



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
Departamento de Farmacología  
Cátedra de Farmacognosia**

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LAS  
ACTIVIDADES ANTIINFLAMATORIA Y ANTIPROLIFERATIVA DE  
EXTRACTOS DE *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Apiaceae)”**

**Trabajo de tesis para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires**

**Autor: Farmaceútica Adriana Graciela Ouviaña**

**Director de tesis: Prof. Dra. María Luján Flores (FCNyCS, UNPSJB)**

**Codirector de tesis: Prof. Dra. Claudia Anesini (FFyB, UBA)**

**2019**

*A mi madre Carmen  
y a la memoria de mi padre, el Dr. Juan Manuel Ouviña,  
quienes siempre me acompañaron para alcanzar mis metas.*

*A mi hijo Juan Francisco, luz de mi vida  
y a mi esposo y colega, Gabriel Casanova,  
por ser mi apoyo, mi fortaleza y mi compañía,  
porque sin ellos, no lo hubiese logrado.*

*"Cuando una persona desea realmente algo, el Universo entero conspira para que pueda realizar su sueño. Basta con aprender a escuchar los dictados del corazón y a descifrar un lenguaje que está más allá de las palabras, el que muestra aquello que los ojos no pueden ver..."*

*(Frase extraída del libro "EL ALQUIMISTA" de Paulo Coelho)*

Agradezco con todo mi corazón:

A la memoria de la Prof. Dra. Graciela Esther Ferraro, en un principio Directora de este trabajo de Tesis, le agradezco en primer lugar haberme transmitido su motivación por la investigación, quien con su conocimiento y apoyo, marcó mi camino para desarrollarme como profesional en la Universidad de Buenos Aires.

A mi actual Directora de tesis, la Prof. Dra. María Luján Flores, por el estímulo para la realización de este trabajo de tesis, a pesar de todas las dificultades que surgieron en el camino, por sus consejos, por su incansable dedicación, valioso apoyo, esfuerzo, ánimo, orientación y continua generosidad y ayuda para la realización de esta investigación.

Gracias Luján, por haberme guiado en todo momento durante todos estos años, por alentarme siempre, por comprenderme y por confiar en mí.

A mi Codirectora de tesis, la Dra. Claudia Anesini, por todas las actividades realizadas en conjunto, agradezco haberme brindado su conocimiento y estímulo constante, su tiempo, dedicación y por su calidez humana.

Agradezco también:

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud (FCNyCS), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB) por haberme permitido utilizar sus laboratorios y equipamiento para mi investigación.

Al Prof. Dr. Osvaldo León Córdoba (UNPSJB), por su participación en trabajos de mi tesis y por estar siempre presente.

A mis colegas de la UNPSJB, quienes me recibieron tan afectuosamente y agradezco por la colaboración en trabajos de esta tesis y por su amistad.

A la Dra. Oksana Hnatyszyn (QEPD) por guiar mis primeros pasos en la cátedra de Farmacognosia.

Al Dr. Gustavo Giberti (QEPD) por la colección y determinación taxonómica del material vegetal en estudio.

A la Dra. Susana Gorzalczany, por las investigaciones realizadas en colaboración, por brindarme su conocimiento y por su afecto.

A la Dra. Paula López, por su tiempo, dedicación y por la colaboración en la realización de los análisis de HPLC para este trabajo de tesis, por su amistad.

A la Dra. Valeria Moscatelli, mi compañera de laboratorio, por las horas de trabajo compartidas, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por su cariño y amistad.

A la Dra. Flavia Redko, mi compañera de viaje, por tantas charlas, por sus palabras, por su ayuda en la compaginación de mi tesis.

Gracias Fla, por tu ayuda en cada momento que lo necesité, tu alegría y tu amistad.

A la Farm. Vanina Catalano, por su buena predisposición hacia mi trabajo de tesis y por su colaboración.

A la Dra. Carla Marrasini y al Dr. Ignacio Peralta, por su colaboración en experimentos de esta tesis.

A la Dra. María del Rosario Alonso, por sus aportes científicos para mi trabajo de tesis.

A la Prof. Dra. Rosana Filip por su colaboración en la determinación de polifenoles.

A la Prof. Dra. Virginia Martino, por sus sugerencias y por su apoyo.

Al Prof. Dr. Arnaldo Bandoni, por estar siempre atento a las publicaciones sobre mi tema de tesis.

A la Dra. Catalina Van Baren, por su afecto, sus consejos y su buena predisposición.

A la Dra. Daiana Retta, a la Dra. Paola Di Leo Lira y a la Dra. Laura Cogoi, por estar siempre atentas a mi trabajo de tesis, por sus estímulos y sus lindas palabras.

A la Dra. Valeria Sülsen, por organizar y compartir una salida de campo.

A la Dra. Patricia Perelman, por la colecta de material vegetal, a los comienzos de este estudio de investigación.

A mis queridas colegas y compañeras, vecinas de laboratorio, Farm. Verónica Tarcaya e Ingrid Cuffré, por su apoyo y afecto.

A la Téc. Quím. Rita Lemos por sus sonrisas y su buen humor.

A la Sra. María Elena Cincallegro, por su ayuda en la colección de material vegetal, por estar siempre y por su gran corazón.

Quiero agradecer también a todos mis colegas: Dra. Liliana Muschiatti, Dr. Jerónimo Ulloa, Dra. Jelena Nadinic, Farm. Santiago Isolabella, Farm. Jennifer Riedel, y a todos aquellos que formamos parte de la cátedra de Farmacognosia, Vanina, Andrea, Laura, Juan Carlos, gracias a todos por los momentos compartidos y por el cariño brindado.

