hayashi, y col. (1995), publicaron la misma actividad sobre HSV-1 y CMV para un sesquiterpeno proveniente de *Tripterygium wilfordii* (Celastraceae).

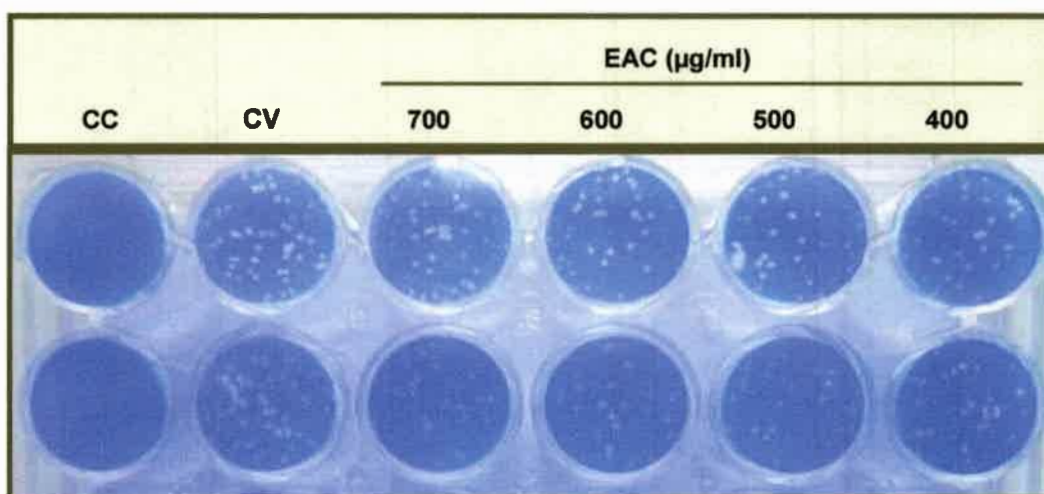
5.5.4. Determinación de la Concentración Efectiva 50% (CE₅₀)

Considerando que en los ensayos previos realizados de determinación de la actividad citotóxica de los extractos metanólico, hexánico, clorofórmico, acuoso frío y acuoso caliente de *Baccharis articulata* se demostró que sólo los extractos acuosos resultaron ser los menos tóxicos para los cultivos de células Vero. Teniendo en cuenta además que el estudio de la actividad antiviral se realizó sólo con estos extractos demostrándose que el EAC fue el que ejerció mayor actividad antiviral frente al virus *Herpes suis* tipo 1, en particular durante la etapa de la adsorción del virus a la célula, es



que se ajustó el ensayo de determinación de la concentración efectiva 50 % de esta muestra vegetal en esta etapa.

A pesar que en los estudios de citotoxicidad para determinar MCNC del EAC se estipuló éste valor en 600 $\mu\text{g/ml}$, se incluyó además en este ensayo la concentración de 700 $\mu\text{g/ml}$ tal lo indicado en el apartado 4.5.4., porque en estas condiciones de trabajo no se evidenció modificación celular. El recuento de placas de lisis de las células Vero infectadas con 60 UFP/pocillo e incubada con EAC durante la adsorción viral, (**Figura 12**), permitió construir la **Tabla 22** y graficar la **Figura 13** para calcular por intrapolación la CE_{50} % del EAC de *B. articulata*.



CC: control celular (células sin tratar); CV: control viral (60 UFP/pocillo).

Figura 12: Actividad antiviral de EAC de *B. articulata* en células Vero y frente a virus *Herpes suis* tipo 1.



Tabla 22: Inhibición de la multiplicación del virus *Herpes suis* tipo 1 por EAC de *B. articulata*, durante la adsorción, a dosis constante de virus.

EAC (µg/ml)	Acción Antiviral		
	Porcentual (n=2)		Promedio (± DS)
400	44,19	44,85	44,52 (± 0,47)
500	51,94	57,14	54,54 (± 3,68)
600	46,32	57,14	51,73 (± 7,65)
700	54,16	52,54	53,57 (± 1,14)

DS: desviación estándar.

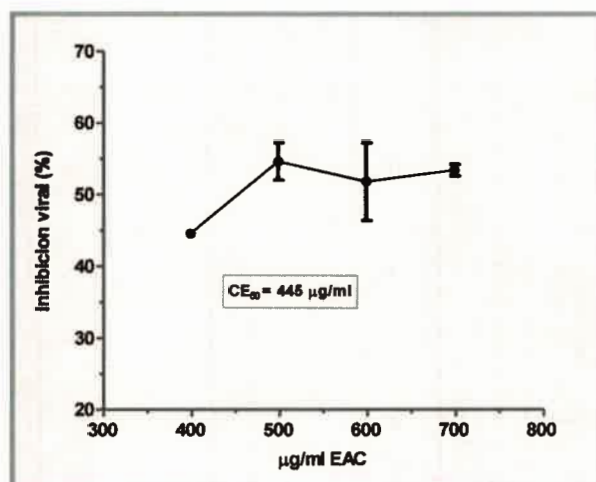


Figura 13: Inhibición viral porcentual del EAC de *B. articulata* frente al virus *Herpes suis* tipo 1.

Puede observarse que el valor de CE_{50} resultó en 445 µg/ml de EAC. El análisis estadístico de los datos utilizados para la construcción de la curva reveló un valor de $R^2=0,97$ validando el ensayo, indicando correlación entre valores de abscisas y ordenadas y certificando el valor de CE_{50} determinado. Puede notarse también en la curva y de forma llamativa que después de una determinada concentración (500 µg/ml) un aumento en la cantidad de EAC utilizado no modificó la viabilidad viral, revelando que a partir de dicha concentración hubo ausencia de relación dosis-respuesta. Se desconocen cuáles serían la o las moléculas presentes en el EAC que estarían impidiendo la adsorción y/o penetración del virus a la célula. También se ignora cuál podría ser el mecanismo de acción de las



mismas para impedir la adhesión y entrada del patógeno al huésped. No obstante, se podría inferir o especular que tal vez el fenómeno de inhibición pudiera estar aconteciendo o por ocupación estérica de los receptores celulares para el virus, que a una determinada concentración de extracto son totalmente bloqueados ya que un incremento de la cantidad de la muestra vegetal ya no influye en el proceso de inhibición viral. O también podría estar el extracto ejerciendo una acción virucida directa sobre el virus cuando este pretende entrar a la célula, tal como se demostró en el ensayo para la determinación del potencial virucida del EAC.

5.5.5. Cálculo del Índice de Selectividad

El valor obtenido de citotoxicidad (CC_{50}) para este extracto mediante la captación de rojo neutro (RN) fue de 718 $\mu\text{g/ml}$; y cuando se estableció por reducción de MTT resultó de 538 $\mu\text{g/ml}$. En ambos casos dichos valores fueron superiores a la concentración efectiva del EAC (445 $\mu\text{g/ml}$) frente al virus *Herpes suis*, arrojando los siguientes IS: para RN = 1,61 y para MTT = 1,21. Aunque estos IS son escasamente superiores a 1, son relevantes ya que indican selectividad de acción antiviral y reafirman el carácter tóxico atribuido a esta especie vegetal.

Los resultados en sí mismos son sumamente importantes ya que constituyen los primeros reportados en estudios antiherpéticos de esta especie, que le atribuyen potencial antiviral. La base de datos muestra que diferentes especies del género *Baccharis* (*B. erioclada*, *B. megapotamica* y *B. uncinella*) inhiben el efecto citopático del virus HSV-1 cepa Kos sin embargo, no demostraron esta capacidad para *B. articulata*, [Montanha y col., 2004].

En los últimos años con la especie estudiada en esta tesis doctoral se ha evaluado la capacidad antimicrobiana de extractos alcohólicos y acuosos pero no se incluye, ni se han efectuado estudios de acción antiviral, [Alcaráz y col., 2012], dando relevancia a los resultados obtenidos que figuran en la literatura científica como los pocos que se pueden encontrar disponibles en la red, [www.silae.it/docs/Atti_XIX_Full.pdf; Torres y col., 2011; Cariddi y col., 2012].

Considerando nuevamente el IS puede demostrarse, por los valores alcanzados, que el EAC de *B. articulata* ofrecería un marco seguro si se aplicara como fitofármaco.



5.5.6. Determinación de la Inhibición del rendimiento viral:

Se evaluó la capacidad antiviral del EAC frente a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 y de 0,01 a fin de conocer la acción que ejerce este extracto frente a diferentes dosis virales, empleándose dos concentraciones de la muestra vegetal que no inducen daño celular (550 y 700 $\mu\text{g/ml}$) aplicadas durante la adsorción-penetración viral. Los resultados alcanzados se exhiben **Figura 14** (sólo para MOI=0,1). En la **Tabla 23** semuestran los porcentajes de inhibición del rendimiento viral frente al extracto y estos datos fueron utilizados para la construcción de las **Figura 15**.

Como puede observarse el porcentaje de inhibición antiviral para las dos concentraciones ensayadas superaron el 50% durante el primer paso de infección viral, verificándose nuevamente ausencia de relación dosis–respuesta.

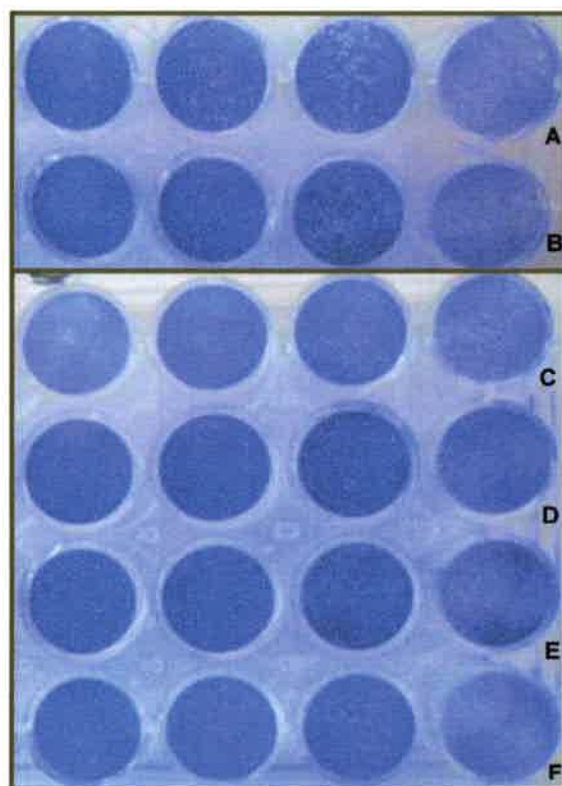


Figura 14: Inhibición del rendimiento viral a una multiplicidad de infección de 0,1 del virus *Herpes suis* tipo 1, por el tratamiento con EAC de *B. articulata*, durante la adsorción y penetración viral. A y B: placas de lisis del control viral (virus sin tratar); C y D: tratamiento con EAC a 550 $\mu\text{g/ml}$; E y F: tratamiento con EAC a 700 $\mu\text{g/ml}$.



Tabla 23: Porcentajes de Inhibición del rendimiento viral por EAC de *B. articulata*

Dosis viral (MOI)	EAC ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición del rendimiento viral (%)		Promedio (\pm DS)
MOI 0,1	550	84,07	53,06	68,56 (\pm 21,92)
	700	57,52	63,26	60,39 (\pm 4,05)
MOI 0,01	550	96,11	97	96,55 (\pm 0,62)
	700	99,68	98,38	99,03 (\pm 0,91)

MOI: multiplicidad de infección, DS: desviación estándar.

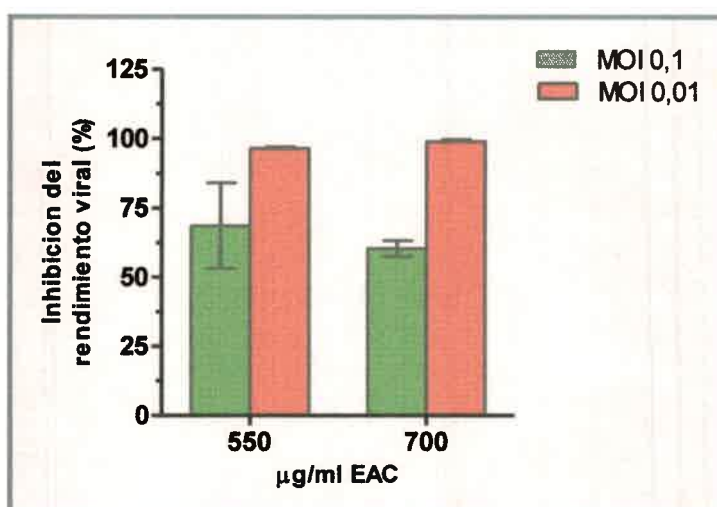


Figura 15: Inhibición del rendimiento viral (%), a distintas MOI, con EAC de *B. articulata*

El análisis de los datos obtenidos revela que, independiente de la MOI utilizada, la variable concentración de extracto no influyó en la producción viral ya que los títulos virales remanentes fueron similares, sin diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, pudo notarse que la inhibición viral respondió con un modelo dosis-respuesta cuando se trató con una misma concentración de extracto, variando la MOI, reforzando consecuentemente la actividad biológica de éste que inhibió en todos los casos en más del 50 % la replicación viral.



Estos resultados son importantes por cuanto muestran que el EAC de *B. articulata* sigue siendo igual de efectivo ante la posibilidad de enfrentarse a una concentración sustancialmente más alta de virus.

5.5.7. Determinación de la actividad antiviral de té de *B. articulata*

La actividad antiviral determinada para la infusión al 1 % de partes aéreas de *B. articulata*, como se indicó en el apartado 4.5.1.b en metodología, se muestra en la **Tabla 24**.

Tabla 24: Inhibición de la multiplicación viral, durante la adsorción viral, por la infusión de *B. articulata*.

Infusión de <i>B. articulata</i>	Título de virus (UFP/ml)		Inhibición viral (%)
	Control	Tratado	
1 % P/V	$2,85 \times 10^5$	2×10^5	29,82

La inhibición de la multiplicación viral durante la adsorción viral producida por la infusión de *B. articulata* resultó ser menor a la producida por el EAC y esta inhibición no fue sustancial porque no superó al 50 %. Es posible que el mayor tiempo de extracción para la obtención del EAC haya logrado extraer mas compuestos químicos activos frente al virus *Herpes suis* tipo 1.



5.6. Estudio del potencial genotóxico del extracto acuoso caliente de *B. articulata*

5.6.1. Determinación de muerte celular por tinción y por fragmentación nuclear en linfocitos humanos

5.6.1.a. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC₅₀) mediante tinción por exclusión al azul tripán

Mediante este estudio se evaluó el efecto del EAC de *B. articulata* sobre la viabilidad de la PBMCs de humanos sanos. Los resultados obtenidos demostraron que el extracto acuoso caliente ejerció efecto tóxico de manera dosis-dependiente, **Tabla 25**.

Tabla 25: Efectos citotóxicos del extracto acuoso caliente (EAC) de *B. articulata* sobre PBMCs de humanos sanos determinado por el método de exclusión al azul de tripán.

EAC (µg/ml)	Viabilidad celular (%) Promedio (± DS)	Valor de p (según t-student)**
Control	96,75 (± 1,20)	-
100	92,15 (± 4,74)	NS
200	87,30 (±10,70)	NS
400	84,95 (±7,28)	NS
600	52,00 (± 7,63)	<0,01
800	7,87 (±0,60)	<0,0001
1000	5,67 (±0,76)	<0,0001
1500	6,40 (±0,79)	<0,0001

** Diferencias estadísticas significativas con respecto al control.

De acuerdo al fundamento de esta técnica utilizada para evaluar viabilidad celular, pudo observarse a las células vivas refringentes, con sus membranas plasmáticas intactas, mientras que el colorante penetró en el citoplasma de aquellas células con la membrana plasmática alterada. Estas últimas, se observaron teñidas de azul y fueron consideradas no viables (**Figura 16**).

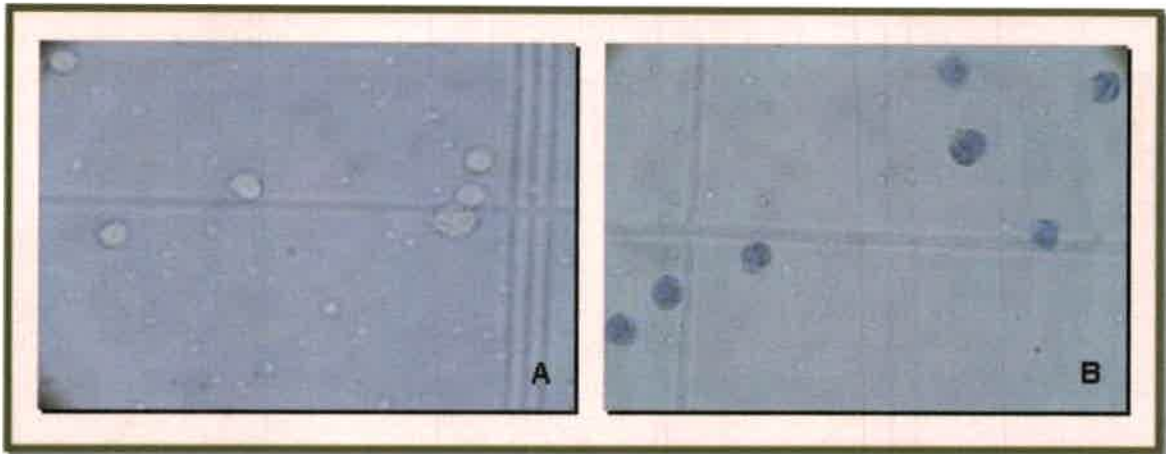


Figura 16: Microfotografías de PBMCs de humanos sanos teñidas con azul de tripán, post-incubación durante 18-24 h. A) células normales sin tratamiento (control); B) PBMCs expuestas a 1000 µg/ml de EAC de *B. articulata*. (40X).

Los resultados obtenidos en este ensayo permitieron construir la curva de citotoxicidad a partir de la cual se estableció la concentración citotóxica 50% (CC_{50}) del extracto ensayado que resultó en una $CC_{50} = 615 \mu\text{g/ml}$ (Figura 17). Este resultado no difirió de aquellos encontrados para el mismo extracto cuando se evaluó su citotoxicidad empleando cultivos de células Vero en monocapas.

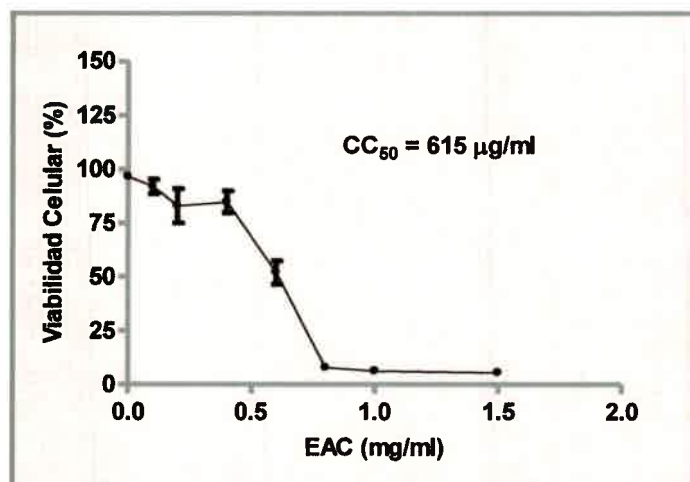


Figura 17: Porcentaje de viabilidad de PBMCs humanas *in vitro* frente a diferentes concentraciones del EAC de *B. articulata*.