Agradezco profundamente a mis dos amores, mi esposo Gabriel y mi hijo Juan Francisco, mi amor y mi vida.

Y agradezco a mi familia:

En especial a la memoria de mi padre, Juan Manuel, quien estaría orgulloso de ver mi trabajo de tesis doctoral y quien siempre me aconsejó seguir adelante con este trabajo y a mi mamá, Carmen, por transmitirme el amor a la docencia y siempre alentarme ante cualquier dificultad, por acompañarme siempre en lo que hago. A los dos gracias por ser mis padres !!!!

A mis hermanos, Jorge, por sus consejos y por su permanente estímulo para lograr este trabajo de tesis; Gabriel, por ser mi apoyo incondicional, mi confidente y amigo y a mi hermano más chico Damián, a todos por ser parte de mi vida.

A mi amiga y cuñada Cecilia, quien nunca dejó que baje los brazos para poder así, concluir con mi trabajo de tesis.

A toda mi familia, Belén, Paula, Josesito, Florcita, Belu, Solcito, por darme ánimo en esta etapa final, a mis sobrinas María, Sara y a mi sobrino Tomás, y a las sobrinas pequeñas de la familia Lucía, Guigui y Martina, a todos por su cariño.

A mis amigas Juli y Lela, por compartir lindos momentos y por alentarme durante todos estos años.

A todos ellos, gracias por formar parte de mi Universo.



Colección de material vegetal, Miramar, Pcia. Buenos Aires (2013).  
Gabriel y Juan, gracias por compartir mis ideales, sin ustedes todo este trabajo  
no hubiese sido posible

# Prólogo

El término Farmacognosia fue utilizado por primera vez en el año 1815 por C.A. Seydler en su trabajo titulado "*Analecta Pharmacognostica*". La palabra deriva del griego "*pharmacon*: droga" y "*gnosia*, conocimiento" es decir, "conocimiento de las drogas".

Antiguamente se conocía a la Farmacognosia bajo el nombre de Materia Médica y abarcaba el estudio de las materias primas naturales utilizadas como medicamentos provenientes de los reinos animal, vegetal y mineral.

Con el avance de los conocimientos, se hizo imposible abarcar un campo tan amplio y es así que, desde comienzos del siglo XIX, la Farmacognosia se ocupa del estudio de los principios activos de origen biológico, sobre todo de aquellos provenientes del reino vegetal (Ferraro, 1997).

El reino vegetal posee muchas especies de plantas que contienen sustancias medicinales aún por descubrir y un gran número de plantas son analizadas constantemente en relación a su posible valor farmacológico, resultandos destacables aquellas plantas con propiedades antitumorales, antimicrobianas, anticoagulante, antiinflamatoria y antioxidante, entre otras.

A lo largo de la historia de la humanidad las especies vegetales han sido un recurso valioso para su aplicación en Salud, así como una fuente importante de compuestos novedosos.

Nuestro país cuenta con una gran biodiversidad que incluye una extensa lista de especies utilizadas en medicina tradicional por distintas culturas. Pero aún hoy, son pocas las especies que han sido investigadas y que pueden ser la base para el descubrimiento de nuevos agentes útiles en terapéutica.

Para esta investigación se seleccionó entre las plantas medicinales autóctonas, a la especie *Hydrocotyle bonariensis* Lam., también utilizada en medicina popular y teniendo en cuenta que aún no había sido estudiada científicamente.

En medicina tradicional es empleada en toda América del Sur desde hace decenas de años contra los eritemas cutáneos. En Argentina, particularmente en la provincia de Buenos Aires, crecen varias especies del género *Hydrocotyle*



en las selvas ribereñas del Delta, Río de la Plata y en playas marítimas bonaerenses; la más común de ellas es *Hydrocotyle bonariensis*. Lam.

Es conocida vulgarmente como “redondita de agua”, “paragüita”, “tembladerilla”, planta herbácea de amplia distribución en Sudáfrica, Estados Unidos, Brasil, Uruguay, Chile, Norte y Centro de la República Argentina. Muy frecuente en praderas húmedas, céspedes de parques y jardines, pajonales y médanos durante todo el año y florece en verano (Cabrera et al., 1965; Ratera et al., 1980).

El presente trabajo de tesis comprendió entonces el análisis de esta especie colectada en el Parque Pereyra Iraola, Provincia de Buenos Aires, abarcando el estudio fitoquímico y la determinación de actividades biológicas sobre la base de los usos tradicionales del género y considerando la posible relación existente entre estas sustancias y las propiedades terapéuticas descritas para esta especie vegetal.

*El trabajo de investigación de esta tesis fue financiada a través de los siguientes subsidios:*

**UBA SECYT B114 (2008-2010).** Desarrollo de nuevos fármacos a partir de plantas medicinales. Evaluación química y farmacológica. Directora Dra. G. Ferraro.

**UBA SECYT 01W124 (2011-2014).** Desarrollo de nuevos fármacos a partir de plantas medicinales. Evaluación química y farmacológica. Directora Dra. G. Ferraro.

**PIP 00067 CO (2014-2016) (Res. 5013/14) CONICET.** Búsqueda de fitofármacos con actividad antitumoral e inmunomoduladora a partir de plantas medicinales argentinas. Efecto sobre el estrés oxidativo y vías de señalización JAK / STAT3. Directora Dra. C. Anesini, Codirectora Dra. R. Alonso.

**UBA SECYT 01/LL177 (2014-2017).** Evaluación de la actividad inhibitoria in vitro sobre *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* de extractos y compuestos puros aislados de plantas medicinales argentinas. Directora Dra. P. López.