Nuevamente, y al igual que los estudios de acción antiviral, no se encuentran en la base de datos estudios de citotoxicidad realizados en células mononucleares humanas con la especie *B. articulata*.



Estudios de capacidad citotóxica sobre PBMCs de humanos sanos fueron efectuados con un extracto acuoso caliente de *B. trimera*, que demostró ser capaz de inhibir el proceso inflamatorio *in vivo* inducido por carragenina en ratones, pero a las concentraciones empleadas de 25, 50 y 100 mg/ml resultó ser también fuertemente citotóxico, [Paul y col., 2009].

Con la misma especie vegetal se efectuaron estudios de citotoxicidad en cultivos celulares HEK (células epiteliales de riñón de embrión humano) y HTC (células de hepatoma de rata) pero empleando fracciones etanólicas obtenidas del extracto acuoso caliente. En estos ensayos sólo una fracción resultó ser tóxica en estos cultivos arrojando un valor de CC_{50} de 372,5 $\mu\text{g/ml}$, [Nogueira y col., 2011]. Estos datos muestran que para extracto acuoso *B. trimera* las PBMCs indicarían ser menos sensibles que los cultivos celulares HEK y HTC. En este trabajo de tesis, contrariamente y guiados por los valores de CC_{50} obtenidos en PBMCs se demostraría una misma sensibilidad de este tipo de cultivo en relación a los cultivos de células Vero para determinar potencial citotóxico.

Otros estudios fueron efectuados con otra especie del género *Baccharis*, así se registran experiencias realizadas para evaluar citotoxicidad del extracto hexánico de *B. dracunculifolia* utilizando macrófagos murinos, [Johann y col., 2010]. Los autores no pudieron demostrar capacidad citotóxica para una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ del extracto que sí mostró tener capacidad antifúngica.

Los estudios de citotoxicidad sobre PBMCs humanas, efectuados con *B. articulata* recolectada en Argentina, representan los primeros reportados para esta especie, [Cariddi y col. 2012].

5.6.1.b. Tinción nuclear con Hoechst 33258 para la visualización de apoptosis en células mononucleares humanas

Mediante la tinción nuclear con Hoechst 33258 se evaluó si la muerte celular de las PBMCs, cuantificada por la tinción de azul tripan, resultó o no de un proceso apoptótico, ya que también es posible que pudiera deberse a un fenómeno de necrosis, [Kerr y col., 1972].

En los resultados de esta evaluación se observó que las PBMCs del sistema control (sin tratar) exhibieron sus núcleos uniformemente teñidos, mientras que las PBMCs tratadas con las concentraciones a partir de 600 a 1500 $\mu\text{g/ml}$ del EAC, que por azul tripan revelaron más del 50 % de muerte celular, mostraron figuras apoptóticas tales como



condensación de cromatina, fragmentación nuclear, ampollas nucleares y cuerpos apoptóticos, **Figura 18**, compatible con los descrito por, [Iracheta, 2007].

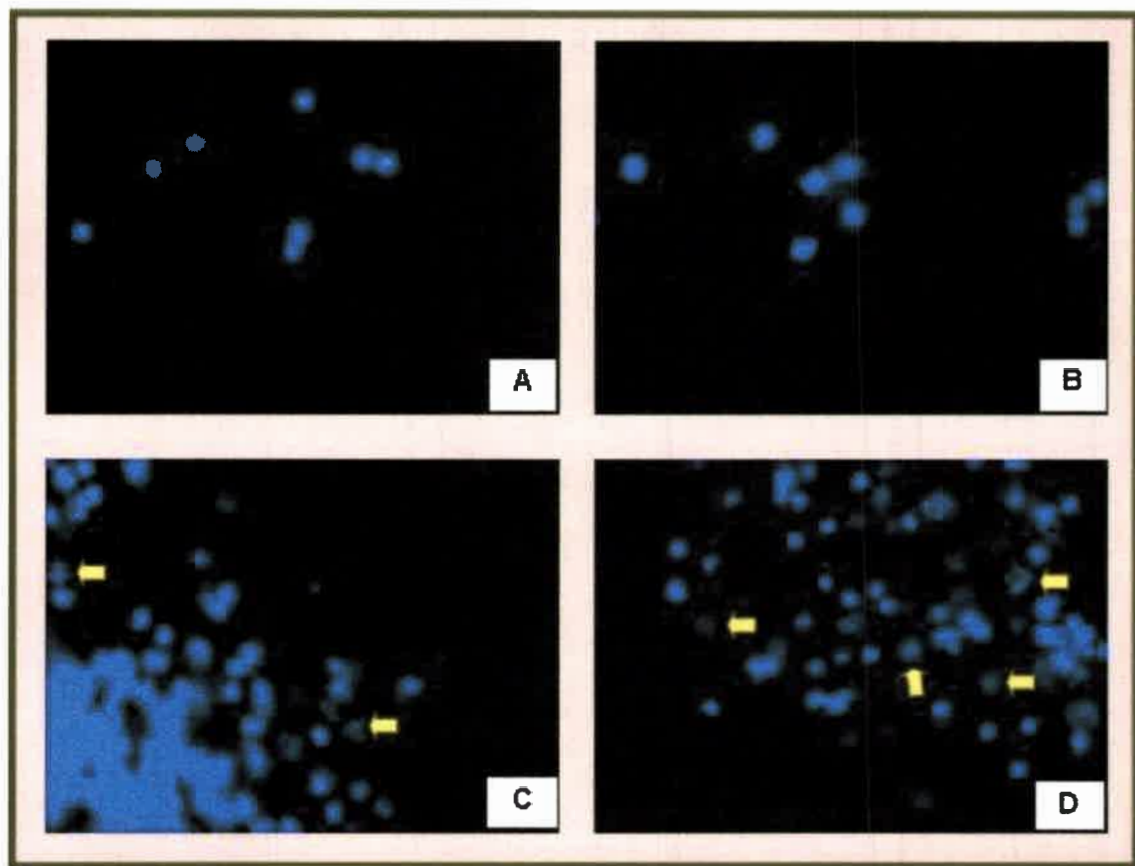


Figura 18: Microfotografías de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) teñidas con Hoechst 33258 (100 X). A) PBMCs sin tratamiento por 18-24 h (control). B) PBMCs tratadas con EAC de *B. articulata* (100 µg/ml) por 18-24 h. C) PBMCs tratadas con EAC (CC₅₀ = 600 µg/ml) por 18-24 h. D) PBMCs tratadas con EAC (1500 µg/ml) por 18-24 h. Las flechas muestran las células apoptóticas. Se observan figuras características de apoptosis (condensación nuclear, núcleos arrifionados, formación de ampollas nucleares y cuerpos apoptóticos).

5.6.1.c. Ensayo de fragmentación de ADN

La electroforesis de ADN en gel de agarosa no mostró un patrón de fragmentación de ADN característico de apoptosis en las PBMCs tratadas con el EAC de *B. articulata* a concentraciones de 600 a 1500 µg/ml, **Figura 19**.



Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa mostrando la fragmentación del ADN de linfocitos humanos sanos, tratados con el EAC de *B. articulata*. C: control (células sin tratar), calles 1-3: células tratadas con las concentraciones 100, 600 y 1500 µg/ml, respectivamente y M: marcador de peso molecular.

La muerte celular programada (MCP) puede inducirse por distintas vías, como puede ser por la vía mitocondrial o través de receptores de muerte. Cuando se inicia la apoptosis, pueden activarse caspasas que llevan a cabo la muerte celular generando cambios morfológicos apoptóticos típicos como la contracción de la célula, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. Estas proteasas son indispensables para la MCP pero no son los únicos factores determinantes de esta muerte celular. Son numerosos los estudios que se realizan en este tema y que manifiestan que la MCP puede ocurrir en ausencia de caspasas y en presencia de otras enzimas, [Bröker y col. 2005].

Los resultados obtenidos en relación a la fragmentación nuclear no muestran que este evento haya acontecido, razón por la cual no podría decirse que aquellos cuerpos apoptóticos visualizados por la tinción con Hoechst sea debida a la participación de las caspasas por la vía clásica de apoptosis tipo I, e involucraría la participación de otro tipo de proteasas como posibles ejecutoras de la muerte celular, [Bröker y col. 2005]. Lo significativo de estos resultados radica en que si bien el EAC de *B. articulata* induce la MCP por apoptosis no fragmenta el ADN de las células tratadas con ninguna de las concentraciones ensayadas de dicho extracto.



Se ha informado en varias publicaciones que sustancias químicas aisladas de especies de la familia Asteraceae producen apoptosis a través de distintas vías en PBMCs humanas y de ratón, en células HL-60 (células de leucemia promielocítica humana) y en las AGS (células del cáncer gástrico humano), [Kim y col., 2005; Mercer y col., 2007; Ogata y col., 2010].

Para la especie *Baccharis coridifolia*, se evaluaron los efectos citotóxicos de diferentes extractos sobre las PBMCs humanas demostrándose interacción con el ADN de dichas células, [Mongelli y col., 1997]. Los autores atribuirían que este tipo de interacción se debería a compuestos tales como rodirinas, verrucarinas y baccharinoides que inducirían estrés oxidativo en las células KB (células de carcinoma epidermoide oral humano), lo que podría llevar a una muerte celular por apoptosis.

La importancia de la evaluación de la muerte celular programada en el estudio del EAC de *B. articulata* radica en que estos ensayos aportan información válida en relación a las garantías de seguridad e inocuidad requeridas a nuevas drogas o medicamentos para emplearse en salud pública humana y animal; normas exigidas por los diferentes entes reguladores, entre ellos la OMS. Por lo que los estudios aquí realizados indicarían que el uso fitomedicinal de *B. articulata* debe ser controlado ya que, si bien es una hierba medicinal, podría causar daños severos si es utilizada en forma inapropiada.



5.6.2. Estudios *in vivo* de citogenotoxicidad mediante el test de *Allium cepa* L.

Para la realización del test de *Allium cepa* L. se consideraron los resultados obtenidos en los estudios de determinación de citotoxicidad del EAC de *B. articulata* en cultivos de células Vero, expresados en la Tabla 17.

En la búsqueda de sustancias antivirales a partir de extractos vegetales los trabajos publicados en el tema revelan que la concentración de numerosos extractos estudiados se encuentra en el orden de los microgramos, [Cella, 2004; Junior y col., 2005; Jeung Won, 2006; Mestrimer y col., 2006; Melo y col., 2008, Harden y col., 2009]. Como puede observarse en la Tabla 17, la concentración con capacidad citotóxica del EAC de *B. articulata* se encontró en el orden de los $\mu\text{g/ml}$, indistinto del tipo de ensayo realizado. En este mismo concepto el *National Cancer Institute* considera que sustancias con valores de CC_{50} menores a 20 $\mu\text{g/ml}$ deben ser consideradas citotóxicas sugiriendo que las mismas podrían ser estudiadas en su potencial capacidad antitumoral, excluyéndoselas para la aplicación de cualquier otra bioactividad, [Geran y col., 1972].

El EAC de *Baccharis articulata* mostró citotoxicidad en el orden de los microgramos pero a concentraciones mayores a 20 $\mu\text{g/ml}$, avalando la continuidad de los estudios de acción antiviral planteados en este trabajo de tesis doctoral. Por otra parte, las células que conforman el sistema celular empleado (línea celular continua Vero) son de origen simiano (*Cercopithecus aethiops*), de estrecha relación filogenética con el humano, por lo que admitiría la extrapolación del estudio permitiendo suponer que la toxicidad ejercida por el EAC de *B. articulata* en estos cultivos serían de igual magnitud en células humanas. Además, en estudios realizados en linfocitos humanos, el valor de CC_{50} se estableció en 615 $\mu\text{g/ml}$ determinado por la técnica de azul del tripán.

Los resultados de citotoxicidad alcanzados con el EAC de *B. articulata* avalarían su potencial uso fitoterápico debido a que las concentraciones que inhiben al virus *in vitro* no afectaría a las células tratadas. Dichos resultados resultan por lo tanto confiables y sientan las bases para la realización de una evaluación más profunda de la seguridad del extracto. En este aspecto, se requiere la realización de ensayos *in vivo* que indaguen el comportamiento del EAC de *B. articulata* en sistemas vivos, que garanticen aún más su seguridad e inocuidad para un futuro uso terapéutico.

En la actualidad se considera que para establecer la seguridad e inocuidad de un compuesto no es suficiente el estudio toxicológico tradicional sino que se requiere realizar la evaluación de la interacción de las sustancias químicas con el material genético celular, debido a que se ha encontrado que algunas sustancias peligrosas resultaron no tóxicas y



si genotóxicas, [Díaz García, 2002]. Los estudios realizados con el fin de determinar si algún compuesto resulta nocivo para el material genético ponen de manifiesto la capacidad de inducir cambios en el ADN y facilitan la ponderación del daño genotóxico si se aplicaran en humanos, [Guzmán Cano, 2008].

En este trabajo de tesis se realizó el estudio de genotoxicidad a través del test de *Allium cepa* L. Esta prueba es muy utilizada para la evaluación de la citotoxicidad y la genotoxicidad de mezclas complejas de sustancias, que ofrece la ventaja de ser un ensayo rápido, reproducible y tan sensible como otras pruebas de toxicidad que se efectúan con cultivos de linfocitos humanos o con algas, [Fiskesjo, 1985; Leme y Marín Morales, 2009; Bhattacharya y Haldar, 2010]. El ensayo de aberraciones cromosomales en raíces de *Allium* es un bioensayo establecido y validado por el Programa Internacional de Seguridad Química y el Programa Medioambiental de las Naciones Unidas como un test estándar y eficiente para el monitoreo *in situ* de genotoxicidad de sustancias medio-ambientales, [Cabrera y Rodríguez, 1999]. Por esta razón está avalada y es sugerida por la OMS como una técnica confiable para la evaluación genotóxica y/o mutagénica de numerosas sustancias químicas, [Cotelle y col., 1999; Yi y Meng, 2003; Lerda y col., 2005].

La evaluación de daños genéticos a través del test de *Allium cepa* L. brinda muchas variaciones metodológicas que se muestran en diversos trabajos publicados, [Evandri y col., 2000; Andrioli y col., 2006; Kuras y col., 2006; Konuk y col., 2007].

En el diseño experimental planteado para el estudio del potencial citogenotóxico por este test incluyó una exposición sostenida de los bulbos de cebollas al EAC de *B. articulata* durante 2 y 5 días, a concentraciones estable y con recambio diario, acorde a las aplicaciones convencionales de la mayoría de los antimicrobianos.

También se realizó la prueba aplicando una dosis del extracto, con recambio diario, durante 2 días; luego los huéspedes fueron sometidos a un proceso de depuración del extracto quitando el mismo y exponiendo los huéspedes sólo a agua mineral durante 3 días más hasta completar el ensayo. Esta metodología ofrece la ventaja de poder evaluar como influiría en el genoma del huésped el EAC aplicado en una terapia corta y evaluar la posibilidad de depuración del posible daño ejercido.

En estos ensayos se emplearon concentraciones que no resultaron citotóxicas en cultivos celulares Vero (MCNC= 600 µg/ml) y superiores a ella hasta alcanzar 4,8 mg/ml, que según la bibliografía indica como concentraciones posibles a utilizar en fitomedicina, [Fachinetto y col., 2007].



5.6.2.a. Análisis de parámetros macroscópicos

Antes de comenzar con los tratamientos indicados para este estudio se procedió a promover el desarrollo radicular de los bulbos de *Allium*, proceso en donde no se evidenció un 100% de germinación radicular. Es posible que algunos bulbos no desarrollaran raíces porque estuvieron expuestos a sustancias químicas, muchas veces utilizadas para su preservación en el comercio. Para garantizar la validez de los ensayos fueron seleccionados aquellos bulbos que evidenciaron un buen desarrollo radicular, con raíces blancas, consistentes y de longitud variable, como se observa en el apartado 4.6.2. Los ensayos se realizaron conforme al Diagrama 9 del mismo apartado.

Para el análisis macroscópico se consideró el número y la longitud radicular, parámetros indicadores de la toxicidad del extracto, [Fiskesjö, 1985]. Se determinaron además la presencia y frecuencia de anomalías morfológicas generadas en las raíces, tales como ganchos radiculares, necrosis, gelificación y tumoración. Los resultados obtenidos para un tratamiento con el EAC de *B. articulata* sostenido durante 5 días y para el ensayo de reversión se resumen en las Tablas 26 y 27, respectivamente.



Tabla 26: Valores promedio del número y longitud de raíces de *Allium cepa* L, y diferentes anomalías producidas luego del tratamiento durante 5 días con distintas concentraciones de EAC de *B. articulata*.

PARÁMETRO EVALUADO	TRATAMIENTOS (n = 4 bulbos)							
	EAC de <i>Baccharis articulata</i> (mg/ml) durante							
	C (-)	C (+)	5 días de tratamiento					Total
0,6			1,2	2,4	3,6	4,8		
Nº Raíces	54	40	36	33	33	30	38	
Longitud promedio de raíces (cm) (± DS)	4,37 (± 2,42)	2,96 (± 3,15)	2,91 (± 1,67)	2,67 (± 0,82)	2,67 (± 0,44)	2,42 (± 0,44)	2,62 (± 0,80)	
Crecimiento porcentual	100	69	66,66	61,11	61,11	55,55	60,00	
Anormalidades	Ga ¹	5	6	1	1	0	0	13
	Ne ²	0	0	15	3	7	13	77
	Tu ³	1	8	0	0	0	0	9
Total de anomalías	6	14	16	4	7	13	30	90

Ga¹: gancho; Ne²: necrosis; Tu³: tumor.



Tabla 27: Valores promedio del número y longitud de raíces de *Allium cepa* L, y diferentes anomalías encontradas luego del tratamiento durante 2 días con distintas concentraciones de EAC de *B. articulata* y luego expuestas por 3 días a agua mineral, (ensayo de reversión).

PARÁMETRO EVALUADO	TRATAMIENTOS (n = 2 bulbos)							
	Concentraciones de EAC de <i>B. articulata</i> (mg/ml) aplicado durante 2 días, luego reemplazado por agua mineral aplicada durante 3 días más							
	C(-)	C(+)	600	1200	2400	3600	4800	Total
N° Raíces	42	27	35	36	43	44	39	
Longitud promedio de raíces (mm) (± D.E)	3,21 (± 0,56)	1,96 (± 1,30)	2,70 (± 1,19)	2,28 (± 0,53)	1,28 (± 0,88)	1,05 (± 0,66)	1,03 (± 0,52)	
Crecimiento porcentual	100	61,06	84,12	71,32	39,88	32,80	32,09	
Anormalidades	Ga ¹	5	6	1	0	0	0	12
	Ne ²	0	1	7	1	10	8	35
	Tu ³	0	5	0	0	0	0	5
Total de anomalías	5	12	8	1	10	8	8	55

Ga¹: gancho; Ne²: necrosis; Tu³: tumor.



El análisis de los datos precedentes referidos al número de raíces obtenido en ambos sistemas control negativo resultó acorde a lo informado en la literatura, [Tülay y Özlem, 2010]. Por otra parte, la comparación entre el número de raíces contadas en cada sistema control negativo vs el sistema control positivo reveló diferencias notorias esperadas ya que Paracetamol indujo una reducción en la radiculación del 26 % (5 días) y 36 % (ensayo de reversión), comportamiento acorde a lo reportado en la bibliografía para esta droga a la concentración utilizada, [Rathore y Choubey, 2005].

Respecto de todos los tratamientos con el EAC aplicado durante 5 días vs el sistema control negativo (Tabla 26) pudo observarse una notable disminución de la radiculación inducida por todas las concentraciones de extracto ensayadas, sin que pudiera establecerse una relación dosis-respuesta. Esa inhibición estuvo en el rango 35 al 45 % e incluso fue superior al valor de inhibición de radiculación generado por Paracetamol, indicando que el EAC de *B. articulata*, a las concentraciones ensayadas, resulta tóxico. Sin embargo, si fuera extremadamente tóxico podría haber generado desprendimiento radicular, disminuyendo el número de raíces que presentaban los bulbos al inicio del ensayo y eso no aconteció a pesar de notarse una importante cantidad de raíces con aspecto necrotizado en todos los tratamientos con EAC; esa necrotización fue marcadamente alta a las concentraciones 3,6 y 4,8 mg/ml.

Cuando se evaluaron las anomalías macroscópicas pudo notarse que en el sistema control negativo sólo fue posible evidenciar la presencia de ganchos radiculares y de tumores con una frecuencia baja. Estas alteraciones espontáneas son normales y coinciden con lo que describen Fiskesjö (1994) y Bidau y col., (2004). La presencia de ganchos se asocia con alguna alteración del proceso de división de las células meristemáticas apicales, que han detenido en parte su desarrollo por un proceso mutagénico espontáneo, dando lugar a un crecimiento asimétrico de las mismas y conduciendo a la aparición de aquella anomalía. Respecto de los tumores también se conoce que se producen debido a una mutación en el genoma, o a la interacción de sustancias con las raíces de las plantas. Estas dos anomalías pueden aumentar en número cuando el meristema apical es expuesto a compuestos xenobióticos.

Para este estudio fue necesaria la inclusión de una droga que induzca anomalías y que definió al sistema control positivo. Para el test de *Allium cepa* L. una droga ampliamente utilizada es el Paracetamol. Esta sustancia es una droga analgésica, antipirética, no esteroide utilizada para combatir el dolor [El Garbulli y Bashasha, 2008]. El efecto genotóxico del Paracetamol ha sido registrado en muchos sistemas de ensayos



tales como la malformación congénita de embriones, la inhibición de síntesis del ADN y el incremento de intercambio de cromátides hermanas en células de hámster [Hongslo y col., 1990]. En nuestro sistema, el comportamiento de Paracetamol sobre las raíces tratadas revelaron la presencia de ganchos radiculares, que representaron el 15 % (6 de 40) del total de este tipo de anomalías. Esta droga también indujo la aparición de tumores, cuya frecuencia fue del 20 %, valor también superior al encontrado en el sistema control negativo.

En relación a la presencia de ganchos y tumores en las raíces tratadas con las distintas concentraciones del extracto, no pudo demostrarse que estas alteraciones fueran significativas. En contraposición, la anomalía más frecuente detectada fue la presencia de raíces con aspecto necrotizado, con pérdida de turgencia y coloreadas, (**Figura 20**). La presencia de esta anomalía reflejaría el carácter tóxico del extracto que muestra cierta relación dosis respuesta a partir de la concentración 1,2 mg/ml.

El comportamiento de Paracetamol para inducir anomalías en las raíces tratadas fue tres veces superior a las anomalías encontradas en el sistema control negativo. Las anomalías asociadas a las actividades de Paracetamol se describen como ganchos y/o tumores sin que se indique para esta droga que tenga capacidad necrotizante, [Bidau y col., 2004; Rathore y Chaubey, 2005, Tülay y Özlem, 2010].

Cuando se compara el porcentaje de anomalías encontradas en las raíces tratadas con el EAC se observa que estas fueron marcadamente superiores al de Paracetamol a excepción de las concentraciones 1,2 y 2,4 mg/ml, **Tabla 28**. Sin embargo y a favor del EAC dentro de estas anomalías la más importante fue la capacidad necrotizante, sin que influyeran significativamente la presencia de los ganchos y tumores, anomalías asociadas con interacciones genómicas, sugiriendo que el carácter tóxico del extracto sería diferente al de Paracetamol.

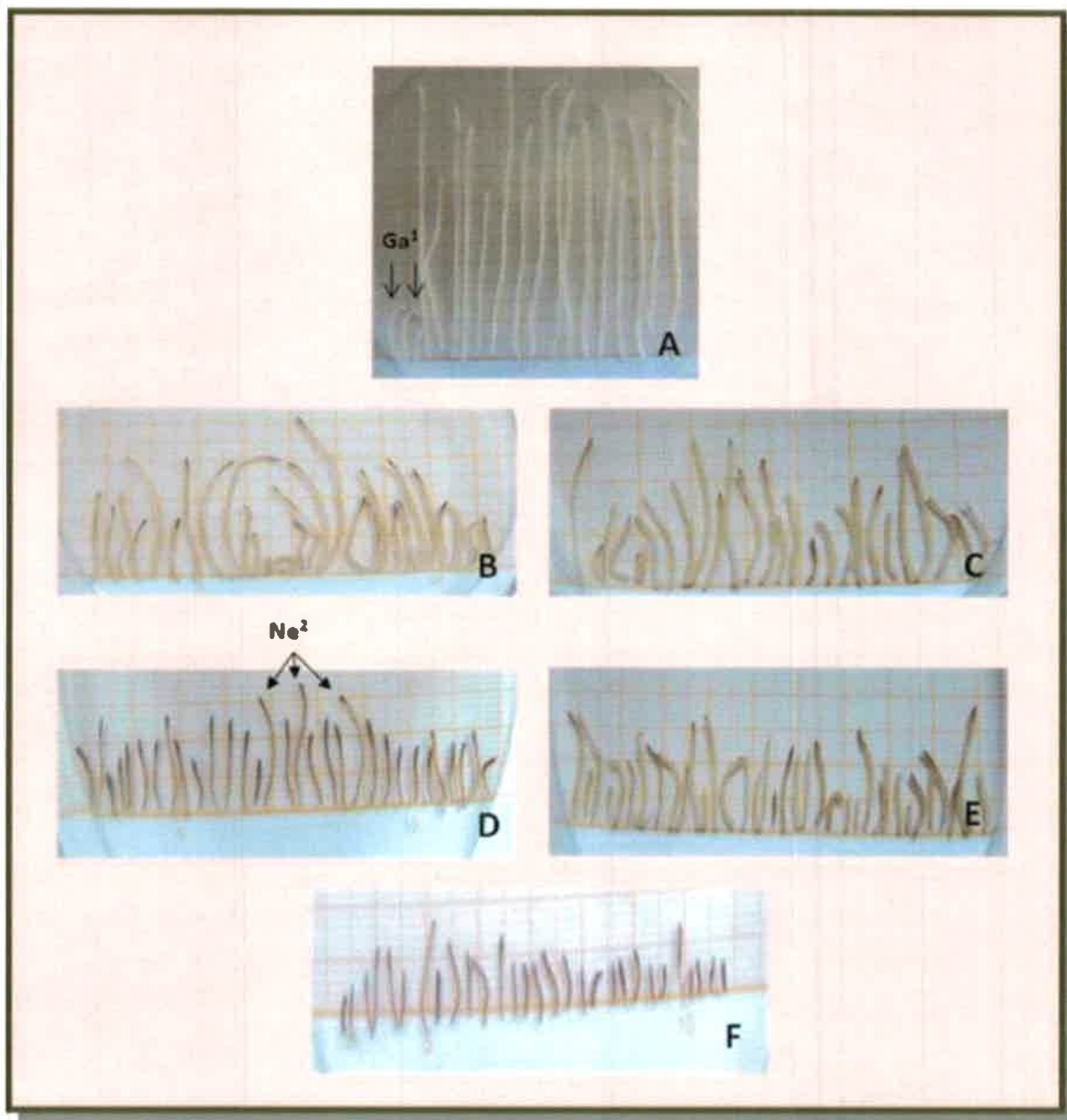


Figura 20: Aspecto morfológico de raíces de *Allium cepa* L. expuestas al EAC de *B. articulata* durante 5 días: A) control negativo, B) 600 µg/ml, C) 1200 µg/ml, D) 2400 µg/ml, E) 3200 µg/ml y F) 4800 µg/ml. Alteraciones morfológicas: Ga¹: puntas con ganchos, Ne²: necrosis.



Tabla 28: Valores de anomalías macroscópicas presentes en las raíces de *Allium cepa* L. tratadas durante 5 días con distintas concentraciones de EAC de *B. articulata*.

Tratamiento (5 días) EAC (mg/ml)	Raíces totales	Raíces anormales	Porcentaje de raíces anormales
C (-)	54	6	11,11
0,6	36	16	44,44
1,2	33	4	12,12
2,4	33	7	21,21
3,6	30	13	43,33
4,8	38	30	78,94
C (+)	40	14	35,00

Seguando con el análisis de la tabla 26, los datos referidos al parámetro longitud promedio de las raíces fueron tomados para la construcción de la **Figura 21**, expresando los valores de desarrollo radicular de manera porcentual respecto del sistema control negativo, el cual se asume creció un 100%.

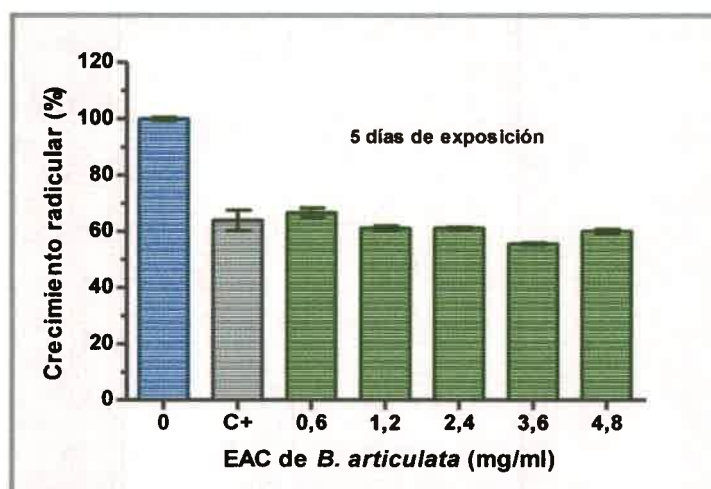


Figura 21: Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de *Allium cepa* L. inducido por distintas concentraciones del EAC de *B. articulata* aplicado durante 5 días consecutivos.



El análisis de estos valores reveló diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos vs el sistema control negativo, con un $p < 0,05$. En contraposición no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con todas las concentraciones de EAC empleadas.

Como se indicó, para un tratamiento sostenido de las raíces de *Allium*, durante 5 días con el EAC de *B. articulata*, la anormalidad más destacada fue el aspecto necrotizante. Este efecto se asoció a la distinción de raíces con pérdida de turgencia, flácidas, muchas veces con el ápice radicular romo y fuertemente coloreadas; esto último tal vez atribuido a la presencia de los pigmentos en el EAC. El aspecto necrotizante observado no necesariamente reflejaría muerte de las células apicales de las raíces, ni implica que fuera un proceso irreversible. Por esta razón se diseñó el tratamiento sostenido durante 2 días con el EAC y luego durante 3 días más con agua mineral, para ponderar posible reversión de daño radicular. La **Tabla 27** muestra los resultados de los ensayos de reversión que nos permiten evaluar los daños macroscópicos de este tipo de tratamiento además del número y longitud radicular.

El análisis de la **Tabla 27** reveló nuevamente el carácter tóxico del Paracetamol que redujo la radiculación en un 36 %. En relación al número promedio de raíces encontradas en los bulbos sometidos a distintos tratamientos con el EAC, fue en todos los casos superior al encontrado en los bulbos tratados con Paracetamol y mostró clara diferencia de comportamiento al tratamiento sostenido por 5 días. Estos resultados muestran que el impacto negativo que ejerció el EAC sobre la radiculación es menor cuando el tratamiento fue de 2 días porque pudo ser revertido por el agua mineral. Notablemente para las concentraciones más altas de extracto empleadas (2,4; 3,6 y 4,8 mg/ml) la radiculación incluso superó al control negativo, revelando una reactivación que incidió positivamente aumentando el número promedio de raíces registradas. Que aumente el número de raíces no significa que la longitud promedio de las mismas deba aumentar, de hecho, para las concentraciones de 0,6 y 1,2 mg/ml el número radicular, como se indicó, no superó a las encontradas en el sistema control negativo, **Figura 22**.

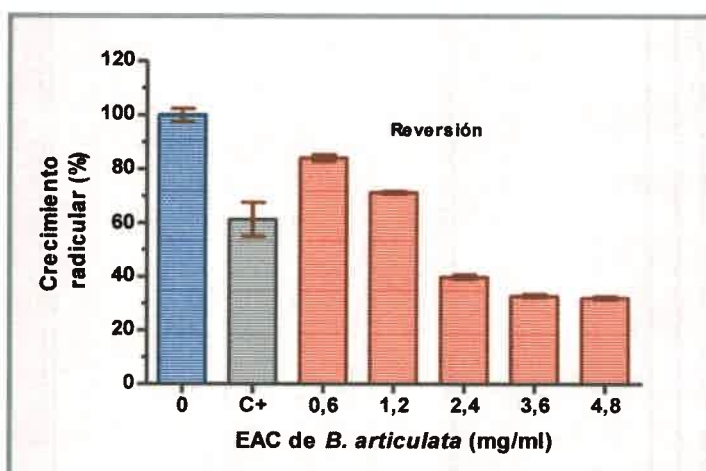


Figura 22: Inhibición porcentual del crecimiento radicular de bulbos de *Allium cepa* L. inducido por distintas concentraciones del EAC de *B. articulata* aplicado durante 2 días y luego sometidas a depuración por 3 días con agua mineral (Reversión).

Un análisis comparativo del crecimiento longitudinal de las raíces para ambos tratamientos se observa en la **Figura 23** y revela una diferencia estadísticamente significativa en la capacidad de recuperación de las mismas para los tratamientos con las dos concentraciones más bajas (0,6 y 1,2 mg/ml). Ya que crecieron un 20 y 10 % más, respectivamente.

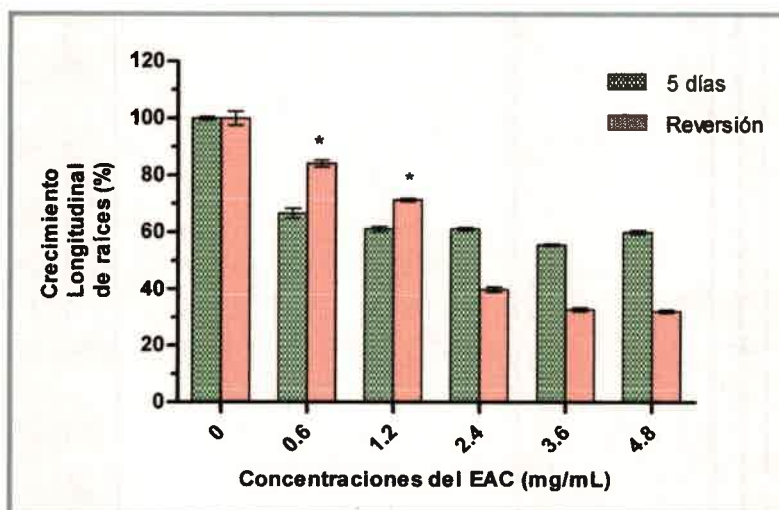


Figura 23: Comparación entre la longitud de raíces de bulbos de *Allium cepa* L., expuestas a distintas concentraciones de EAC de *B. articulata* durante 5 días vs aquellas tratadas por 2 días y luego sometida a depuración por 3 días con agua mineral (reversión).



En relación a las alteraciones macroscópicas inducidas por las diferentes concentraciones del EAC en el ensayo de reversión, puede observarse que se repitió el mismo comportamiento del tratamiento de 5 días. Las raíces evidenciaron, con muy baja frecuencia y sin significancia, la presencia de ganchos y tumores con un comportamiento similar al control negativo y nuevamente, la alteración morfológica más significativamente detectada fue la presencia de raíces con aspecto necrotizado.

Comparando la frecuencia porcentual de anomalías registradas en raíces tratadas con el EAC durante 5 o 2 días muestra claramente una reversión de este daño por acción del agua mineral que alcanzó en algunos casos hasta el 58%, mientras que no hubo modificaciones en el sistema control negativo, **Tabla 29**.

Tabla 29: Comparación de valores porcentuales de anomalías macroscópicas presentes en la raíces de *Allium cepa* L. tratadas con distintas concentraciones del EAC de *B. articulata* durante 5 días y en ensayo de reversión.

Tratamiento con EAC (mg/ml)	Porcentaje de Anomalías en los tratamientos de:	
	5 días	reversión
C (-)	11,11	11,90
C (+)	35,00	44,44
0,6	44,44	22,85
1,2	12,12	2,77
2,4	21,21	23,25
3,6	43,33	18,18
4,8	78,94	20,51

Estos resultados revelarían que el aspecto necrotizante observado en las raíces tratadas durante 5 días no se correspondería con la muerte de las células del tejido meristemático apical, por lo que fue necesario determinar valores de índices mitóticos.



5.6.2.b. Análisis de parámetros microscópicos

El bioensayo que utiliza los bulbos de *Allium cepa* L., permite evaluar toxicidad de sustancias en función de parámetros macroscópicos como el crecimiento y la forma de las raíces, tal como se indicó, pero además permite la cuantificación de parámetros microscópicos citológicos como los tipos y frecuencias de aberraciones cromosómicas y divisiones celulares anormales. El test tiene la ventaja de utilizar una planta. Es conocido que en un organismo su crecimiento está cuidadosamente controlado mediante un ciclo celular perfectamente regulado. En las plantas las raíces continúan creciendo mientras buscan agua y nutrientes. Estas regiones de crecimiento sirven para estudiar el ciclo celular porque en cualquier momento se pueden encontrar células que están sufriendo mitosis. En el test de *Allium cepa* L. se emplean bulbos de plantas de cebolla a los que después de tratamientos de pruebas se les examinan las puntas de sus raíces cuyas células han sido teñidas para hacer visibles los cromosomas. Se destaca que el corte de la raíz y la dispersión de sus células (*squash*) captura muchas de las mismas en diferentes fases del ciclo celular por ser éste un mecanismo no sincrónico, pero si continuo. Con lo cual la evaluación microscópica de posibles alteraciones en las distintas fases del ciclo celular fue otro de los propósitos de este trabajo.

Un parámetro considerado en numerosas investigaciones es el estudio del Índice Mitótico (IM), éste es el análisis cuantitativo de células en división. También se consideró el Índice de Fases (IF), cuya determinación se efectúa con el recuento de células, las que en división, se encuentran en las distintas fases del ciclo celular, [Rank y Nielsen, 1998; Chauhan y col., 1999; Bushra Ateeq y col., 2002; Rank y col., 2003].