**UBACYT 20020130100686BA (1/08/2014-31/07/2017).** Estudio fitoquímico y farmacológico de especies vegetales de uso medicinal y alimenticio: a) *Ilex paraguariensis* St. Hil. (yerba mate) ellex spp. sustitutos o adulterantes de la misma, b) *Tilia* spp. y c) *Larrea divaricata* Cav., entre otras. Directora Dra. R. Filip, Codirectora Dra. C. Anesini.

**UBACYT 20020170100264BA (1/01/2018-31/12/2020).** Búsqueda de fitofármacos antioxidantes y antiglicantes con actividad antiinflamatoria, antiproliferativa, inmunomoduladora y fotoprotectora a partir de plantas medicinales argentinas para su potencial aplicación en desórdenes de la piel. Directora Dra. C. Anesini.

**Proyecto INTER-U (PROMFYB Farmacia FCN).** Cátedras de Farmacognosia y de Química Biológica II y en el GQBMRNP-CRIDEDECIT, de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

Los resultados de esta tesis dieron origen a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:

Publicaciones Científicas:

**Actividad antiinflamatoria tópica de extractos de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Apiaceae).** A. Ouviaña, S. Gorzalczany, C. Acevedo, G. Ferraro. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28 (6): 941-4, 2009.

**Actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae) en relación a polifenoles e hidratos de carbono constituyentes.** A. Ouviaña, M. Flores, O. Córdoba, I. Peralta, S. Gorzalczany, C. Anesini, G. Ferraro. *SAFE-COIFFA-BFFC*, 212, 2015. ISSN 2250-4079.

***Hydrocotyle bonariensis* Lam.: An argentinian plant with antichlamydial activity.** V. Catalano, C. Entrocassi, A. Ouviaña, E. Wilson, P. López, M. Rodriguez Fermepin. *Proceedings IX International Symposium on Natural Products Chemistry and Applications*, 75, 2016. ISBN: 978-956-362-192-1.

**Antichlamydial activity of *Hydrocotyle bonariensis* Lam.** A. Catalano, C. Entrocassi, A. Ouviaña, E. Wilson, P. López, M. Rodriguez Fermepin. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, Special 5: 25, 2017. doi10.15171/ijpni.2017.

***Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae): Chromatographic analysis of carbohydrates from aerial parts.** A. Ouviaña, O.L. Córdoba, M.L. Flores. *Abstracts Book XXVI – SILAE, IX – COCOCRO*, 257, 2017. ISBN 978-958-59491-3-3.

**Actividad anticlamidial de una planta medicinal argentina: *Hydrocotyle bonariensis* Lam.** V. Catalano, C. Entrocassi, A. Ouviaña, E. Wilson, P. López, M. Rodriguez Fermepin. *Dominguezia*, 34 (Supl.): 72-3, 2018.

**Pharmacognostical study of the aerial parts from *Hydrocotyle bonariensis* Comm. ex Lam. (Araliaceae) collected in Buenos Aires, Argentina.** A. G. Ouviaña, G. Ferraro<sup>†</sup>, M. D. Escobar Daza, D. P. Alcalde, C. Anesini, O. L. Córdoba, M. L. Flores. *Ars Pharm.*, enviado 2018.

**Antioxidant activity of *Hydrocotyle bonariensis* Comm. ex Lam. (Araliaceae) in relation to carbohydrates and phenols constituents.** A. Ouviaña, O. Córdoba, I. Peralta, C. Anesini, M. Flores. En preparación.

## Presentación y Asistencia a Congresos Científicos

**2 al 6 de agosto de 2004 - Estudio fitoquímico preliminar de *Hydrocotyle bonariensis*.** O. Hnatyszyn, A. Ouviaña, G. Ferraro.

VIII Simposio Argentino y XI Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. Buenos Aires, Argentina. Modalidad póster.

**23 al 27 de septiembre de 2006 - *Hydrocotyle bonariensis*: actividad antiproliferativa sobre células de un linfoma murino.** O. Hnatyszyn, C. Anesini, A. Ouviaña, G. Ferraro.

XV Congreso Italo Latinoamericano Di Etnomedicina "Ivano Morelli" SILAE 2006 Perugia, Italia. Modalidad póster.

**4 al 8 de septiembre de 2007 - Actividad antiproliferativa de extractos de *Hydrocotyle bonariensis* "redondita de agua" sobre células de un linfoma murino.** C. Anesini, A. Ouviaña, G. Ferraro, O. Hnatyszyn.

XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. SILAE 2007 - La Plata, Argentina. Modalidad póster.

**27 al 29 de octubre de 2009 - Caracterización de los hidratos de carbono de la infusión de las hojas de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Apiaceae).** A.

Ouviaña, G. Ferraro, M. D. Escobar Daza, D. Alcalde, O. L. Córdoba, M. L. Flores. X Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial. Buenos Aires, Argentina, Expositor, modalidad póster.

**24 y 25 de junio de 2010 - Carbohydrates and phenolics compounds from leaves of *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Apiaceae).** A. Ouviaña, M.D.

Escobar Daza, D. Alcalde, O.L. Córdoba, G. Ferraro, M.L. Flores. Primera Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, Argentina. Expositor, modalidad póster.

**22 y 23 de noviembre de 2012 - Carbohydrates from leaves of *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Apiaceae).** A. Ouviaña, M.D. Escobar Daza, O. Córdoba, G. Ferraro, M.L. Flores.

Segunda Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Rosario, Argentina. Expositor, modalidad póster.

**20 al 22 de noviembre de 2013 - Inhibición in vitro de *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* por extractos de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. efecto inhibitorio sobre un sistema persistentemente infectado.** A.C. Entrocassi, A.G. Ouviaña, M.L. Gallo Vaulet, A.V. Catalano, P.G. López, M. Rodríguez Fermepin.