Los valores de IM e IF fueron calculados de acuerdo a las fórmulas descriptas en el apartado 4.6.2.b. y fueron determinados considerando los datos que se obtuvieron luego del tratamiento con el EAC de *B. articulata* durante 2 días (IM1), más una dosis sostenida del extracto por 3 días más (IM2) o el tratamiento por esos 3 días con agua mineral para evaluar recuperación del daño inducido por el extracto vegetal (IM3) y sus respectivos IF, (Tablas 30, 31 y 32).



Tabla 30: Valores de los parámetros microscópicos analizados en raíces de *Allium* cepa L. luego del tratamiento durante 2 días con distintas concentraciones de EAC de *Baccharis articulata*, (IM1).

Tratamiento	Subo	PARÁMETROS EVALUADOS												Índice Medio 1 An / IM promedio	ÍNDICES DE FASES (%)		
		NÚMERO DE CÉLULAS POR FASE DEL CICLO CELULAR						Total	Tetras	Anaf	Prof	Met	Anaf		Tetof		
		Total	A*	Total	A*	Total	A*										
Control negativo	A	1432	-	18	-	10	-	1471	232	42,1	22,88	26,21	7,29				
	B	1733	-	39	-	1	-	1777	247	33,6	4,84	2,27	4,84				
	C	1255	-	8	-	8	-	1251	2,1	30,7	2,2	3,07	15,4				
	D	1218	-	14	-	4	-	1242	2,0	53,8	18,4	18,4	18,4				
Control positivo	A	2000	-	9	-	3	-	2037	0,7	52,9	17,8	11,7	11,7				
	B	1055	-	3	-	1	-	1058	0,34	30	20	10	40				
	C	1832	-	3	-	3	-	1832	0,47	33,2	11,1	32,2	22,2				
	D	1487	-	8	-	2	-	1478	0,74	48,4	12,2	18,2	18,2				
0,5	A	1351	-	3	-	4	-	1353	0,9	47,08	28	33,3	0				
	B	1208	-	3	-	2	-	1212	0,74	33,33	11,11	22,22	33,33				
	C	1830	-	7	-	3	-	1832	0,78	53,34	7,88	18,38	23,33				
	D	1283	-	3	-	5	-	1294	1	33,07	20,78	32,48	7,89				
1,2	A	2000	-	2	-	1	-	2009	0,4	22,22	11,11	11,11	55,55				
	B	1222	-	2	-	0	-	1224	0,2	100	0	0	0				
	C	1890	-	9	-	0	-	1900	0,8	90	0	0	10				
	D	1480	-	1	-	1	-	1488	0,3	20	0	20	60				
2,4	A	1888	MN/ (A1)	2	-	0	-	1890	0,12	100	0	0	0				
	B	2000	CD	0	-	0	-	2000	0	0	0	0	0				
	C	158	CD	0	-	0	-	158	0	0	0	0	0				
	D	888	CD	0	-	0	-	888	0	0	0	0	0				
3,8	A	739	CD	0	-	0	-	739	0	0	0	0	0				
	B	1240	MN/ (B1)	0	-	0	-	1240	0	0	0	0	0				
	C	792	CD	0	-	0	-	792	0	0	0	0	0				
	D	880	CD	0	-	0	-	880	0	0	0	0	0				
4,8	A	732	CD	5	-	0	-	738	0,8	33,3	0	0	16,7				
	B	1178	MN/ (C8)	0	-	0	-	1178	0	0	0	0	0				
	C	1362	MN/ (A4)	0	-	0	-	1362	0	0	0	0	0				
	D	1733	MN/ (D7)	0	-	0	-	1733	0	0	0	0	0				

A*: células con anomalías. IM: índice mitótico. CD: células destruidas. MN²: micronúcleos. FC³: fragmentación cromosómica



Tabla 31: Valores de los parámetros microscópicos analizados en raíces de *Allium cepa* L. luego del tratamiento durante 5 días con distintas concentraciones de EAC de *Baccharis articulata*, (IM2).

Tratamiento	Diseño	PARÁMETROS EVALUADOS																	
		NÚMERO DE CELULAS POR FASES DEL CICLO CELULAR										Total	Índice Mitótico 2 (%IM promedio)		ÍNDICES DE FASES (%)				
		Interfase		Profase		Metáfase		Anafase		Telofase					Prof	Met	Anaf	Telof	
Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*										
Control negativo	C	1506	-	44	-	7	-	10	-	19	-	1586	5.31	5.72	55	8.75	12.5	23.75	
	D	1486	-	54	-	12	-	22	-	9	-	1583	5.13		55.67	12.37	22.68	9.28	
	C	1383	-	8	-	1	-	1	-	2	-	1396	0.96		66.86	8.33	8.33	16.66	
	D	1273	-	5	-	0	-	1	-	2	-	1281	0.60		62.50	0	12.5	25	
EAC (mg/kg) 5000	0.6	C	1013	-	4	-	1	-	0	-	2	-	1020	0.68	0.68	57.14	14.28	0	28.57
		D	1433	-	5	-	2	-	1	-	1	-	1443	0.69		60	20	10	10
	1.2	C	637	CD ¹	0	-	0	-	0	-	0	-	637	0	0.31	0	0	0	0
		D	1417	-	9	-	0	-	0	-	0	-	1426	0.63		100	0	0	0
	2.4	C	200	CD ¹	0	-	0	-	0	-	0	-	200	0	0	0	0	0	0
		D	487	CD ¹	0	-	0	-	0	-	0	-	487	0		0	0	0	0
	3.6	C	10	CD ¹	0	-	0	-	0	-	0	-	10	0	0	0	0	0	0
		D	80	CD ¹	0	-	0	-	0	-	0	-	80	0		0	0	0	0
	4.8	C	13	CD ¹	0	-	0	-	0	-	0	-	13	0	0	0	0	0	0
		D	403	CD ¹	0	-	0	-	0	-	0	-	403	0		0	0	0	0

A*: células con anomalías IM: índice mitótico. CD¹: células destruidas.



Tabla 32: Valores de los parámetros microscópicos analizados en raíces de *Allium cepa* L. luego del tratamiento durante 2 días con distintas concentraciones de EAC de *Baccharis articulata* y luego con 3 días de agua mineral (reversión), (IM3).

Tratamiento	Bulbo	PARÁMETROS EVALUADOS												INDICES DE FASES (%)					
		NUMERO DE CELULAS POR FASES DEL CICLO CELULAR										Total	Indice Mitótico 3 (%)/IM Promedio (aSEM)	Prof	Met	Anaf	Telof		
		Interfase		Profase		Metafase		Anafase		Telofase									
Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*	Total	A*								
Control negativo	A	1287	-	47	-	6	-	6	-	8	-	1354	4.94	3.22	70.14	8.95	8.98	11.94	
	B	910	-	6	-	1	-	3	-	6	-	924	1.51		36.71	7.14	21.42	36.71	
Control positivo	A	1373	-	19	-	2	-	6	-	7	-	1407	2.42	4.78	55.88	5.88	17.64	20.58	
	B	1506	-	65	-	11	-	10	-	15	-	1622	7.15		64.35	10.89	9.90	14.85	
EAC (mg/mL) 2 días+ 3 de agua	0.6	A	1313	-	78	-	15	-	18	-	6	-	1430	8.18	5.69	66.66	12.82	15.38	5.12
		B	1450	CD ¹	23	-	9	-	9	-	7	-	1498	3.20		47.92	18.75	18.75	14.58
	1.2	A	1232	-	7	-	3	-	2	-	2	-	1246	1.12	1.86	50	21.42	14.28	14.28
		B	1243	-	22	-	2	-	6	-	3	-	1276	2.58		66.66	6.06	18.18	9.09
	2.4	A	100	CD ¹	0	-	0	-	0	-	0	-	100	0	0.81	0	0	0	0
		B	970	CD ¹	12	-	0	-	1	-	3	-	986	1.62		75	0	6.25	18.75
	3.6	A	540	CD ¹	0	-	0	-	0	-	0	-	540	0	0	0	0	0	0
		B	40	CD ¹	0	-	0	-	0	-	0	-	40	0		0	0	0	0
4.8	A	1100	CD ¹	0	-	0	-	0	-	0	-	1100	0	0	0	0	0	0	
	B	650	MN ² (60)	0	-	0	-	0	-	0	-	650	0		0	0	0	0	

A*: células con anomalías. IM: índice mitótico. CD¹: células destruidas. MN²: micronúcleos.

Para todos los tratamientos y en relación al sistema control negativo, dicho análisis reveló que todos los IM evaluados estuvieron dentro de los registros normales. Pudieron observarse células, con distinta frecuencia, que estaban transitando normalmente por cada etapa del ciclo de la división celular, **Figura 24**.

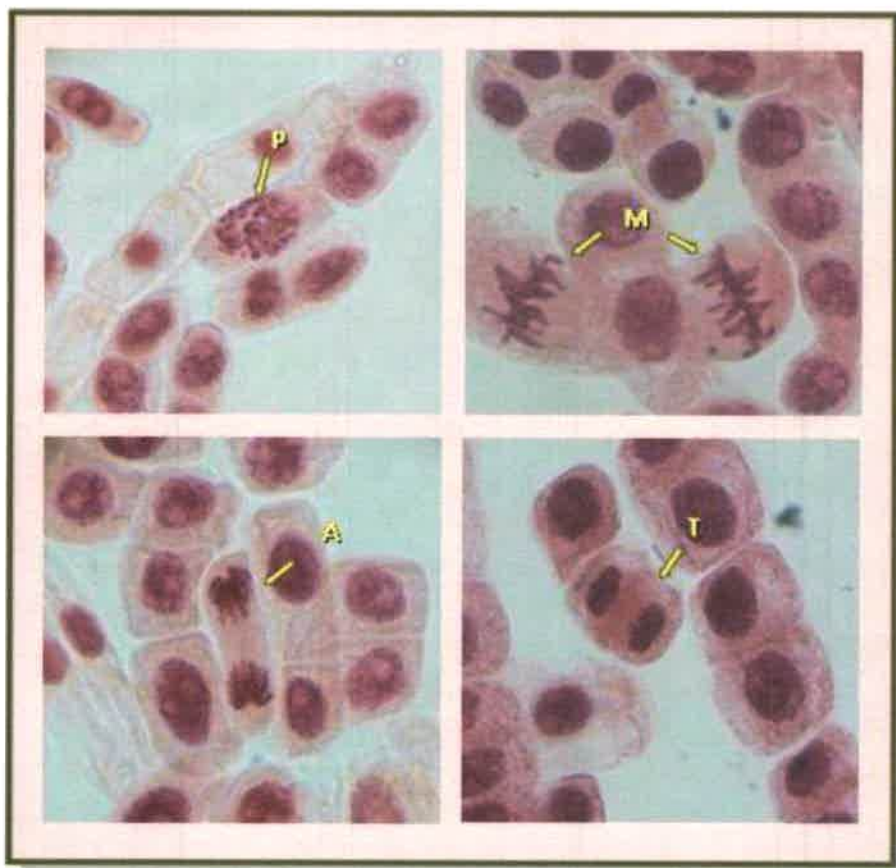


Figura 24: Células meristemáticas de raíces de *Allium cepa* L. en interfase y en diferentes estadios de la división celular presentes en el sistema control negativo. P: profase, M: metafase, A: anafase y T: telofase.

En contraposición, el tratamiento durante 2 días con las diferentes concentraciones del EAC indicó modificación de las etapas del ciclo celular, (**Tabla 30**). Claramente se observa que para las más altas concentraciones empleadas (2,4; 3,6 y 4,8 mg/ml) no fue posible llevar a cabo el registro de células que estuvieran durante las etapas de metafase, anafase ni telofase. Para la concentración de 1,2 mg/ml muy pocas células lograron entrar



en profase y solo la concentración 0,6 mg/ml permitió que las mismas transitaran por todas las etapas de la mitosis, aunque con muy baja frecuencia.

Estos datos permiten concluir que el EAC influyó en la división celular induciendo un arresto en interfase, en la mayoría de los casos, verificado por los valores de IF. Los efectos antimitóticos se atribuyen frecuentemente al bloqueo de la síntesis de ADN y proteínas nucleares que ocurren en la fase S de la Interfase, lo que en este estudio podría atribuirse a la acción de alguno o varios componentes del EAC. Se observa que la modificación de los IM mostró una relación dosis-respuesta. Se encontró además, que Paracetamol modificó también el IM.

En los valores obtenidos sobre la distribución de las células en las distintas fases de la división, cuando se expusieron los bulbos de *Allium* al EAC durante 48 h, (**Figura 25**) puede observarse que a distintas concentraciones del extracto la Profase (P) fue la más frecuente, con el mismo comportamiento del control negativo. Contrariamente, para las concentraciones superiores, la división no se llevo a cabo, lo que indica que los componentes químicos del EAC de *B. articulata* inhiben la progresión normal del ciclo celular bloqueando el inicio de la Metafase.

La distribución en las fases a concentraciones superiores a 0,6 mg/ml de extracto, la Telofase (T) resultó superior a Metafase (M) y Anafase (A), comportándose más como el control positivo que como el negativo. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos para el pesticida Metolcarb, que aparte de generar cambios en los IF aumenta la frecuencia de células en P y disminuye principalmente la M y A, en células meristematica de *Allium cepa*, [Liman y col., 2010]. Estudios realizados con el extracto acuoso de *Uncaria tomentosa* indicaron la inhibición del IM como así también cambios en la distribución de fases de la mitosis, con aumento de la frecuencia de células en P, [Kuras y col., 2006].

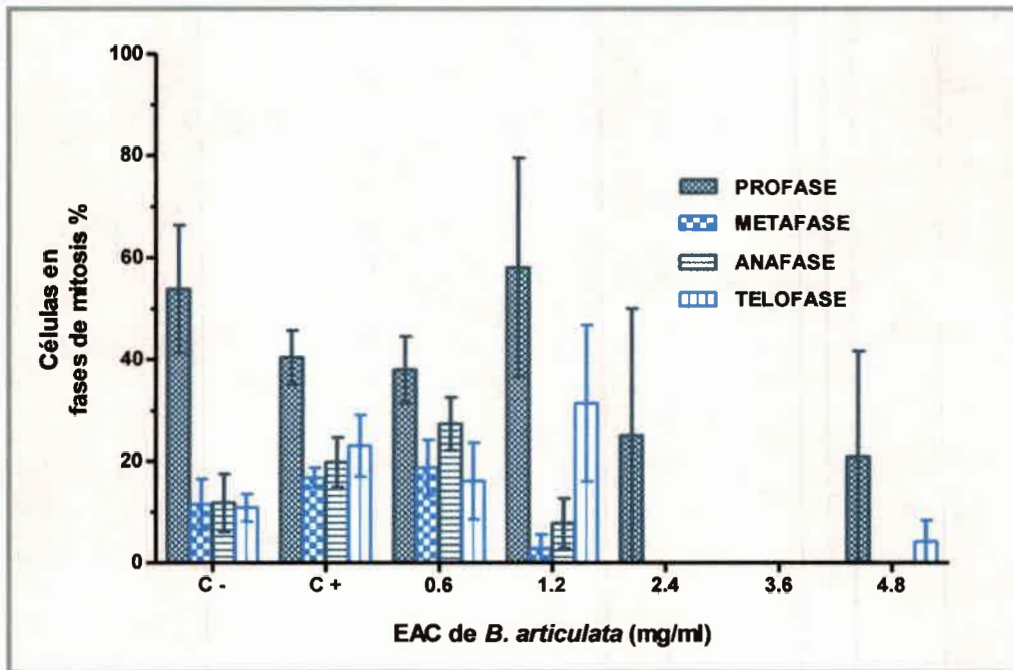


Figura 25: Valores porcentuales de índice de fases de células en división tratadas con el EAC de *B. articulata* por 48 h (IM1), respecto del control negativo, determinados por test de *Allium* cepa L.

Respecto del análisis de los datos de la **Tabla 31** en relación a los IM2 (tratamiento sostenido durante 5 días) se verificó nuevamente la relación dosis-respuesta, reafirmando el carácter tóxico del EAC ya que para todas las concentraciones del mismo, excepto para 0,6 mg/ml, no pudo registrarse ningún valor de división celular cuando los bulbos fueron expuestos a la droga por tiempos más prolongados.

Las células de los bulbos de *Allium* tratados durante 5 días con el EAC mostraron valores de distribución de fases que se muestran en la **Figura 26**. Como puede observarse, la distribución en fases de la mitosis en tales resultaron similares al control negativo en cuanto a la frecuencia en P y acentuando el efecto reflejado en el tratamiento por 48 h, hasta anular las fases M y A a 1,2 mg/ml. Este efecto antimitótico se refleja más aun a 2,4 mg/ml.

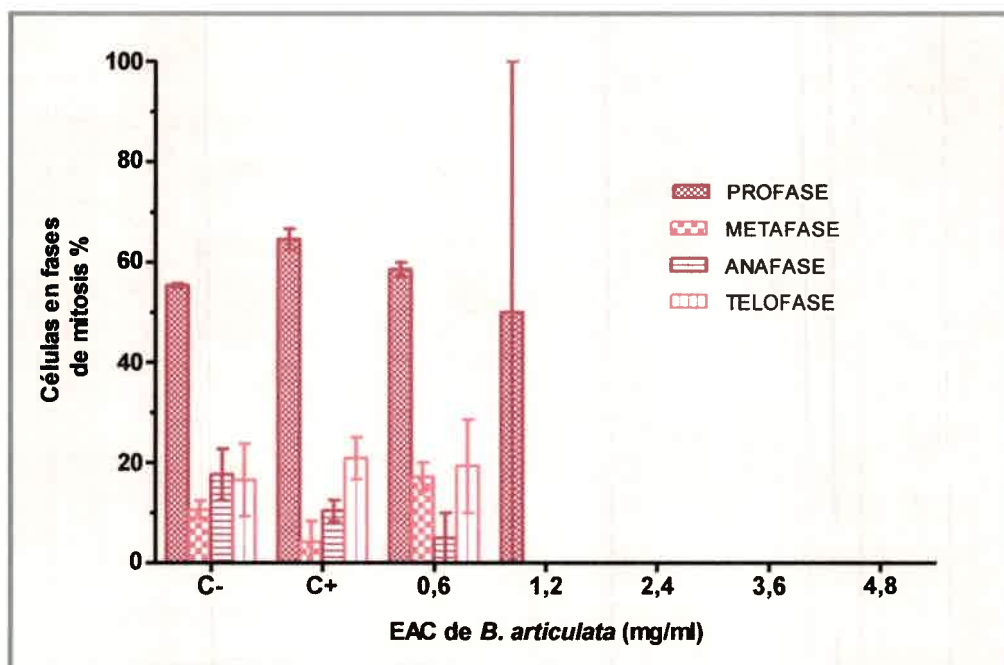


Figura 26: Valores porcentuales de índice de fases de células en división tratadas con el EAC de *B. articulata* por 5 días (IM2), respecto del control negativo, determinados por test de *Allium cepa* L.

Finalmente, los datos que representan el resultado del tratamiento de los bulbos con el EAC por 2 días y luego durante 3 días solo con agua mineral, fueron vertidos en la **Tabla 32**. El análisis de los mismos indica efectivamente que aquella alteración en el ciclo de división celular ejercida por la fracción vegetal en estudio fue totalmente revertida en las concentraciones 0,6, 1,2 y 2,4 mg/ml, recuperándose los valores de IF normales en las dos primeras concentraciones. Sin embargo, para las concentraciones 3,6 y 4,8 mg/ml el efecto tóxico del extracto fue irreversible. Las células que revirtieron lo hicieron de manera muy marcada, tanto que para aquellas tratadas con 0,6 mg/ml del EAC el IM fue superior incluso al determinado para el sistema control negativo. La distribución de las células en las distintas fases de la mitosis para este ensayo de reversión se muestra en la **Figura 27**.

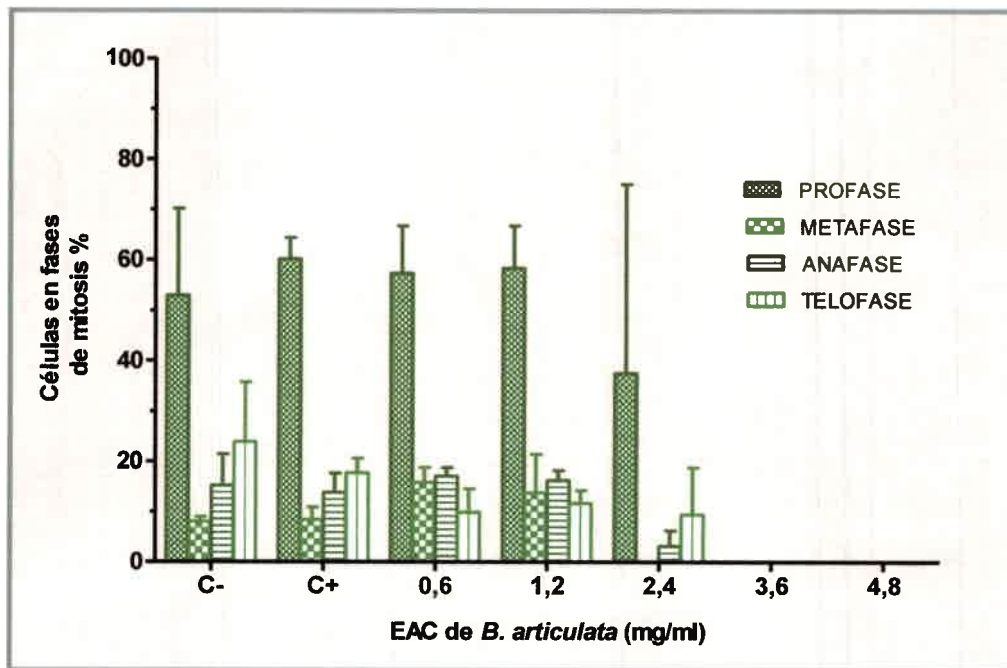


Figura 27: Valores porcentuales de índice de fases de células en división tratadas con el EAC de *B. articulata* por 2 días y luego por reversión (IM3), respecto del control negativo, determinados por test de *Allium cepa* L.

Como se observa, para las concentraciones de EAC menores a 3,6 mg/ml la fase predominante fue la P, al igual que en los ensayos anteriores. El índice de esta fase en la mayoría de los casos fue superior al 50 %. La recuperación de los IF demuestra que el efecto citotóxico ejercido por el EAC es reversible, evidenciándose más aun a la concentración de 2,4 mg/ml.

Estudios realizados con infusiones de *Psidium guajava* y *Achillea millefolium* mostraron poseer acción antimitótica reversible, donde el mayor IF se encontró en la P, indicando su característica más citostático que citotóxico, al igual que los resultados alcanzados en este trabajo de tesis, [Oliveira Teixeira y col., 2003].

Otras investigaciones, como las realizadas con decocciones de *Ilex paraguariensis* (yerba mate), demostraron también la inhibición del IM cuando se evaluó la acción genotóxica por test de *Allium cepa* y en donde la distribución de células en mitosis se alteró y se presentó c-mitosis, con cromosomas pegajosos en M, A detenidas y células binucleadas en interfase, a diferencia de este trabajo, [Bidau y col., 2004].

Todas las experiencias revelaron que la evaluación de los IF para el tratamiento con EAC pudo determinarse sólo para las concentraciones inferiores a 3,6 mg/ml donde el proceso mitótico se llevo a cabo. Las muestras analizadas para los tratamientos con 3,6 y



4,8 mg/ml del EAC mostraron destrucción celular generalizada, que se correspondió a raíces necrotizadas, donde no se pudo realizar recuento celular o se evidenciaron un número de células en interfase inferior a 500, por lo que se desestimaron.

Los valores porcentuales de índice mitótico obtenidos para el EAC de *B. articulata* en los distintos tratamientos, respecto del control negativo, se muestran en la **Figura 28**.

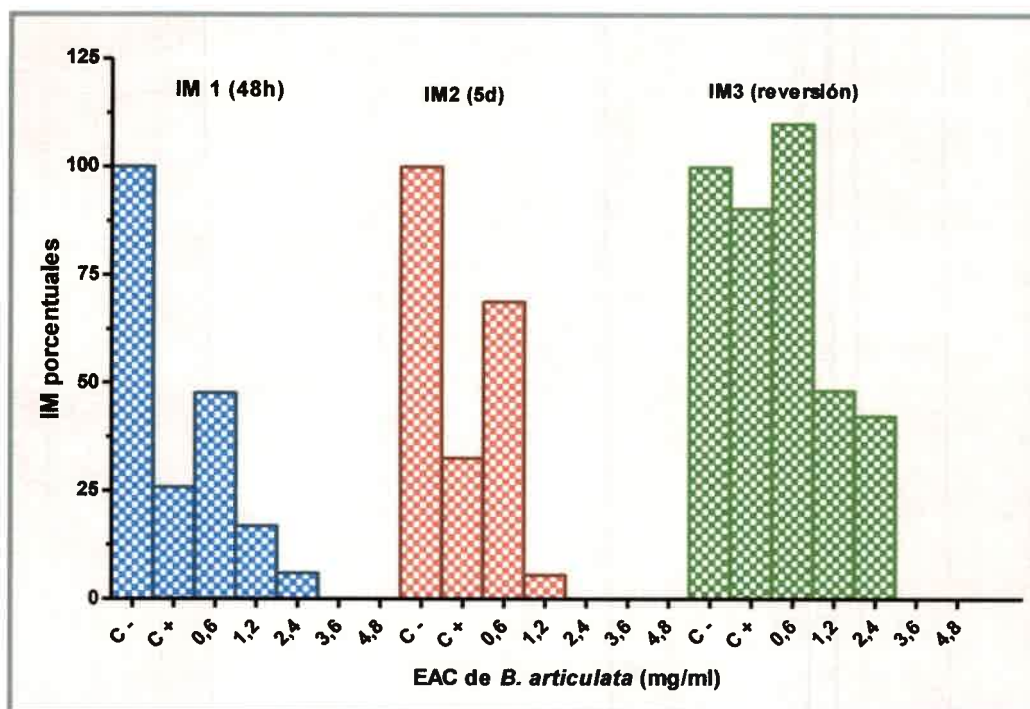


Figura 28: Valores de Índice Mitótico porcentuales respecto del control negativo obtenido para el EAC de *B. articulata* en distintos tratamientos por test de *Allium cepa* L.

Claramente se observa que hubo diferencias significativas entre los valores de IM1 e IM3 reafirmando la capacidad de las células de recuperarse del efecto tóxico del EAC.

Los resultados alcanzados en esta parte de las experiencias se condicen con los obtenidos en el análisis macroscópico, donde se observó que las raíces tratadas durante 5 días tenían en promedio menor longitud de aquellas tratadas por 2 días y luego sometidas a agua mineral.



Todos los resultados alcanzados son relevantes porque no habría posibilidad de producir el daño irreversible en células eucariota si se aplicara el extracto en una terapia como fitoterápico por dos días.

Luego de cuantificar la capacidad de división de las células en presencia del extracto es necesario evaluar además las anormalidades microscópicas en cada fase del ciclo celular, su frecuencia y las características de dichas anormalidades.

Tal como se muestra en las Tablas 30, 31 y 32, no se pudo determinar que existiera para ningún tratamiento, células que transitando por las distintas etapas de la mitosis, evidenciaran daño alguno por lo que la frecuencia de alteraciones por fases tampoco se pudo determinar. En cambio, todas las anormalidades registradas correspondieron a células en el estadio de interfase. Ha sido posible demostrar la presencia de células con aspecto morfológico alterado, como si estuvieran destruidas, **Figura 29**.

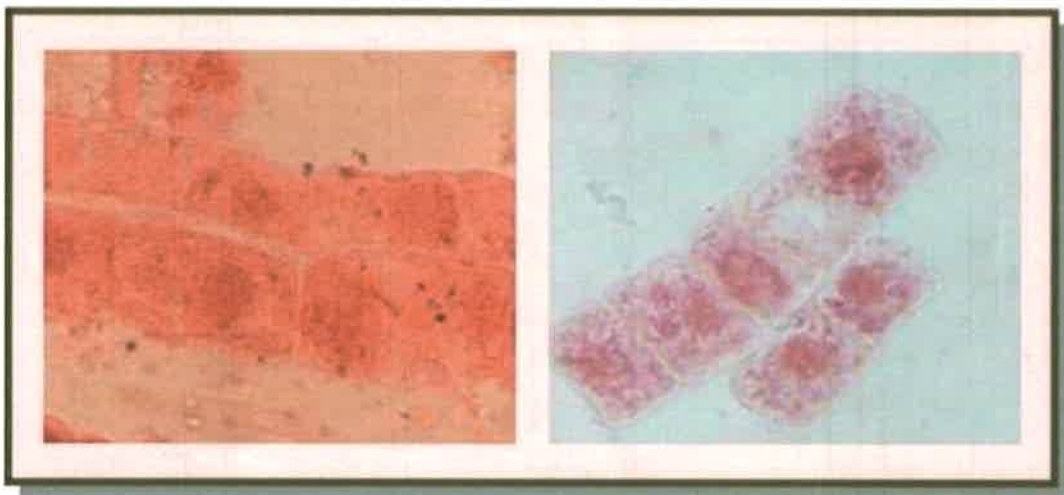


Figura 29: Células meristemáticas de raíces de *Allium cepa* L., destruidas a consecuencia de la exposición a concentraciones superiores de 1,2 mg/ml de EAC de *B. articulata*.

La frecuencia de aparición de este tipo de anomalía fue mucho más elevada en los tratamientos con 2,4; 3,6 y 4,8 mg/ml de EAC. Tan importante fue esta anomalía que un tratamiento sostenido con el extracto durante 5 días impidió que se llevara a cabo un recuento de más de 1000 células. En la **Tabla 32** se observa que, para aquellas altas concentraciones, el registro de células con morfología normal estuvo en el rango promedio de 270-875.



Pudo demostrarse una aberración de tipo clastogénica con alta frecuencia, para el tratamiento con 4,8 mg/ml de EAC, denominado micronúcleos (MN). La exposición durante 48 h a esta concentración de extracto indujo la aparición de 270 MN sobre un total de 1248 células computadas, lo que arroja una frecuencia del 22 %. La presencia de MN es consecuencia de un daño estructural en los cromosomas luego del ciclo de división celular con aspectos compatibles a los exhibidos en la, **Figura 30**.

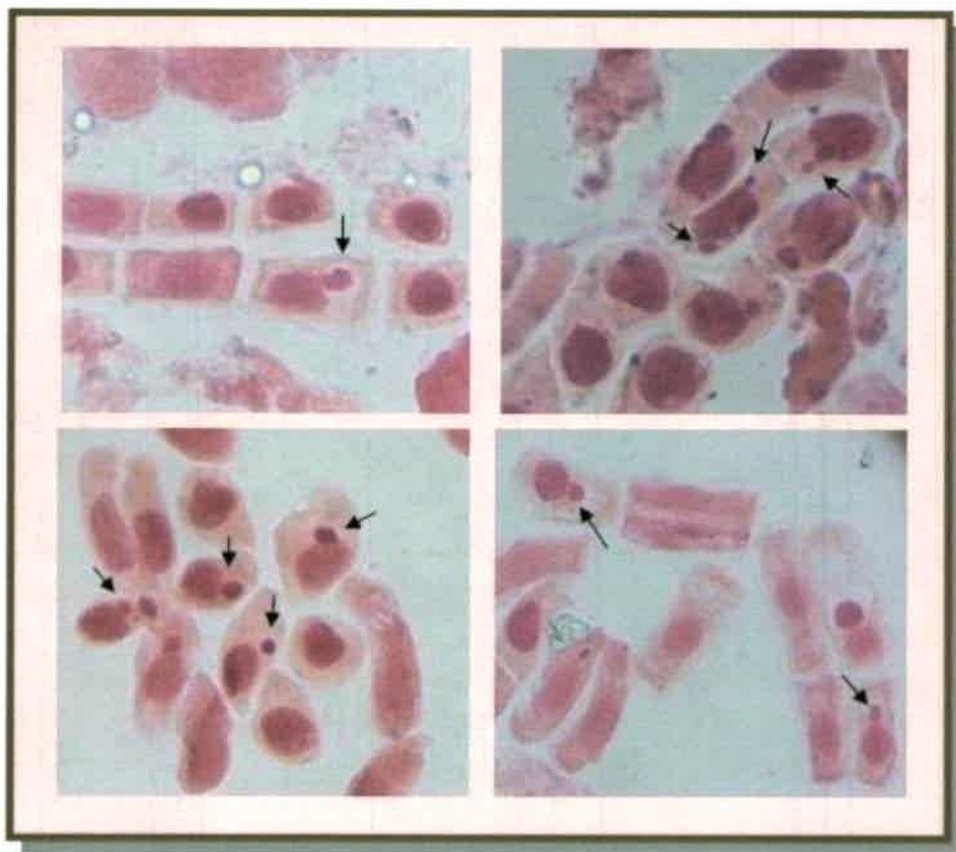


Figura 30: Micronúcleo en Interfase de células meristemáticas de raíces de *Allium cepa* L. expuestas a concentraciones superiores a 1,2 mg/ml de EAC de *B. articulata*.

Para la concentración de 4,8 mg/ml de EAC se había indicado ausencia de células en las etapas de la mitosis, no obstante se asume que algunas células debieron entrar en división para generar estas anomalías registradas. El porcentaje indicado claramente revela un gran poder clastogénico del extracto a esa concentración.

Posiblemente el EAC provoca la inducción de especies reactivas del oxígeno y lleve a daños en las base puricas y pirimidínicas, aumentando la probabilidad de la



fragmentación de los cromosomas y lleve así a la formación de MN; o bien se formen puentes disulfuros en las proteínas que llevan a cabo la reparación del ADN y aumente la frecuencia de MN.

Numerosos estudios se han realizado para evaluar el potencial genotóxico de productos naturales. Así, *Fachinetto y Tedesco (2009)* en la evaluación de diferentes decocciones de *B. articulata* y *B. timera* informaron su característica antimitótica y mutagénica a 15 mg/ml por el test de *Allium cepa* L. Los autores indicaron dentro de las aberraciones celulares generadas por estas decocciones, la presencia de células binucleadas, puentes cromosómicos en anafase y telofase y en menor proporción, micronúcleos. En nuestros ensayos sólo se demostró la presencia de MN, resultados similares fueron demostrados por *Yi y col. (2004)* al efectuar estudios de evaluación de genotoxicidad con arsénico. También fueron concordantes con los resultados presentados por *Chauhan y col. (1999)*, cuando publicaron que insecticidas piretroides (Cipermetrina y Fenvalerato) disminuyeron el IM, generaron células micronucleadas, alteraciones en la distribución de cromosomas y provocaron rupturas cromosómicas que indican su potencial clastogénico.

La presencia de MN puede deberse a un efecto aneugénico que ejerce el EAC de *B. articulata* a las altas concentraciones ensayadas, sobre las células meristemáticas de *Allium cepa*. Cuando los procesos de reparación en el material genético ocurren con el fin de mantener la ploidía se generan estos cuerpos que contienen cromosomas o cromatina, es decir micronúcleos. Cuando ocurre fragmentación en los cromosomas, los MN son de pequeño tamaño mostrando un efecto clastogénico como es la ejercida por el extracto acuoso aquí ensayado, [*Fiskesjö, 1985, Chauhan y col., 1999; y Leme y Marín Morales, 2009*]. Los MN pueden también generarse de fragmentos de cromosomas acéntricos o cromosomas rezagados que no logran ingresar en las células hijas durante la telofase, varios estudios realizados con extractos vegetales demuestran su acción sobre la inducción de MN, [*Tülay y Özlem, 2010*].

El poder clastogénico demostrado para EAC de *B. articulata* mostró una relación dosis-respuesta, puesto que la frecuencia de aparición de MN a la concentración de 3,6 mg/ml fue del 4 % y para 2,4 mg/ml fue del 3,5 %.

Por otra parte, el daño inducido por el tratamiento con 4,8 mg/ml, no sería estable ya que en el ensayo de reversión logró disminuirse significativamente el porcentaje de MN del 22 al 3 %, lo cual resulta un dato alentador.



En ninguno de los tratamientos con las concentraciones más bajas del EAC pudo demostrarse alteración alguna a pesar de que las células transcurrieron todas las etapas de la mitosis; igual comportamiento tuvo el sistema control negativo. En contraposición en las células tratadas con Paracetamol se evidenciaron daños tales como alteraciones cromosómicas durante la A que consistió en fragmentación cromosómica, **Figura 31**.



Figura 31: Anafase con fragmentación cromosómica inducida por el tratamiento con 0,3 mg/ml de Paracetamol. FC: fragmento de cromosoma.

Las alteraciones descritas, registradas en el sistema con Paracetamol validaron todos los resultados encontrados en este estudio.

5.7. Caracterización fitoquímica parcial de compuestos presentes en el extracto acuoso caliente de *B. articulata*

5.7.1. Ensayos preliminares de caracterización fitoquímica: técnicas cromatográficas y espectroscópicas

Con el objetivo de identificar los componentes químicos presentes en el EAC de *B. articulata* aquí estudiado se contó con el asesoramiento de miembros de la cátedra de Farmacognosia de la UNC. Se logró a través de técnicas cromatográficas en papel y en capa delgada una primera aproximación de esta caracterización.



En el caso de los flavonoides, se pudo estimar la presencia de flavonas por el desarrollo del color amarillo mediante el empleo del reactivo de Shinoda, [Geissman, 1962]. Por CP, tres compuestos (manchas) fueron identificadas en el EAC como quercetina, luteolina y acacetina, ya que su coloración y valores de R_F fueron coincidentes con las sustancias de referencia en los tres sistemas de solventes analizados (BAW, TBA y ácido acético al 15 %). La CP preparativa sobre el EAC desarrollada en TBA mostró tres manchas (A con $R_F = 0,60$, B con $R_F = 0,75$ y C con $R_F = 0,90$), las cuales fueron eluidas con MeOH y caracterizadas por espectrofotometría UV-visible. Así, los datos espectrales del compuesto A fueron similares a quercetina (λ_{max} nm: 251, 272sh, 305sh, 365), los del compuesto B fueron similares a luteolina (λ_{max} nm: 238sh, 251, 266, 288sh, 352), y los datos espectrales del compuesto C fueron similares a acacetina (λ_{max} nm: 268, 306sh, 328), en concordancia con Mabry y col., (1970).