XI Simposio Argentino. XIV Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. I Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales, Rosario, Argentina. Modalidad póster.

**3 al 6 de noviembre de 2015 - Actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae) en relación a polifenoles e**

**hidratos de carbono constituyentes.** A. Ouviaña, M. Flores, O. Córdoba, I. Peralta, S. Gorzalczany, C. Anesini, G. Ferraro.  
COIFFA, Córdoba, Argentina. Modalidad póster.

**22 al 25 de noviembre de 2016 - *Hydrocotyle bonariensis* Lam.: An Argentinian Plant With Antichlamydia Activity.** V. Catalano, C. Entrocassi, A. Ouviaña, E. Wilson, P. López, M. Rodríguez Fermepin.  
IX Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, Termas de Chillán, Chile. Modalidad póster.

**25 al 29 de septiembre de 2017 - *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae): Chromatographic analysis of carbohydrates from aerial parts.** A. Ouviaña, O. L. Córdoba, M. L. Flores.  
SILAE XXVI, IX Congreso Colombiano de cromatografía. Cartagena de Indias, Colombia. Modalidad póster.

**15 al 17 de mayo de 2017 - Antichlamydia activity of *Hydrocotyle bonariensis* Lam.** A. Catalano, C. Entrocassi, A. Ouviaña, E. Wilson, P. López, M. Rodríguez Fermepin.  
5th International Phytocosmetic and Phytotherapy Congress. Patras, Grecia. Modalidad póster.

**26 al 28 de noviembre de 2018 - Actividad anticlamidial de una planta medicinal argentina: *Hydrocotyle bonariensis* Lam.** V. Catalano, C. Entrocassi, A. Ouviaña, E. Wilson, P. López, M. Rodríguez Fermepin.  
VI Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales. II Jornadas Nacionales de Plantas Medicinales Nativas, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Modalidad póster.

---

**Índice****Primera Parte****Introducción y Objetivos****Capítulo 1 - Antecedentes generales**

1.1. Algo de historia	3
1.2. Familia Araliaceae	5
1.2.1. Distribución y hábitat	6
1.2.2. Características morfológicas de la familia Araliaceae	7
1.2.3. Especies medicinales destacadas de la familia Araliaceae	8
1.2.3.1. <i>Ginseng sp</i>	8
1.2.3.2. Ginseng siberiano: <i>Eleutherococcus senticosus</i>	12
1.2.3.3. <i>Hedera helix</i>	13

**Capítulo 2 - Antecedentes de *Hydrocotyle***

2.1. Género <i>Hydrocotyle</i>	17
2.1.1. <i>Hydrocotyle asiatica</i> (L.) Urban	21
2.1.2. <i>Hydrocotyle bonariensis</i> Lam.	26
2.2. Fitoquímica y actividades biológicas del género <i>Hydrocotyle</i>	29
2.2.1. <i>Hydrocotyle asiatica</i> (L.) Urban	30
2.2.2. <i>Hydrocotyle bonariensis</i> Lam.	33
2.2.3. Enfermedades inflamatorias de la piel: Psoriasis	35

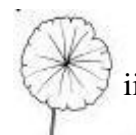
**Capítulo 3 - Objetivos**

3.1. Objetivo general	39
3.2. Metas de trabajo	40

**Segunda Parte**

**Materiales y Métodos****Capítulo 4 – Experimental**

4.1. Material vegetal	43
4.2. Material e instrumental de laboratorio para los análisis de extractos orgánicos	43
4.3. Preparación de los extractos orgánicos	45
4.3.1. Extracto de diclorometano de <i>H. bonariensis</i>	45
4.3.2. Extracto de acetato de etilo de <i>H. bonariensis</i>	46
4.4. Fraccionamiento, purificación y análisis del extracto de acetato de etilo y sus fracciones	46
4.4.1. Columna Sephadex LH 20	46
4.4.2. Análisis de las fracciones por cromatografía en capa delgada (TLC)	47
4.4.3. Columna Sephadex LH 20 de fracciones seleccionadas de la columna anterior	48
4.4.4. Análisis por cromatografía en capa delgada (TLC)	48
4.5. Extracto de metanol de <i>H. bonariensis</i>	49
4.5.1. Estudio cualitativo de los ácidos orgánicos, fenoles simples y polifenoles	49
4.5.2. Estudio cuantitativo de los fenoles	50
4.6. Purificación y análisis cromatográfico de los fenoles de los extractos	51
4.6.1. Análisis por cromatografía en capa delgada (TLC)	51
4.6.2. Análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC)	52
4.7. Análisis de saponinas en un extracto de metanol	52
4.8. Extracción con agua de <i>H. bonariensis</i>	53
4.8.1. Obtención de la Infusión al 5 % P/V	53
4.8.2. Fraccionamiento de la infusión al 5 % P/V	53



4.8.2.1. Hidrólisis ácida	55
4.8.2.2. Cromatografía planar para hidratos de carbono	55
4.8.2.3. Cromatografía líquida de alta performance con detector de índice de refracción (HPLC IR)	56
4.8.2.4. Determinación de hidratos de carbono totales	56
4.8.2.5. Determinación de ácidos urónicos	57
4.8.2.6. Determinación del contenido de sulfato	58
4.8.3. Fraccionamiento de los componentes solubles de la infusión y de las aguas de diálisis	59
4.8.4. Fraccionamiento de los polisacáridos del dializado (Id) por cromatografía de intercambio aniónico y filtración por geles	60
4.8.4.1. Determinación de azúcares totales	61
4.8.4.2 Determinación de los hidratos de carbono por cromatografía gaseosa	61
4.8.4.2.1. Hidrólisis ácida	61
4.8.4.2.2. Preparación de los aldononitrilos peracetilados	62
4.8.4.2.3. Sistema cromatográfico	62
4.8.5. Análisis de hidratos de carbono por cromatografía gaseosa – espectrometría de masas (CGL-MS)	62
4.8.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida	63
4.8.6.1. Preparación de los reactivos	63
4.8.6.2. Procedimiento de preparación de los geles	65
4.8.6.3. Preparación de las muestras	65
4.8.6.4. Condiciones de la corrida	66
4.8.6.5. Coloración de los geles para la localización de las proteínas	66
4.8.6.6. Coloración de los geles para la localización de los hidratos de carbono	67
4.8.6.7. Tinción de los geles con plata	67





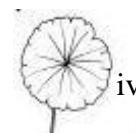
4.8.7. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el análisis de las fracciones del extracto acuoso	68
4.9. Actividades biológicas	69
4.9.1. Toxicidad aguda	69
4.9.2. Actividad antiinflamatoria	70
4.9.2.1. Edema plantar inducido por carragenina	70
4.9.2.2. Edema en oreja de ratón inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)	71
4.9.3. Actividad antioxidante	72
4.9.3.1. Determinación de actividad eliminadora del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH)	73
4.9.3.2. Determinación de actividad superóxido dismutasa (SOD)	74
4.9.3.3. Determinación de la capacidad reductora	75
4.9.3.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la peroxidación de los fosfolípidos del huevo	76
4.9.4. Actividad sobre la proliferación celular	77
4.9.4.1. Metodología	78
4.9.4.2. Determinación del efecto sobre la proliferación celular	79
4.9.4.3. Determinación del efecto sobre la viabilidad celular	80
4.9.4.4. Determinación de nitritos totales	81

### **Tercera Parte**

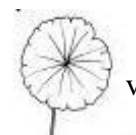
### **Resultados y Discusión**

### **Capítulo 5 - Estudio Químico**

5.1. Extracción general y rendimientos	84
5.2. Fraccionamiento y análisis de los extractos orgánicos	85
5.2.1. Fraccionamiento y análisis del extracto acetato de etilo	86



5.2.2. Espectroscopía de absorción UV-Vis	88
5.2.3. Fraccionamiento y análisis del extracto de metanol	96
5.3. Análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD)	101
5.4. Análisis de saponinas en un extracto de metanol y en la infusión	105
5.5. Estudio de la infusión	108
5.5.1. Estudios preliminares	109
5.5.2. Fraccionamiento de la infusión	109
5.5.3. Análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-page)	112
5.5.4. Fraccionamiento secuencial de la infusión y de las aguas de diálisis	113
5.5.5. Fraccionamiento de los polisacáridos del dializado (Id) por cromatografía de intercambio aniónico y filtración por geles	114
5.5.6. Análisis de la constitución de los polisacáridos del dializado (Id) por cromatografía gaseosa	116
5.5.7. Análisis de hidratos de carbono por cromatografía gaseosa – Espectrometrías de masas (CGL – MS)	119
5.5.8. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el análisis de las fracciones del extracto acuoso	122
<b>Capítulo 6 - Actividad Biológica</b>	
6.1. Toxicidad aguda	129
6.2. Actividad antiinflamatoria	129
6.3. Participación de derivados fenólicos en la actividad antiinflamatoria y antioxidante	133
6.4. Actividad antioxidante	134
6.4.1. Actividad inhibitoria de la peroxidación de fosfolípidos del huevo	134
6.4.2. Actividad sobre la proliferación celular	137
6.4.3. Determinación del efecto sobre la viabilidad celular	139



6.5. Actividad antiinflamatoria: participación de los hidratos de carbono	141
6.6. Actividad antioxidante: participación de los hidratos de carbono	142
6.6.1. Determinación de la actividad eliminadora del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH)	143
6.6.2. Determinación de actividad superóxidodismutasa (SOD)	144
6.6.3. Determinación de la capacidad reductora	146
6.7. Actividad antiproliferativa	148
6.8. Efecto sobre células del sistema inmune	150
<b>Cuarta Parte - Conclusiones</b>	
<b>Capítulo 7 - Conclusiones</b>	160
<b>Bibliografía</b>	165
<b>Resumen</b>	177



*Primera Parte*

*Introducción y Objetivos*

## *Capítulo 1*

# *Antecedentes generales*

## **1.1. Algo de historia**

Desde los primeros tiempos, la vida del hombre está íntimamente unida al ambiente que habita y sus recursos naturales, en particular a los vegetales. Las plantas son indispensables para la supervivencia del hombre,

obligado a emplearlas, seguramente primero en una suerte de “*prueba y error*”, para luego ir distinguiendo aquellas que modificaban su salud, que eran beneficiosas, que les aportaban alimento, de otras que resultaban tóxicas (Treasse Evans, 1991).

Los pueblos primitivos fueron adquiriendo información sobre las propiedades medicinales de plantas propias de su ambiente, desarrollando el conocimiento sobre la existencia de sustancias con efectos farmacológicos en la naturaleza. Conocimientos acumulados generalmente por determinados individuos como sacerdotes, hechiceros, curanderos, shamanes, se han ido transmitiendo de generación en generación, a aprendices y sobre todo a sus descendientes.