Mediante las técnicas de CP y CCD, se pudo determinar la presencia de ácido clorogénico en el EAC por comparación de su color y valor de $R_F = 0,46$ con la sustancia de referencia. Los datos espectrales de los componentes separados y analizados por espectrofotometría UV-visible obtenidos fueron de $\lambda = 245, 260, 300sh, 328$, que resultaron coincidente con los del ácido clorogénico, [Martino y col., 1989].

La extracción con solventes no polares para aislar compuestos químicos derivados terpenoides del EAC de *B. articulata* resultó negativo, no se evidenció la presencia de terpenos (Santonina y Bacchotricuneatina A) mediante el empleo de CCD y en las tres fases móviles probadas.

A través de la reacción con sales férricas, por el desarrollo de coloración pardo-verdosa se reveló la presencia de taninos en el EAC de *B. articulata*.

5.7.2. Identificación y cuantificación por HPLC

En la **Figura 32** se muestra el perfil cromatográfico por HPLC del EAC de *B. articulata* que resultó de la comparación con los compuestos testigos; mediante el análisis de este cromatograma se pudieron detectar los siguientes compuestos: quercetina, luteolina, acacetina y ácido clorogénico. La determinación cuantitativa de cada uno de ellos indicó el siguiente orden decreciente: quercetina, acacetina, ácido clorogénico y luteolina, y la relación entre ellos se exhibe en la **Tabla 33**.

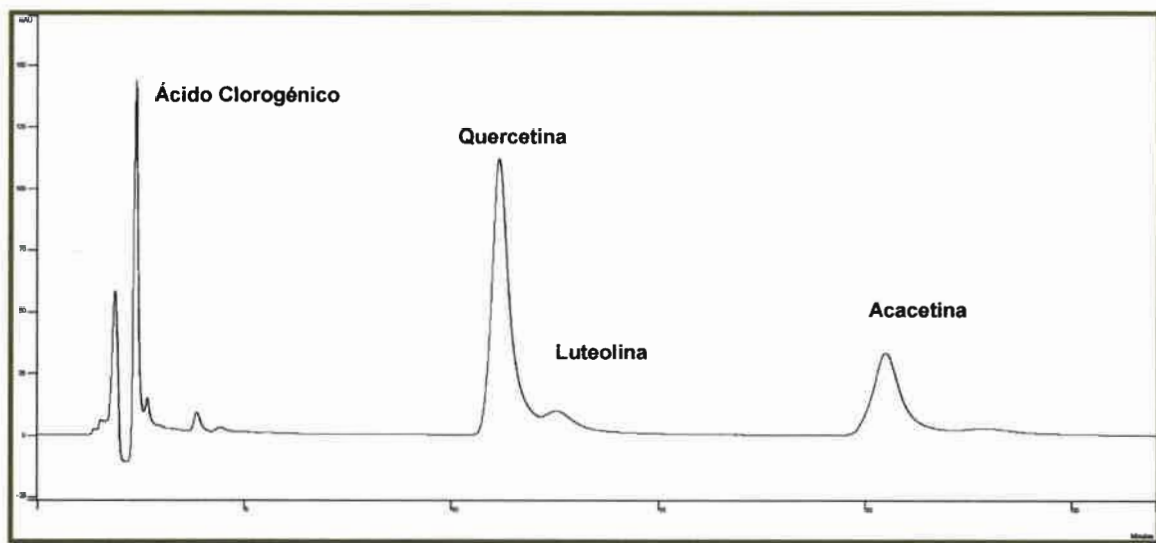


Figura 32: Cromatograma del EAC de *Baccharis articulata* comparado con compuestos testigos.

Tabla 33: Proporción peso en peso de cada componente identificado en el EAC de *B. articulata*.

Componente del EAC	% P/P (\pm SD)
Acido clorogénico	0,26 (\pm 0,04)
Quercetina	1,33 (\pm 0,17)
Luteolina	0,055 (\pm 0,004)
Acacetina	0,99 (\pm 0,09)

Estos compuestos identificados en el EAC de *B. articulata* podrían ser los responsables de la actividad antiviral, particularmente en la etapa de adsorción y penetración viral, como así también los responsables de la baja toxicidad determinada en células Vero y linfocitos humanos y de la escasa genotoxicidad en raíces de *Allium cepa* L. Dichos compuestos podrían estar actuando de manera individual, o de forma conjunta ejerciendo sinergismo o eventualmente antagonismo en tales bioactividades. Se tornaría entonces interesante conocer el potencial bioactivo de cada uno de estos componentes empleados en forma de compuestos puros únicos o combinados a fin de caracterizar aun más este extracto acuoso caliente.

Conclusiones



6. CONCLUSIONES

- En el marco de esta Tesis se investigaron cinco extractos de la especie *Baccharis articulata*, conocida vulgarmente como carqueja, perteneciente a la familia Asteraceae la que fue seleccionada sobre la base de sus antecedentes en la medicina tradicional y en la industria alimenticia y su abundancia relativa como fuente de posibles moléculas con efecto antiviral contra el virus *Herpes suis tipo 1*.
- Los extractos polares obtenidos con agua en frío (EAF) y en caliente (EAC) de *B. articulata*, ejercieron acción virucida y antiviral frente al virus *Herpes suis* tipo 1 *in vitro* a concentraciones no citotóxicas.
- El EAF ejerció acción antiviral en distintas etapas de la multiplicación sin embargo, esta acción no superó el 50% y requiere de concentraciones elevadas del extracto limitando su aplicabilidad.
- La acción antiviral del EAC fue exclusivamente sobre la adsorción del virus a la célula con alta selectividad de acción. No afectó las etapas de biosíntesis molecular para generar nuevas partículas virales.
- El EAC no ejerció efecto citotóxico ni genotóxico en los ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados, a las concentraciones activas frente al virus.
- De la caracterización fitoquímica del EAC de *B. articulata* por técnicas cromatográficas y por HPLC, pudieron identificarse y cuantificarse cuatro componentes mayoritarios: quercetina, acetina, ácido clorogénico y luteolina.
- Las moléculas químicas identificadas en el EAC de *B. articulata* podrían ser las responsables de la actividad antiviral y actuarían en forma individual y/o combinadas.

Bibliografía



7. BIBLIOGRAFIA

- ✚ Abad, M; Bessa, A; Bermejo, B. 2005. Biologically active substances from the genus *Baccharis* L. (Compositae). *Studies in Natural Products Chemistry*. **30**, 703-759.
- ✚ Abad, M; Bermejo, P. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*. **7**, 76-96.
- ✚ Abad, M; Bermejo, P; Gonzáles, E; Iglesias, I; Irurzun, A; Carrasco, L. 1999. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology*. **32** (4): 499-503.
- ✚ Abdel Malek, S; Bastien, J; Mahler, W; Jia, Q; Reinecke, M; Robinson, J; Shu, Y; Zalles Asin, J. 1996. Drugs lead from the Kallawaya Herbalists of Bolivia. Background, Rationale, Protocol and Anti HIV activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **50** (3):157-166.
- ✚ Adzu, B; Amos, S; Dzarma, S; Wambebe, C; Gamaniel, K. 2002. Effect of *Zizyphus spina-christi* Willd aqueous extract on the central nervous system in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **79**: 13–16.
- ✚ Akinboro, A; Bakare, A. 2007. Citotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*. **112** (3): 470-475.
- ✚ Alcaraz, L; Favier, L; Cianchino, V; Tonn, C; Laciari, A. 2012. Investigation of Argentinean
- ✚ Alonso, J. 2002. Plantas Medicinales Empleadas por los Indígenas del NOA (Noroeste Argentino). Sitio en internet: www.plantasmedicinales.org.
- ✚ Alonso, J; Desmarchelier, C. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Ediciones Fitociencia. 2006.
- ✚ Ambrogi, A; Giraud, J; Busso, J; Bianco, O; Bagnat, E; Segura de Aramburu, M; Ramos, B; Ceriatti, F. 1981. Primer diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky en cerdos en la República Argentina. *Gaceta Veterinaria*. Buenos Aires. Tomo XLIII (357): 58-64.
- ✚ Amirghofran, Z; Bahmani, M; Azadmehr, A; Javidnia, K. 2007. Immunomodulatory and apoptotic effects of *Stachys obtusifolia* on proliferative lymphocytes. *Medical Science Monitor*. **13** (6): 145-150.
- ✚ 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. *Revista Argentina de Microbiología*. **17**: 187-194.
- ✚ Andrés, S; Higuera, M; Mozaz, T. 2008. Efectos adversos oculares asociados a medicamentos y productos oftálmicos. Colegio oficial de farmacéuticos de Zaragoza. <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento24.pdf>.
- ✚ Andrioli, N; Wulff, A; Mudry, M. 2006. *Allium cepa* as biomonitor of metronidazole toxicity and genotoxicity. *Theoria*. **15** (2): 9- 16.
- ✚ Ariza Espinar, L. 1973. Las especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias*. **50**:1-4, 177-305.
- ✚ Barboza, G; Cantero, J; Nuñez, C; Espinar, L. 2006. Flora medicinal de la provincia de Córdoba (Argentina). 1ª Ed. UNC y UNRC. Pág.: 326.



- ✦ Barboza, G; Cantero, J; Nuñez, C; Pacciaroni, A; Ariza Espinar, L. 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine flora. *Kurtziana*. **34** (1-2): 7-365.
- ✦ Barretó Penié, J; Gonzalez Piñera, J; Rodríguez Rodríguez, M; Pino Alfonso, P. 1998. Medicamentos Antivirales. *Acta Médica*. **8**(1): 86-100.
- ✦ Betancur Galvis, L; Saez, J; Granados, H; Salazar, A; Ossa, J. 1999. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Río de Janeiro. **94** (4): 531-535.
- ✦ Bhattacharya, S; Haldar, P. 2010. Evaluation of in vitro cytotoxic effect of *Trichosanthes dioica* root. *Pharmacognosy Research*. **2** (6): 355-358.
- ✦ Bidau, C; Amat, A; Yajia, M; Marti, D; Riglos, A; Silvestroni, A. 2004. Evaluation of the genotoxicity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (*Aquifoliaceae*) using the *Allium* test. *Cytologia*. **69** (2):109–117.
- ✦ Boadella, M; Vicente, J; Ruiz-Fons, F; de la Fuente, J; Gortázar, C. 2012. Effects of culling Eurasian wild board on the prevalence of *Mycobacterium bovis* and Aujeszky's disease virus. *Preventive Veterinary Medicine*. **107** (3-4): 214-221.
- ✦ Borenfreund, G.; Puernen, A. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alteration and RN absorption. *Toxicol Letters*. **24**:119-124.
- ✦ Briskin, D. 2000. Medicinal plants and Phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*. **124** (2): 507-514.
- ✦ Bröker L; Kruyt F; Giaccone G. 2005. Cell Death Independent of Caspases: A review. *Clinical Cancer Research*. **11**: 3155-3162.
- ✦ Búfalo, M; Candeias, J; de Sousa, J; Bastos, J; Sforcin, J. 2010. In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEp-2 cells. *Natural Product Research*. **24** (18): 1710-1718.
- ✦ Búfalo, M; Figueiredo, A; de Sousa, J; Candeias, J; Bastos, J; Sforcin, J. 2009. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. **107** (5): 1669-1680.
- ✦ Bunyapraphatsara, N; Dechsree, S; Yoosook, C; Herunsalee, A; Panpisutchai, Y. 2000. Anti-herpes simplex virus component isolated from *Maclura cochinchinensis*. *Phytomedicine*. **6** (6): 421-424.
- ✦ Bushra Ateeq; Abul Farah, M; Niamat Ali, M; Waseem Ahmad. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test, 2002. *Mutation Research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*. **514** (1-2): 105-113.
- ✦ Cabrera G, Rodriguez D, 1999. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutation Research*. **426**: 211–214.



- ✦ Calixto J. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **33**: 179- 189.
- ✦ Calvin, M; Ferraro, G; Coussio, J; Martino, V; Garcia, G; Campos, R. 2000. Actividad antiherpética "in vitro" en extractos de 5 especies de *Eupatorium*. Anales de SAIPA. Sociedad Argentina para la investigación de productos aromáticos. IX Congreso Nacional de recursos naturales aromáticos y medicinales. XVI 131-134.
- ✦ Cañigual, S; Dellacassa, E; Bandoni, A. 2003. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. *Latin American Journal of Pharmacy*. **22** (3): 265-278.
- ✦ Cañigual, S; Vila, R. 1998. Fitoterapia: conceptos y límites. Fuentes de información. Pág: 23-30. En: Fitoterapia: Vademecum de prescripción. 3º ed. Editorial Masson. Barcelona.
- ✦ Cañigual, S; Vila, R. 2001. Principios de la Fitoterapia. Vol 1, Pág: 173-193. En: Plantas medicinales y Fitoterapia. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid.
- ✦ Carballal, G; Oubiña, J. 1998. Diagnóstico virológico, cap.7. Pág: 119-140. En Virología Médica. 2º ed. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.
- ✦ Cariddi L; Escobar F; Sabini C; Torres C; Reinoso E; Cristofolini A; Comini L; Nuñez Montoya S; Sabini L. 2012. Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. *Food Chemical Toxicology*. **50**: 155–161.
- ✦ Cella, M; Riva, D; Coulombie, F; Mersich, S. E. 2004. Virucidal activity presence in *Trichilia glabra* leaves. *Revista Argentina de Microbiología*. **36**: 136-138.
- ✦ Ceriatti, S; Sabini, L; Bettera, S; Zanon, S; Ramos, B. 1992. Experimental infection of pregnant gilts with Aujeszky's disease virus strain RC/79. *Revista Argentina de Microbiología*. **24** (2): 102 – 112.
- ✦ Chang-Qing, G; Jun-Wen, L; Fuhuan, C; Min, J; Xin-Wei, W; Zhi-Qiang, S. 2007. Isolation, identification and function of a novel anti HSV-1 protein from *Grifola frondosa*. *Antiviral Research*. **75** (3): 150-157.
- ✦ Chattopadhyay D; Naik T. 2007. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. **7**: 275-301.
- ✦ Chauhan, L; Saxena, P; Gupta, S. 1999. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environmental and Experimental Botany*. **42** (3): 181-189.
- ✦ Coelho, M; Reis, P; Gava, V; Marques, P; Gayer, C; Laranja, G; Felzenswalb, I; Sabino, K. 2004. Anti-arthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. *Toxicology letters*. **154**: 69-80.



- ✦ Córdoba, M; Coto, C; Damonte, E. 1991. Virucidal Activity in Aqueous Extracts obtained from *Cedrela tubiflora* leaves. *Phytotherapy Research*. 5: 250-253.
- ✦ Cortez Gallardo, V; Macedo Ceja, J; Hernández Arroyo, M; Arteaga Aureoles, G; Espinosa Galván, D; Rodríguez Landa, J. 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias medicas. Historia de la Medicina. *Revista Biomédica*. 15 (2): 123-136.
- ✦ Cotellet, S; Masfaraud, J; Ferard, J. 1999. Assesment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* micronucleous and the *Tradescantia*. *Mutation Research*. 426: 167-171.
- ✦ Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4): 564-582
- ✦ Crumpacker, C. 2001. Antiviral Therapy. Pág: 3280-3300. In: Fields Virology. 4th ed. Edited by L.W.W.
- ✦ De Clercq, E. 1993. Antivirals for the treatment of herpesvirus infections *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 32:121-132.
- ✦ De Cristófano, M; Livellara, B; De Torres, R. 1996. Herpes Virus. Cap. 72: 655-690. En Microbiología Biomédica. Basualdo, J. A.; Coto, C. E. y De Torres, R. Ed. Atlante, Buenos Aires, Argentina.
- ✦ De Loug, A; Loy, G; Pellerano, M; Bonsignore, L; Schivo, M. 2000. Inactivation of VHS-1 and VHS-2 and prevention of cell-to-cell spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral Research*. 48: 177-185.
- ✦ De Oliveira S; Dal-Pizzol, F; Gosmann, G; Guillaume, D; Moreira, J; Schenkel, E. 2003. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. *Free Radical Research*. 37 (5): 555-559.
- ✦ De Torres, R; García, G; Mbayed, V. 1998. Antivirales. Cap. 26: 475-485. En Virología Médica. Carballal, G. y Oubiña, J. 3º ed. Ed. El Ateneo. Buenos Aires. Argentina.
- ✦ del Barrio, G; Parra, F. 2000. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 72(1-2): 317-322.
- ✦ Debenedetti, S; Miño, J; Rojo, A; Acevedo, C. 2000. Ensayo del efecto diurético de los extractos acuosos de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gill. Ex Hicken, *Bauhinia candicans* Benth. y *Smilax campestris* Griseb. *Acta Farmacológica Bonaerense*. 19 (1): 17-20.
- ✦ Di Stasi, L; Oliveira, G; Carvalhaes, M. 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73: 69-91.
- ✦ Díaz García G. Evaluación del Efecto genotóxico del *Xhantium Strumarium* L. (Guisazo de caballo). 2002. Tesis de Magíster www.ilustrados.com.
- ✦ Domínguez Suarez, A; Acosta Ulloa, L; Cuello, D. 2001. Efecto cicatrizante de extracto fluido de hojas de siempreviva. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 1: 16-18.



- ✦ Dulbecco, R. 1962. Production of plaques in monolayer tissue culture by single particles of an animal virus. *Proceeding National Academic Science*. USA 38: 747-752.
- ✦ Dyer A. 1963. The use of lacto-propionic orcein in rapid squash method for chromosome preparation. *Stain Technology*. 38: 85-90.
- ✦ Echavarría, M; Franco, A; Martínez, M. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae, Revista de la Facultad de química farmacéutica*. **16** (1): 126-131.
- ✦ Echeverría, M; Nosetto, E. 2000. Actualización en enfermedad de Aujeszky. *Analecta Veterinaria*. **20** (2): 22-30.
- ✦ Edris, A; Shalaby, A; Fadel, H; Abdel-Wahab, M. 2003. Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata* L.) grown in Siwa Oasis, Egypt. *European Food Research Technology*. 218: 74-78.
- ✦ El Garbulli, F; Bashasha, J. Hazard of Paracetamol Addiction on Cell Division Garyounis, 2008. *University Press Journal of Science and Its Applications*. **2** (1): 6.
- ✦ Englund, J; Zimmerman, M; Swierkosz, E; Goodman, J; Scholl, D; Balfour, H. 1990. *Herpes simplex* virus resistant to acyclovir. *Annals of Internal Medicine*. 112: 416-422.
- ✦ Erlich, K; Mills, J; Chatis, P; Mertz, G; Busch, D; Follansbee, S; Grant, R; Crumpacker, C. 1989. Acyclovir- resistant *Herpes Simplex* virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine*. 320: 293-296.
- ✦ Evandri, M; Tucci, P; Bolle, P. 2000. Toxicological evaluation of commercial mineral water bottled in polyethylene terephthalate: a cytogenetic approach with *Allium cepa*. *Food Additives and Contaminants*. **17** (12): 1037- 1045.
- ✦ Fachinetto, J; Tedesco, S. 2009. Atividade antiproliferativa e mutagenica dos extractos aquosos de *Baccharis trímpera* (Less.) A.P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de plantas medicinais Botucatu*. **1**(4): 360-367.
- ✦ Fachinetto, J; Bagatini, M; Durgon, J; da Silva, A; Tedesco S. 2007. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **17**(1): 49-54.
- ✦ Fatahzadeh, M; Schwartz, R. 2007. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Journal of the American academy of dermatology*. **57** (5): 737-763.
- ✦ Feresin, E; Tapia, A; Giménez, A; Gutiérrez Ravelo, A; Zacchino, S; Sortino, M; Schmeda-Hirschmann, G. 2003. Constituents of Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **89** (1): 73-80.