En la Biblia están descriptas unas 200 plantas medicinales y sus aplicaciones. El papiro de Ebers, escrito hace unos 3500 años, describe enfermedades e indicaciones para tratarlas con plantas entre las que se ha identificado la *Scilla maritima*, que luego empleaba Hipócrates, quien además conocía los usos del ajeno, la cicuta, el beleño, el ruibarbo y la manzanilla. Teofrasto, discípulo de Aristóteles, en el año 372 a. de C., escribió libros donde mencionaba los usos de la canela, del cornezuelo del centeno, el apio y el helecho macho. Dioscórides, en el año 77 a. de C., escribió “*De materia médica*”, obra cumbre en Botánica y Farmacia, en la que menciona todas las plantas y medicinas conocidas por los griegos. Galeno (131-200, d. de C.), farmacéutico y médico griego, escribió libros sobre medicina y farmacia, indicando empleo y adulteraciones de las plantas medicinales.

China, India y Japón, han dejado información escrita sobre la flora medicinal, mientras que la mayoría de los conocimientos africanos sobre plantas medicinales, continúan transmitiéndose verbalmente al igual que ocurre con los



conocimientos de muchos pueblos originarios de América. Es así que los conocimientos transmitidos por las comunidades nativas a misioneros y a viajeros españoles y de otros territorios, permitió difundir el conocimiento de especies autóctonas (Domínguez, 1979).

Las plantas medicinales son la fuente más antigua de drogas para tratar las enfermedades humanas y en la actualidad ofrecen una perspectiva muy interesante para la Industria Farmacéutica, ya que constituyen una fuente de novedosas moléculas bioactivas, aún poco explotada. La búsqueda de nuevos fármacos a partir de plantas medicinales cobra nuevamente importancia, gracias al desarrollo de nuevos métodos de screening y al avance que se ha desarrollado en los sistemas de cromatografía y de espectroscopía, lo cual es fundamental para el aislamiento, la identificación y la determinación estructural de compuestos (Schenkel, 2000).

En Argentina existen numerosas especies vegetales que se utilizan desde tiempos inmemoriales en el tratamiento de diferentes afecciones, habiéndose transmitido de generación en generación en los pueblos originarios y posteriormente también hacia los inmigrantes. No obstante, la mayor parte del uso es empírico y son aún escasos los estudios que validen científicamente su uso. Por ello resulta muy importante ampliar los conocimientos de las especies de la flora medicinal argentina, buscando alcanzar justificaciones científicas a sus usos tradicionales y contribuir así a un uso seguro y racional.

En este contexto, con el objetivo de brindar un aporte significativo desde el área de Farmacognosia al conocimiento integral de una especie, buscando contribuir a la validación y prospección del recurso mediante aportes biotecnológicos, partiendo de saberes tradicionales, hemos seleccionado entre las plantas medicinales autóctonas, a *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae).

Cabe destacar que, al inicio de esta tesis, la especie formaba parte de la familia Apiaceae. Sin embargo, actualmente ha sido incluida en las Araliaceae, por lo que a continuación se describirán aspectos de esta última familia.



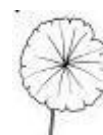
## 1.2. Familia Araliaceae

Araliaceae pertenece al orden Apiales (Laboratorio de Sistemática de Plantas vasculares, 2017). La **Figura 1.1** muestra algunas especies de importancia medicinal.



**Figura 1.1.** Plantas medicinales de la familia Araliaceae. Superiores: *Hedera helix*, *Schefflera arboricola*, *Centella asiatica*. Inferiores: *Panax notoginseng*, *Panax ginseng*.

Algunas de las sinapomorfías del orden son: plantas leñosas; hojas con nerviación pinnada, márgenes dentados o lobados; inflorescencia terminal, paniculada; plantas dioicas; pedicelos articulados; flores pequeñas; cáliz pequeño; corola aparentemente libre; androceo libre de la corola; gineceo





gamocárpelar 3 carpelos, carpelo abaxial fértil; óvulos 1-2/carpelo, apicales; fruto drupa uni-seminada; endosperma nuclear (Laboratorio de Sistemática de Plantas vasculares, 2017).

Esta familia incluye aproximadamente 43 géneros y 1450 especies. En Argentina han sido descritos 7 géneros con 31 especies (Fiaschi, 2008).

Géneros importantes: *Schefflera* (600), *Polyscias* (200), *Oreopanax* (90), *Hydrocotyle* (80), *Aralia* (68) (Laboratorio de Sistemática de Plantas vasculares, 2017) (**Figura 1.1**).

### **1.2.1. Distribución y hábitat**

Es considerada cosmopolita, la mayoría de las especies habitan en zonas tropicales húmedas; algunas se desarrollan en regiones secas con marcada estacionalidad, así como en las zonas templadas de ambos hemisferios (**Figura 1.2**).



**Figura 1.2.** Distribución mundial de la Familia Araliaceae. (Fuente: Izcoy col., 1998).



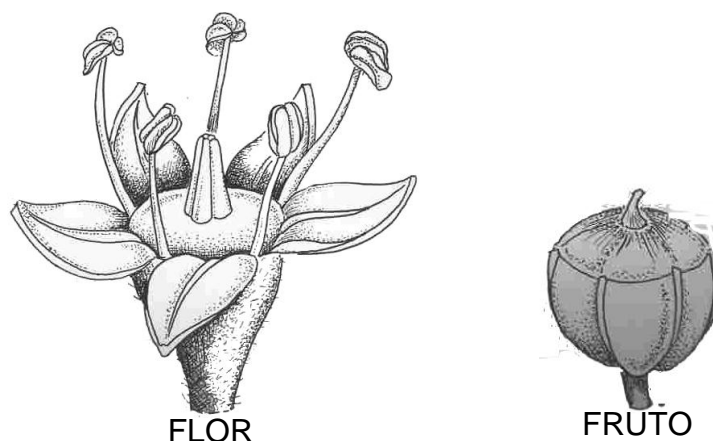
Generalmente se las encuentra en ambientes montañosos, aunque han sido encontradas desde el nivel del mar hasta elevaciones de 4000 metros.

### 1.2.2. Características morfológicas de la familia Araliaceae

**Porte:** está representada por árboles, arbustos, hierbas (ej. *Hydrocotyle*) o lianas (ej. *Hedera*), epífitos y hemiepífitos; ocasionalmente aromáticas, las ramas al estrujarlas desprenden un olor característico a zanahoria. Con o sin estípulas, éstas son generalmente intrapeciolares.

**Hojas:** alternas o mucho más raramente opuestas o verticiladas, pinnadas a palmati-compuestas; simples redondeadas-peltadas con margen crenado en *Hydrocotyle*.

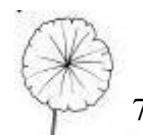
**Flores:** agrupadas en inflorescencias tipo umbela simple o compuesta, menos frecuente en glomérulos. Flores nada o poco vistosas, generalmente perfectas, actinomorfas, diclamídeas o raramente monoclamídeas (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3.** Partes morfoanatómicas de las Araliaceae (Fuente: Flora Ilustrada de Entre Ríos, Argentina, 2005).

**Perianto:** cáliz generalmente poco desarrollado y pentámero, dialisépalo; corola (3-)5(-12)-mera, dialipétala, raramente gamopétala.

**Androceo:** con numerosos estambres.



**Gineceo:** ovario ínfero o más raramente súpero, (1-)2-5(pluri-)carpelar, (1-)2-5(pluri-)locular, placentación péndula, lóculos uniovulados, más raramente biovulados.

**Frutos:** drupa o baya, raramente esquizocárpico (López, 1993) (**Figura 1.3**).

### **1.2.3. Especies medicinales destacadas de la familia Araliaceae**

A nivel mundial, Araliaceae tiene importancia por la obtención del ginseng y otros productos medicinales.

Existen muchas otras especies importantes por su uso ornamental, tanto como plantas de interior como de jardín. Se puede ver cultivadas especies arbóreas y arborescentes de los géneros *Aralia*, *Cussonia*, *Kalopanax*, *Meryta*, *Oreopanax*, *Polyscias*, *Pseudopanax*, *Schefflera*, *Tetrapanax*, *Trevesia* (López, 1993).

De todas las especies, a continuación, en este capítulo de la tesis se describirán aspectos relacionados con aquellas de mayor importancia medicinal que corresponden a géneros distintos de *Hydrocotyle*.

#### **1.2.3.1. Ginseng sp.**

El ginseng es una planta medicinal que se ha utilizado durante mucho tiempo en Oriente, particularmente en Corea y China para mantener la vitalidad física.

Era empleado principalmente como tónico para vigorizar los cuerpos débiles, pero raramente como medicina curativa. A pesar de ello, de acuerdo con el Bancao Gangmu (Encyclopedia of Herbs) escrito por Li Shizhen en China, en 1596 a. de C., se incluyó como ingrediente para curar 23 enfermedades. También, se incluyó en 653 de un total de 3944 recetas en Donggeui Bogam (Korean Clinical Pharmacopoeia), escrita por el herborista coreano Huh Joon, en 1610 a. de C.

La denominación genérica de *Panax* formada a partir de vocablos griegos pan (todo) y akos (remedio), significa “curar a todos”.



El ginseng es una pequeña planta herbácea con hojas palmati-lobuladas, umbelas de flores blancas y bayas rojas, perenne de hoja caduca.

La droga está constituida por la raíz desecada; se encuentra codificada en la Farmacopea Francesa (10° ed.) desde 1989. Esta raíz, fusiforme o cilíndrica, frágil y de pequeña densidad, es más o menos ramificada, a veces arqueada e incluso recurvada sobre sí misma.

Tradicionalmente, el ginseng “blanco” es la raíz lavada, desprovista de raíces secundarias, desecada al sol o en hornos y generalmente pelada; el ginseng “rojo” debe su color pardo-rojizo a un calentamiento previo en estufa.

La raíz presenta forma de hombre y se cree que encarna sus tres esencias (cuerpo, mente y espíritu); se conoce como el señor o rey de las hierbas (**Figura 1.4**) (Taik-Koo, 2001; Bruneton, 2001).

Se han descrito 13 especies de ginseng (Taik-Koo, 2001):

1. *Panax ginseng* C.A. Meyer (Korean ginseng). Radix. En 1833 se denominó *Panax schinseng* Nees por el botánico alemán Nees van Esenbeck; posteriormente, en 1843 fue renombrado por el científico ruso Carl Anton Meyer. Su distribución geográfica, abarca regiones de montaña de China (Manchuria), la República Popular Democrática de Corea, Japón, la República de Corea y la Federación de Rusia (Siberia oriental). Se cultiva en Corea, Japón, China, Rusia y Alemania (**Figura 1.5**). (WHO, 1999, Vol. 1)
2. *Panax japonicus* C. A. Meyer (Japanese ginseng) ginseng japonés cultivado en Japón.
3. *Panax major* Ting.
4. *Panax notoginseng* (Burkill) F.H. Chen, Sanchi ginseng crece en China provincial de Yunnan.
5. *Panax omeiensis* J. Wen.
6. *Panax pseudoginseng* Wallich cultivado en Nepal y en el Himalaya oriental.



7. *Panax quinquefolius* L. (American ginseng) ginseng americano; conocido como *Aralia canadensis*, que se encuentra en el sur de Canadá y los Estados Unidos de América, de Maine a Minnesota, del sur a Florida y del oeste a Oklahoma.

8. *Panax sinensis* J. Wen.

9. *Panax stipuleanatus* H.T. Tsai & K.M. Feng.

10. *Panax trifolius* L. (Dwarf ginseng) ginseng enano, encontrado desde Nueva Escocia a Wisconsin y más al sur.