- ✦ Field, H; Whitley, R; 2005. Antiviral chemotherapy. In: Mahy, B; Ter Meulen, V. (Eds.), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, vol. II, 10th Ed. Hodder & Arnold. 69: 1605-1645
- ✦ Fiskesjö G. 1994. *Allium* test II: Assessment of a chemical genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cells divisions in root tips of *Allium cepa*. *Environmental Toxicology and Water quality*. 9: 235- 241.
- ✦ Fiskesjö G. 1997. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. In: Plants for Environmental Studies. Wang, W; Gorsuch, J; Hughes, J. CRC, Lewis Publishers, New York, pp. 307-333.
- ✦ Fiskesjö, G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 102: 99-112.
- ✦ Fiskesjö, G. 1993. The *Allium* test wastewater monitoring. *Environmental toxicology and water quality*. 8 (3): 291-298.
- ✦ Fotakis, G; Timbrell, J. 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. 160: 171-177.
- ✦ Freire, S; Urtubey, E; Giuliano, D. 2007. Epidermal characters of *Baccharis* (Asteraceae) species used in tradicional medicine. *Caldasia*. 29 (1): 23-38.
- ✦ Freitas, C; Baggio, C; dos Santos, A; Mayer, B; Twardowschy, A; Luiz, A; Marcon, R; Soldi, C; Pizzolatti, M; Pereyra dos Santos, E; Andrade Marques, M; Santos, A. 2009. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract, fractions and compounds obtained from the aerial parts of *Baccharis illinita* DC in mice. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 104 (4): 285-292.
- ✦ Fukuma, M; Seto, Y; Yamase, T. 1991. In vitro antiviral activity of polyoxotunstate (PM-19) and other polyoxometalates against herpes simplex virus. *Antiviral research*. 16: 327-339.
- ✦ García, G. 1999. Estudio de la actividad antiviral de plantas medicinales argentinas. Tesis Doctoral. Facultad Farmacia y Bioquímica. Universidad Buenos Aires.
- ✦ García, G; Campos, R; De Torres, R; Broussalis, A; Ferraro, G; Martino, V; Coussio, J. 1990. Antiherpetic Activity of some Argentine Medicinal Plants. *Fitoterapia*. 61 (6): 541-546.
- ✦ García, S; Alonso, G; Gaitén, Y; Díaz, L. 2003. Evaluación preliminar de la actividad antiviral del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* frente al virus VHS-1. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 55 (3): 169-73.
- ✦ Geissman A. The chemistry of Flavonoid Compounds. Pergamon Press Inc. Oxford, London. 1962. In: K. Venkataraman. Methods for determining the structures of flavonoid compounds. 71- 106.



- ✦ Genhong, Y; Lingsong, Y; Yali, H; Jung, L; Junfeng, L; Yayi, H. 2006. Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis involved caspase-3 activation and mitochondrial depolarization. *Molecular Immunology*. 43: 915-926.
- ✦ Geran, R; Greenberg, N; Macdonald, M; Schumacher, A; Abbcott, B. 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumours and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports*. 3: 59-61.
- ✦ Gianello, J; Cenal, J; Giordano, O; Tonn, C; Petenatti, M; Petenatti, E; Del Vitto, L. 2000. Medicamentos Herbarios en el Centro-Oeste Argentino. 11. "Carquejas": Control de calidad de las drogas oficiales y sustituyentes. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 19 (2), 99-103.
- ✦ Gil, A; Van Baren, C; Di Leo Lira, P; Bandoni, A. 2007. Identification of the Genotype from the Content and Composition of the Essential Oil of Lemon Verbena (*Aloysia citriodora Palau*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 8664-8669.
- ✦ Giménez Arnau, A. 1994. Agentes antivirales. Conceptos actuales y prácticas aplicables a la dermatología. *Acta Derma*. 33: 309-325.
- ✦ Giuliano, D. 2001. Clasificación infragénica de las especies Argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana*. 39 (1-2): 131-154.
- ✦ Glasby, J. 1991. Dictionary of Plants Containing Secondary Metabolites. Edited by Taylor & Francis. CRC Press. London.
- ✦ Guzmán Cano, A. Estudio del potencial genotóxico del E-5842, un fármaco experimental antipsicótico con afinidad por el receptor sigma, y del mecanismo de inducción de eritrocitos micronucleados en ratón mediante hipotermia. 2008. Tesis Doctoral Universitat Autònoma de Barcelona.
- ✦ Hadad, M; Zygadlo, J; Lima, B; Derita, M; Feresin, G; Zacchino, S; Tapia, A. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Baccharis grisebachii* hieron (Asteraceae). *Journal of the Chilean Chemical Society*. 52: 1186-1189.
- ✦ Hammer, K; Carson, C; Riley, T. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86: 985-990.
- ✦ Harborne, J. Phytochemical methods, 2nd ed. Chapman and Hall, London. 1984.
- ✦ Harden, E; Falshaw, R; Carnachan, R; Kern, E; Prichard, M. 2009. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. *Antiviral Research*. 83: 282-289.
- ✦ Hayashi, K; Kamiya, M; Hayashi, T. 1995. Virucidal Effects of the Steam Distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, Influenza and HIV. *Planta Médica*. 61: 237-241.
- ✦ Hongslo, J; Bjorge, C; Schwarze, P; Brogger, A; Mann, G; Thelander, L; Holme, J. Paracetamol Inhibits Replicative DNA Synthesis and Induced Sister Chromatid Exchange



- and Chromosomal Aberration by Inhibition of Ribonucleotide Receducates, 1990. *Mutagenesis*. **5**(5): 475-480.
- ✚ Hsiung, G.; Fong, K. 1982. Adenoviridae. Part 3. Recognition and characterization of viruses by virus morphology and virus-induced cellular changes. DNA viruses. Chapter 19: 182-194. In: Diagnostic virology. 3rd ed. Yale University Press New Haven and London.
- ✚ <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c771.htm>.
- ✚ Hudson, J. 1990. Antiviral compounds from plants. CRC Press, Florida, pp 43-51.
- ✚ Humar, A; Kumar, D; Caliendo, A; Moussa, G; Ashi Sulaiman, A; Levy, G; Mazzulli, T. 2002. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation*. **73** (4): 599-604.
- ✚ Illán, H; Jacob, N; Maiolo, E; Cisterna, D; Santo Orihuela, P; Freire, M. 2002. Estudio de sensibilidad al aciclovir del Herpes simples en pacientes trasplantados. VI Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires. Libro de Resumen 34.
- ✚ Iracheta M. 2007. El suicidio y la muerte celular. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*. Universidad Complutense. **111** (2): 1-33.
- ✚ Jassim, S; Naji, M. 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*. **95** (3): 412-427.
- ✚ Jeung Won, H; Hee Han, Ch; Ho Kim, Y; Ju Kwon, H; Woo Kim, B; Soo Choi, J; Kima, K. 2006. Induction of apoptosis in human acute leukemia Jurkat T cells by *Albizia julibrissin* extract is mediated via mitochondria-dependent caspase-3 activation. *Journal of Ethnopharmacology*. **106**: 383-389.
- ✚ Johann S; Cisalpino P; Watanabe G; Cota B; de Siqueira E; Pizzolatti M; Zani C; de Resende M. 2010. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Pharmaceutical Biology*. **482**: 388-396.
- ✚ Juliani, R; Biurrun, F; Koroch, A; De Carli, A; Zygadlo, J. 2007. The production of native and aromatic plants in Argentina. Reprinted from: in new crops and new uses. J. Janick and A. Whipkey (eds.).ASHS Press, Alexandria, VA.
- ✚ Junior, W; Carvalho Cardoso, M; Vilegas, W; Vataru Nakamura, C; Prado Dias Filho, B; Palazzo de Mello, J. 2005. 2,3,4,6-Tetra-O-(3-nitropropanoyl)-O-β-D- glucopyranoside, a New Antimicrobial from the Roots of *Heteropteris aphrodisiaca*. *Acta Farmacológica Bonaerense*. **24** (4): 543-5.
- ✚ Kerr J; Wyllie A; Currie A. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Dermatology*. **26**: 239-57.
- ✚ Kim M; Kim N; Hong Kon T; Oh C; Shin Surh Y. 2005. Eupatilin, una flavona farmacológicamente activo derivado de las plantas de Artemisia, induce la apoptosis en el cáncer gástrico humano (AGS) de las células. *Journal Environmental Pathology Toxicology Oncology*. **24** (4): 261-269.



- ✚ Koh, G; Chou, G; Liu, Z. 2009. Purification of a water extract of Chinese sweet tea plant (*Rubus suavissimus* S. Lee) by alcohol precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57** (11): 5000–5006.
- ✚ Konuk, M; Liman, R; Cigerci, I. 2007. Determination of genotoxic effect of boron on *Allium Cepa* root meristematic cells. *Pakistan Journal of Botany*. **39** (1): 73-79.
- ✚ Kott, V; Barbini, L; Cruañes, M; Muñoz, J; Vivot, E; Cruañes, J; Martino, V; Ferraro, G; Cavallaro, L; Campos, R. 1998. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **6** (1): 79-84.
- ✚ Kuras, M; Nowakowska, J; Sliwinska, E; Pilarski, R; Ilasz, R; Tykarska, T; Zobel, A; Gulewicz, K. 2006. Changes in chromosome structure, mitotiactivity and nuclear DNA contnt from cells of *Allium* test induced by bark water extract of *Uncariatom entosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology*. **107** (2): 211-221.
- ✚ Kurdelas, R; Lima, B; Tapia, A; Feresin, E; González Sierra, M; Rodríguez, M; Zacchino, S; Enriz, R; Freile, M. 2010. Antifungal activity of extracts and prenylated coumarins isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn. (Asteraceae). *Molecules*. **15**: 4898-4907.
- ✚ Lagarto Parra, A; Tillán Capó, J; Vega Montalvo, R; Cabrera González, Y. 1999. Toxicidad aguda oral de extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **1** (4): 26-28.
- ✚ Leme, D; Marín Morales, M. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*. **682**: 71-81.
- ✚ Lennette, E; Schmidt, N. 1979. Diagnostic procedures for Viral, *Rickettsial* and *Chlamydial* infections. 5th ed. American Public Health Association, Inc. Washington D.C.
- ✚ Lerda, D, Biaggi Bistoni, M; Peralta, N; Ychari, S; Vázquez, M; Bosio, G. 2005. Fumonisin in foods from Córdoba (Argentina), presence and genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. **43**: 691-698.
- ✚ Levan A. 1938. The effect of colchicine on root mitoses of *Allium*. *Hereditas*. **24**: 471–486
- ✚ Liman, R; Akyil, D; Eren, Y; Konuk, M. 2010. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and *Allium* test. *Chemosphere*. **80**: 1056-1061.
- ✚ Lipipun, V; Kurokawa, M; Suttisri, R; Taweechotipatr, P; Pramyothin, P; Hattori, M; Shiraki, K. 2003. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against *Herpes simplex* virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research*. **60** (3): 175-180.
- ✚ Llanos Medina, F; Espinoza Cruz, B; Salamanca Capusiri, E. 2009. Aqueous extraction from bark of *Galipea longiflora* and their leishmanicidal activity. *BIOFARBO*. **17** (2): 32-38.
- ✚ Lozoya, X. 1997. Fármacos de origen vegetal de ayer y hoy. *Investigación y Ciencia*. **254**: 4-10.
- ✚ Lucas, J; Bonnacarrère, V. 2005. Nuevos enfoques en el campo de las plantas aromáticas y medicinales: la producción de fitoterápicos. *Revista INIA*. **5**: 43-6.



- ✦ Mabry, T; Markham, K; Thomas, M. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York Inc. 1970.
- ✦ Mangiaterra, P. 2005. Evaluación de parámetros botánicos y fitoquímicos para el control de calidad de "carqueja". Tesina. Universidad de Belgrano. Buenos Aires. Argentina.
- ✦ Marín Ocampo, A; López Zuluaga, C; Pérez Cardenas, J; Isaza Mejia, G. 2006. Actividad antifúngica de los extractos acuosos de *Baccharis trinervis*, *Baccharis latifolia* y *Solanum dolichosepalum*. *Biosalud*. 5: 51-59.
- ✦ Martínez Guerra, M; López Barreiro, M; Morejón Rodríguez, Z; Rubalcaba, Y. 2000. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). *Revista Cubana de plantas medicinales*. 5 (1): 23-25.
- ✦ Martínez, J. 2005. Recolección y comercialización de plantas medicinales en el departamento Santa María, provincia de Córdoba, Argentina. *Acta farmacológica Bonaerense*. 24 (4): 575-584.
- ✦ Martino, V; Ferraro, G; Debenedetti, S; Coussio, J. 1984. Compuestos polifenólicos aislados de *Pluchea sagittalis* (Compuestas). *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 3 (2): 141-146.
- ✦ Martino, V; Ferraro, G; Debenedetti, S; Coussio, J. 1989. Determinación espectrofotométrica del contenido de ácidos cafeoilquínicos en especies argentinas de compuestas usadas en medicina popular. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 8 (1): 3-9.
- ✦ Melo, F; Benati, F; Roman, W; de Mello J; Nozawa, C. 2008. The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiological Research*. 163 (2):136-9.
- ✦ Mercer A; Maggs J; Sun X; Cohen G; Chadwick J; O'Neill P; Park B. 2007. Evidence for the involvement of carbon-centered radicals in the induction of apoptotic cell death by artemisinin compounds. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 9372-9382.
- ✦ Merle, H; Morón, M; Blazquez, M; Boira, H. 2004. Taxonomical contribution of essential oils in mandarins cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 491-497.
- ✦ Mestrimer, F; Pires Rincao, V; Benati, F; Carvalho Linhares, R; Galina, K; Mendes de Toledo, C; Lopes, G; Palazzo de Mello, J; Nozawa, C. 2006. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on *Poliovirus* and *Bovine Herpesvirus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29 (6): 1092-1095.
- ✦ Meyer, J; Afolayan, A; Taylor, M; Engelbrecht, L.1996. Inhibition of *Herpes simplex virus* type 1 by aqueous extracts from shoots of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 52 (1): 41-43.
- ✦ Mongelli, E; Chuludil, H; Leicach, S. 2009. Plantas medicinales y aromáticas en la Argentina. *Revista Ciencia Hoy en línea*. Vol. 19. N° 111.



- ✚ Mongelli, E; Desmarchelier, C; Rodríguez Talou, J; Coussio, J; Ciccía, G. 1997. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis cardiofolia* DC. *Journal of Ethnopharmacology*. **58**: 157-163.
- ✚ Mongelli, E; Pomilo, A. 2002. Del uso popular a la industria farmacéutica. *Revista Ciencia Hoy en línea*. Vol. 12. N° 68.
- ✚ Mongini, C; Waldner, C. 1996. Metodologías para la evaluación de las células inmunocompetentes. En: Margni R. *Inmunología e Inmunoquímica*. 5° Edición. Editorial Médica Panamericana. 36:747 y 769.
- ✚ Montanha, J; Moellerke, P; Bordignon, S; Schenkel, E; Roehe, P. 2004. Antiviral activity of Brazilian plant extracts. *Acta Farmacologica Bonaerense*. **23** (2): 183-6.
- ✚ Monteiro, M; Gomes-Carneiro, M; Felzenszwalb, I; Chahoud, I; Paumgarten, F. 2001. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensate*. *Journal of Ethnopharmacology*. **74**: 149-157.
- ✚ Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunological Methods*. **65**: 55-63.
- ✚ Nogueira N; Reis P; Laranja G; Pinto C; Aiub C; Felzenszwalb I; Paes M; Bastos F; Bastos V; Sabino K; Coelho M. 2011. In vitro e in vivo en la evaluación toxicológica de los extractos y fracciones de *Baccharis trímpera* con actividad anti-inflamatoria. *Journal of Ethnopharmacology*. **138** (2): 513-22.
- ✚ Nugier, F; Collins, J; Ayamard, M; Langlois, M. 1992. Occurrence and characterization of acyclovir- resistant *Herpes simplex* virus isolates: report on a two- year sensitivity screening survey. *Journal of Medical Virology*. **36**: 1-12.
- ✚ Núñez Montoya, S; Comini, L; Rumie Vittar, N; Fernández, I; Rivarola, V; Cabrera, J. 2008. Phototoxic effects of *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *Toxicon*. **51**, 1409-1415.
- ✚ Núñez, C; Cantero, J. 2000. Las plantas medicinales del sur de la provincia de Córdoba. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto.
- ✚ Ogata I; Kawanai T; Hashimoto E; Nishimura Y; Oyama Y; Seo H. 2010. Bisabololoxide A, one of the main constituents in German chamomile extract, induces apoptosis in rat thymocytes. *Archive of Toxicology*. **84**: 45-52.
- ✚ Oliveira Teixeira, R; Leiva Camparoto, M; Mantovani, M; Pimenta Vicentini, V. 2003. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in vitro and in vivo assays. *Genetics and Molecular Biology*. **26** (4): 551 - 555.
- ✚ OMS. 2005. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.
- ✚ Palacios, P; Gutkind, G; Rondina, R; De Torres, R; Coussio; J. 1983. Actividad Antimicrobiana de *Baccharis crispa* Sprengel (Carqueja, F.A.) y *Baccharis notoserčila* Gris. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. **2** (1): 5-10.
- ✚ Palacios, P; Wilson, E; Debenedetti, S. 1999. Análisis por HPLC de ácidos cafeilquínicos presentes en tres especies de *Baccharis*. *Dominguezia* **15**. N° 1.



- ✚ Park, K. 2003. Evaluation of in vitro antiviral activity in methanol extracts against influenza virus type A from Korean medicinal plants. *Phytotherapy Research*. **17** (9): 1509-1563.
- ✚ Paul E; Lunardelli A; Caberlon E; Bernardes de Oliveira C; Vianna Santos C; Biolchi V; Alves Bastos C; Barbosa Moreira K; Bordignon Nunes F; Gosmann G; Rodrigues de Oliveira J. 2009. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. *Inflammation*. **32**: 419-425.
- ✚ Pío Correa, M. 1984. Diccionario das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, vol. III. Ministerio de Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro. Pág.: 139.
- ✚ Pochettino, M; Arenas, P; Sánchez, D; Correa, R. 2008. Conocimiento botánico tradicional, circulación comercial y consumo de plantas medicinales en un área urbana de Argentina. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas BLACPMA. **7**(3): 141-148.
- ✚ Rajbhandari, M; Mentel, R; Jha, P; Chaudhary, R; Bhattarai, S; Gewali, M; Karmacharya, N; Hipper, M; Lindequist, U. 2007. Antiviral Activity of Some Plants Used in Nepalese Traditional Medicine. e-CAM: 1-6.
- ✚ Rajbhandari, M; Wegner, U; Julich, M; Schöpke, T; Mentel, R. 2001. Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **74** (3): 251-255.
- ✚ Rangel, D; García, I; Velasco, J; Buitrago, D; Velazco, E. 2001. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nítida*. *Revista de la Facultad de Farmacia*. Vol. 42.
- ✚ Rani, G; Kaur, K; Wadhwa, R; Kaul, S; Nagpal, A. 2005. Evaluation of the anti-genotoxicity of leaf extract of ashwagandha. *Food and Chemical Toxicology*. **43**: 95-98.
- ✚ Rank, J. 2003. The method of *Allium* anaphase telophase chromosome aberration assay. *Ekologija* (Vilnius). **1**: 38 - 42.
- ✚ Rank, J; Nielsen, M. 1998. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **148** (2-3): 113-119.
- ✚ Ratera, E; Ratera, M. Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular. 1ª edición. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 1980.
- ✚ Rathore, H; Choubey, P. 2005. Prevention of acetaminophen-induced mitodepression with myrobalan (Fruit of *Terminalia chebula*) in *Allium cepa* model Iranian. *Journal of Pharmacology & Therapeutics*. **4** (2): 100-104.
- ✚ Razonable, R. 2011. Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. Symposium on antimicrobial therapy. *Mayo Clinical Proceedings*. **86** (10): 1009-1026.



- ✦ Richman, D. 1996. Antiviral drugs resistance: issues and challenges. pp: 1-12. In: Antiviral drug resistance. Edited by Richman, D. D. John Wiley and Sons, Chichester.
- ✦ Rodríguez, M; Martínez, M; Bettucci, G; Gattuso, S; Gattuso, M. 2009. Diferenciación de tres especies mundiales: *Baccharis articulata*, *Baccharis gaudichaudina* y *Baccharis sagittalis* (Asteraceae) mediante TLC y HPLC. Simposio XXXII Jornadas Argentinas de Botánica. Sitio en internet: www.conicet.gov.ar/scp/vista_resumen.php.
- ✦ Rosenberg, Y. 2004. Descripción de la actividad antiviral de microcina J25 y fragarina contra virus de importancia sanitaria. Tesina. Universidad de Belgrano.
- ✦ Ruiz-Fons, F; Vidal, D; Höfle, U; Vicente, J; Gortázar, C. 2007. Aujeszky's disease virus infection patterns in European wild board. *Veterinary Microbiology*. 120 (3-4): 241-250.
- ✦ Sabini, L. 1996. Caracterización del virus de la Pseudorrabia, cepa RC/79: Estudios dirigidos al control y/o prevención de la enfermedad. Tesis doctoral. UNRC.
- ✦ Safrin, S; Kemmerly, S; Smith, T; Weissbach, N; De Veranez, D; Phan, L; Cohn, D 1994. Foscarnet- resistant *Herpes simplex* virus infection in patients with AIDS. *Journal of Infectious Diseases*. 169: 193-196.
- ✦ Sánchez Lamar, A; Fonseca López, G; Capiro Trujillo, N; Fernández Fuentes, D. 2000. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*. 34 (1): 34 - 43.
- ✦ Sánchez Palomino, S; Abad, M; Bedoya, L; García, J; Gonzáles, E; Chiriboga, X; Bermejo, P; Alcami, J. 2002. Screening of south American plants against human immunodeficiency Virus: Preliminary Fractionation of Aqueous Extract from *Baccharis trinervis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 25 (9): 1147-1150.
- ✦ Sartorato, A; Machado, A; Delarmelina, C; Figueira, G; Texeira Duarte, M; Rehder, V. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 275-280
- ✦ Schnitzler, P; Nolkemper, S; Stintzing, F; Reichling, J. 2008. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine*. 15: 62-70.
- ✦ Sefidkon, F; Abbasi, K; Jamzad, Z; Ahmadi, S. 2007. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food Chemistry*. 100: 1054–1058.
- ✦ Serkedjieva, J; Ivancheva, S. 1999. Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 64 (1): 59-68.
- ✦ Shtukmaster, S; Ljubuncic, P; Bomzon, A. 2010. The effect of an aqueous extract of *Teucrium polium* on glutathione homeostasis in vitro: A possible mechanism of its hepatoprotectant action. *Advances in Pharmacological Sciences*. Article ID 938324, 7 pages doi:10.1155/2010/938324.



- ✦ Simões-Pires, C; Queiroz, E; Henriques, A; Hostettmann, K. 2005. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. *Phytochemical Analysis*. **16** (5): 307-314.
- ✦ Soraru, S; Bandoni, A. Plantas de la Medicina Popular Argentina. Editorial Albatros. Buenos Aires, Argentina. 1978.
- ✦ Soriano, V; Martín Carbonero, L; Vispo, E; Labarga, P; Barreiro, P. 2011. Infección por virus de la inmunodeficiencia humana y hepatitis víricas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **29** (9): 691-701.
- ✦ Spesia, M. 2004. Aceite esencial de *Minthostachys verticillata*: Su acción sobre la replicación del virus *Herpes suis* tipo 1 en células Vero. Tesina Biblioteca Central de la UNRC.
- ✦ Taborda, N; Acevedo, L; Patiño, C; Forero, J; López Herrera, A; Zoot, M. 2007. Actividad antiviral in vitro de extractos de *Hura crepitans* y *Codiaeum variegatum* en la replicación de *herpes virus bovino* tipo-1 y virus de estomatitis vesicular. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **20**: 241-249.
- ✦ Tapia, A; Rodríguez, J; Theoduloz, C; López, S; Feresin, E; Schmeda Hirschmann, G. 2004. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology*. **95**: 155-161.
- ✦ Tolo, F; Rukunga, G; Muli, F; Njagi, E; Njue, W; Kumon, K; Mungai, G; Muthaura, C; Muli, J; Keter, L; Oishi, E; Kofi Tsekpo, M. 2006. Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* against *Herpes simplex virus*. *Journal of Ethnopharmacology*. **104** (1-2): 92-99.
- ✦ Torres C; Dominguez M; Carbonari J; Sabini M; Sabini L; Zanon S. 2011. Study of antiviral and virucidal activities of aqueous extract of *Baccharis articulata* against *Herpes suis* virus. *Natural Product Communications*. **6** (7): 993-994.
- ✦ Torres Osuna, L; Tapia Pérez, M; Agilar Contreras, A. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mejicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio etnobotánico, fitoquímica y farmacológico. Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona. España.
- ✦ Tülay, A; Özlem, S. 2010. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with *Allium* Test. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi: 10.1155/2010/189252.
- ✦ Tuset, M; Martín Conde, T; Miró, J; Del Cacho, E; Alberdi, A; Codina, C; Ribas, J. 2003. Características de los fármacos antivirales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **21** (8): 433-458.
- ✦ Urteaga Omar, F; Lallana, V. 2005. Optimización de una técnica de tinción para determinación de efectos citogenéticos en ápices radicales de *Allium cepa*. *Revista Científica Agropecuaria*. **9** (1): 63-70.



- ✦ Valdez García, S; del Barrio Alonso, G; Gutiérrez Gaitén, Y; Morier diaz, L. 2003. Evaluación preliminar de la actividad antiviral del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* frente al virus VHS-1. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. **55** (3): 169-173.
- ✦ Vanden Berghe, D; Vlietinck, A. 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods in Plants Biochemistry*. 6: 47-69.
- ✦ Vanella, J. 1964. Procedimientos y técnicas del laboratorio de virus. Instituto de Virología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Córdoba.
- ✦ Verdi, L; Brighente, I; Pizzolatti, M. 2005. The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. *Química Nova*. **28** (1): 85-94.
- ✦ Vicent Martínez, C. Historia de las plantas medicinales. Importancia de las plantas medicinales. 2004. Principios activos. www.botanical-online.com.
- ✦ Vieira, T; Seifriz, I; Charao, C; De Oliveira, S; Creczynski Pasa, T. 2011. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species; inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **21** (4): 601-607.
- ✦ Vijayan, P; Raghu, C; Ashok, G; Dhanaraj, S; Suresh, B. 2004. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. *Journal of Medical Research*. 120: 24-29.
- ✦ Vivot Lupi, E; Sánchez Brisuela, C; Casik Jeifetz, F; Sequin Acosta, C. 2009. Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. *Revista Cubana de Farmacia*. Vol. 434, Nº 4.
- ✦ Vizoso Parra, A; Ramos Ruiz, A; Villaescusa Gonzalez, A; Decalo Michelena, M; Batencourt Badell, J. 1997. Estudio genotóxico in vitro e in vivo en tinturas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Mentha piperita* L. (Toronjil de menta). *Revista Cubana de Planta Medica*. **2** (1): 6-11.
- ✦ Wachsman, M; Coto, E; Martino, V. 1988. Search for antiviral activity in higher plant extracts. *Fitoterapia*. **59** (5): 422-424.
- ✦ www.ffyb.uba.ar/gxpsites/hgxppdwn.aspx.
- ✦ [www.homeopatia.com.mx/congreso26/con26p33.doc].
- ✦ www.silae.it/docs/Atti_XIX_Full.pdf
- ✦ Yi, H; Meng, Z. 2003. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on roots tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutation Research*. 537: 109-114.
- ✦ Yi, H; Wu, L; Jiang, L. 2007. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium* root micronucleus assay. *Science of the Total Environment*. 383: 232-236.
- ✦ Yi, L; Li, Z; Yuan, K; Ou, X; Guangwen, C; Zhang, H; Luo, H; Zhu, L; Jiang, P; Chen, L; Shen, Y; Luo, Min; Zou, G; Hu, J; Duan, D; Nie, Y; Shi, X; Wang, W; Han, Y; Li, T; Liu, Y; Ding, M; Deng, H; Xu, X. 2004. Small molecules blocking the entry of acute respiratory syndrome *Coronavirus* into host cells. *Journal of Virology*. **78** (20): 11334-11339.



- ✚ Zandi, K; Zadeh, M; Sartavi, K; Rastian, Z. 2007. Antiviral activity of *Aloe vera* against *Herpes simplex virus* type 2: An in vitro study. *African Journal of Biotechnology*. **6** (15): 1770-1773.
- ✚ Zanon, S. 2005. Acción antiviral de *Minthostachys verticillata*. Tesis Doctoral. 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. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **41** (2): 59-62.
- ✚ Zygadlo, J; Juliani, H. 2000. Bioactivity of essential oil components. Current topics in *Phytochemistry*. **3**: 203-214.



8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Presentación de trabajo en el: XIX SILAE CONGRESS "Fernando Cabieses Molina" Villasimius, Cagliari, Italia. 6-10 de Septiembre de 2010.

www.silae.net

Posters

P201

Estudio de las actividades antiviral y virucidal de extractos acuosos de *Baccharis articulata* frente a virus Herpes suis

Torres C.V., Domínguez M.J., Carbonar J.J.L., Sabini M.C., Sabini L.I., Zanón S.
Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales,
Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km. 901. (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
ctorres@unrc.edu.ar

La especie vegetal *Baccharis articulata* (nombre vulgar: carqueja) es nativa del continente americano y predominante en la región serrana de la provincia de Córdoba. La medicina tradicional otorga a este vegetal importantes propiedades terapéuticas siendo empleada para el tratamiento de problemas digestivos principalmente hepáticos, en infecciones urinarias y como antiséptico en leñones. Diversas investigaciones han demostrado su capacidad antibacteriana y antifúngica. Estos antecedentes impulsaron el estudio de la acción antiviral de sus extractos acuosos frente al virus Herpes suis tipo 1, íntimamente relacionado a Herpes simplex tipos 1 y 2. La obtención del extracto acuoso frío (EAF) se realizó mezclando material vegetal triturado con agua destilada e incubando a 4°C por 48 h; para el extracto acuoso caliente (EAC) se procedió de igual manera excepto que se incubó a 70°C. Para evaluar la actividad antiviral de los mismos se empleó la Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC) que soportó el cultivo celular Vero. Se cuantificó la capacidad de inhibir la replicación del virus durante la adsorción y penetración viral y, posterior a estos eventos. La inhibición viral del EAF y EAC en los tratamientos durante la adsorción y penetración viral fueron de 25,6% y 54% respectivamente; cuando los mismos fueron incorporados post-adsorción, revelaron valores de 3,5% (EAF) y 6,8% (EAC). Por otra parte, los cultivos celulares se incubaron con ambos extractos durante 2 h previo a la infección viral, determinándose una disminución del título viral de 0% y 10% para EAF y EAC respectivamente.

Se investigó también su capacidad de inactivar el virus extracelularmente por lo que suspensiones virales se incubaron 2 h a 37°C con cada extracto a diferentes concentraciones (MCNC 1X y 2X), antes de la infección de los cultivos. El EAF ejerció una inactivación viral del 31,46% y 97,84% a la MCNC 1X y 2X respectivamente, mientras que para el EAC se obtuvo valores de 80% y 96% a las mismas MCNC.

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que ambos extractos no ejercen una inhibición importante durante la adsorción y penetración del virus Herpes suis a las células como tampoco en los eventos posteriores que acontecen dentro de la célula. Tampoco inducen un estado antiviral en el cultivo celular, que generen una refracción a la infección por el virus. Por el contrario, ambos extractos ejercen una acción virucidal importante cuando la suspensión viral fue tratada con concentraciones mayores a la MCNC.

Estos resultados demuestran la capacidad desinfectante de los extractos acuosos frío y caliente de *Baccharis articulata* y aportan un valioso conocimiento a las propiedades etnofarmacológicas.



Presentación de trabajo en el: X SIMPOSIO ARGENTINO XIII SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE FARMACOBOTANICA. Córdoba, Argentina 24-26 de noviembre de 2010.

P132

ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE BACCHARIS ARTICULATA (ASTERACEAE). Antiherpetic activity of aqueous extracts of *Baccharis articulata* (Asteraceae)

Torres, C. V.; Zanon, S. M.; Carbonari, J. L.; Domínguez, M. J.; Cariddi, L.N. & Sabin, L.I.

123



Área Actividad Biológica y Farmacología

Fac. Cs. Exactas, Fco-Qcas y Naturales. U.N.R.C. (5800) Córdoba, Argentina. cariddi@ensa.unrc.edu.ar

La búsqueda de antivirales de origen vegetal es un tópico de interés en la actualidad, particularmente las plantas medicinales con antecedentes farmacológicos. *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. "carqueja" se utiliza popularmente para el tratamiento de problemas digestivos, y ha demostrado poseer acción antimicrobiana. En este trabajo se evaluó la actividad citotóxica, antiviral y virucidal de extractos acuosos de *B. articulata* frente al virus *Herpes suis tipo 1* y en células Vero. Los extractos acuosos frío (EAF) y caliente (EAC) se obtuvieron, secuencialmente por extracción a 4°C y 70°C del vegetal. La citotoxicidad se determinó por observación microscópica y por técnicas colorimétricas de Rojo neutro y MTT. La actividad antiviral fue ensayada durante y después de la adsorción y penetración viral por reducción de placas de lisis; la actividad virucidal se realizó por exposición directa al virus de los extractos acuosos a la MCNC 1 y 2X. La máxima concentración no citotóxica (MCNC) fue de 1.000 y 600 µg/ml para EAF y EAC, respectivamente. Los valores de CC₅₀ para el EAF fueron de 2.480 µg/ml (RN) y de 2.110 µg/ml (MTT); para el EAC las CC₅₀ fueron de 718 µg/ml (RN) y de 538 µg/ml (MTT). La mayor inhibición viral (54%) se logró con el EAC durante la adsorción y penetración viral. La máxima capacidad virucidal se evidenció cuando el virus fue expuesto a la MCNC 2X con EAF (98%) y EAC (96%). Estos resultados demuestran la capacidad desinfectante y antiséptica de los EAF y EAC de *B. articulata* y aportan un valioso conocimiento a las propiedades etnofarmacológicas.

20

1912
1913

1914



Publicación en:

NPC Natural Product Communications

2011
Vol. 6
No. 7
993 - 994

Study of Antiviral and Virucidal Activities of Aqueous Extract of *Baccharis articulata* against *Herpes suis* virus

Cristina Vanesa Torres, María Julia Domínguez, José Luis Carbonari, María Carola Sabini, Liliana Inés Sabini and Silvia Matilde Zanón

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas, Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

ctorres@exa.uncrc.edu.ar

Received: December 10th, 2010; Accepted: March 16th, 2011

Baccharis articulata is native of America and traditionally used for the treatment of digestive disorders and urinary infections. Cytotoxicity of aqueous extracts of *B. articulata* was investigated in Vero cells. As the maximal non cytotoxic concentration has been established, this concentration has been used to evaluate antiviral and virucidal activities against *Herpes suis* virus type 1, member of the same subfamily of *Herpes simplex* virus. Aqueous extracts of *B. articulata* exhibited more than 95% of virucidal activity. These findings support their potential application as a disinfectant or antiseptic with low toxicity and provide a valuable knowledge to ethnopharmacology properties of *Baccharis articulata*.

Keywords: cytotoxicity, virucidal, antiviral activity, aqueous extract, *Baccharis articulata*, *Herpes suis* virus.

Food and Chemical Toxicology 50 (2012) 155–161



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox



Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells

Laura Cariddi^{a,*}, Franco Escobar^a, Carola Sabini^a, Cristina Torres^a, Elina Reinoso^a, Andrea Cristofolini^b, Laura Comini^c, Susana Núñez Montoya^c, Liliana Sabini^a

^aDepartamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina, Ruta 36 Km 601, CP 5900 Río Cuarto, Córdoba, Argentina

^bÁrea de Microscopía Electrónica, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina, Ruta 36 Km 601, CP 5900 Río Cuarto, Córdoba, Argentina

^cPatronato de Farmacia, Universidad Nacional de Córdoba (UNIV-CORFOCET), Ciudad Universitaria, CP 5000 Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 August 2011
Accepted 3 November 2011
Available online 13 November 2011

Keywords:
Baccharis articulata (Lam.) Pers.
Asteraceae
Aqueous extract
Apoptosis
Mutagenicity
Normal cells

ABSTRACT

In a previous study we have demonstrated that cold aqueous extract of *Baccharis articulata* (Ba CAE) induced the death of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and exerted low mutagenic effects on mice at 6 h after administration. The aim of this work was to investigate whether the PBMCs death induced by Ba CAE is due to apoptosis, and whether this extract exerts mutagenic effects on mice at 24 and 48 h after administration. In addition, Ba CAE was chemically characterized. PBMCs from healthy volunteers were exposed to extract (10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 and 1280 µg/ml) for 18–24 h. Cell viability was determined by staining of trypan blue exclusion method. Apoptosis was determined by Hoechst 33258 staining, TUNEL, and DNA fragmentation analysis by agarose gel electrophoresis. BALB/c mice were injected with extract (1800, 900 and 450 mg/kg) and sacrificed at 24 and 48 h post-injection. Bone marrow samples were used to assess chromosome mutations by the micronucleus test. The extract induced PBMCs death by apoptosis and increased the frequency of micronuclei in bone marrow. The phytochemical study of Ba CAE showed the presence of flavonoids as luteolin and acacetin, caffeoylquinic acids as chlorogenic acid, and tannins.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

73195

U.N.R.C
Biblioteca Central



73195