11. *Panax wangianus* Sun.

12. *Panax zingiberensis* C.Y. Wu & K.M. Feng.

13. *Panax vietnamensis* Ha et Grushv (Vietnamense ginseng).



**Figura 1.4.** *Panax ginseng* C.A. Meyer fresco con forma de persona. (Fuente: Taik-Koo, 2001).

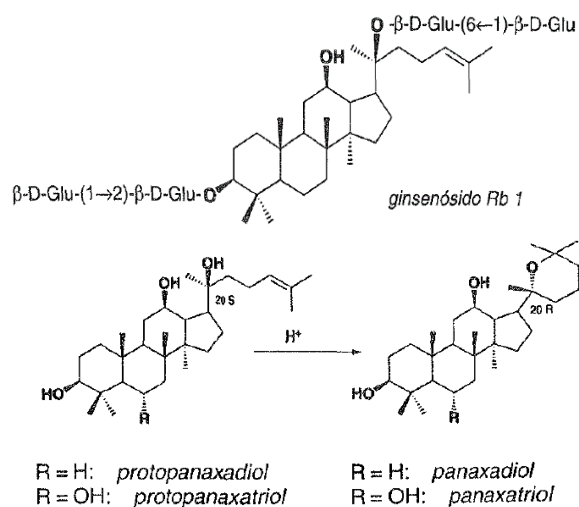
En la raíz, se han caracterizado numerosos compuestos: polisacáridos, glicopéptidos (panaxanos), vitaminas, esteróles, aminoácidos y péptidos, aceite esencial, pollinos (panaxinol, panaxitriol). Los principales constituyentes químicos son las saponinas triterpénicas. Mayoritariamente son glicósidos de geninas tetracíclicas de la serie del damarano. y uno (ginsenósido Ro) deriva del ácido oleanólico. Las saponinas de damarano son derivados de protopanaxadiol o protopanaxatriol. Los miembros del grupo anterior incluyen ginsenósidos Ra1-3, Rb1-3, Rc, Rc2, Rd, Rd2 y Rh2; (20S) -ginsenósido Rg3; y malonil ginsenósidos Rb1, Rb2, Rc y Rd. Los considerados más importantes son los ginsenósidos Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rf, Rg1 y Rg2; Rb1, Rb2 y Rg1 son los más abundantes. (**Figura 1.5**). (WHO, 1999, Vol. 1)

El contenido en saponósidos de la raíz de ginseng de Corea puede variar entre el 1 y el 3%, y los saponósidos Rb1, Rb2 (dioles), Rg1 (triol) y Rq (oleanano) son generalmente los más abundantes (Bruneton, 2001).

Existen diferencias cuantitativas y cualitativas en el contenido total de ginsenósidos, entre especies diferentes, por ej. en *Panax quinquefolius* es mayor que en *Panax ginseng* mientras que los ginsenósidos Rf y Rg2 están ausentes en *P. quinquefolius*. Por otro lado, 24 (R) –pseudoginsenósido F11 es encontrado en *P. quinquefolius*, pero no en *P. ginseng*. (WHO, 1999, Vol. 4)

El ginseng ha sido calificado como planta adaptógena, es decir, capaz de estimular la resistencia no específica del organismo en situaciones de sobre esfuerzo. La clasificación de una droga como adaptógena implica su acción sobre diferentes órganos y sistemas: estimula el sistema nervioso central con efecto tónico general, incrementa la resistencia inespecífica a las enfermedades junto con una acción antiestrés y posee efectos sobre el corazón, el aparato gastrointestinal, el metabolismo y la sangre (Villar y col., 2003). La raíz de ginseng posee un efecto estimulante sobre el SNC, aumenta la resistencia a la fatiga y al estrés, mejora la memoria y tiene un efecto anabolizante (Bruneton, 2001).





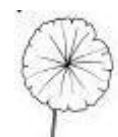
**Figura 1.5.** Partes aéreas de *Panax ginseng* y estructuras de los principales ginsenósidos (Fuente: Villar y col., 2003; Bruneton, 2001).

### 1.2.3.2. Ginseng siberiano: *Eleutherococcus senticosus*

Entre las especies vegetales consideradas como adaptógenas, se encuentra la denominada ginseng siberiano o ginseng ruso, cuyo nombre botánico es *Eleutherococcus senticosus* (= *Acanthopanax senticosus* (Rupr. & Maxim.) Harms, *Hedera senticosa*, perteneciente a la familia Araliaceae.

El eleuterococo, como es denominada vulgarmente el *Eleutherococcus senticosus*, es una especie originaria de Asia, especialmente abundante en el este de Siberia, aunque se distribuye también por China, Corea y Japón. Se trata de un arbusto o matorral robusto, espinoso, de 4 a 6 m de altura, con hojas palmeadas, pequeñas flores dispuestas en umbelas y cuyos frutos son drupas muy oscuras. Las flores y frutos se parecen a los de la hiedra. Las raíces son cilíndricas y nudosas, de entre 0,3 a 1,5 cm de diámetro y rectas o raramente ramificadas, con la superficie de color pardo muy oscuro. Los rizomas, también nudosos, son cilindros irregulares de 1,5 a 4 cm de diámetro, con la superficie de color pardo grisáceo. (**Figura 1.6**) (Davydov y col., 2000).

La composición química del eleuterococo es muy compleja. Su raíz contiene vitaminas, carotenos, lípidos, polisacáridos, cumarinas, ácidos fenólicos,



lignanos, esteroides, etc. Una mezcla compleja de derivados de fenilpropano de estructura diversa y varios polímeros de azúcar, son los componentes responsables de los efectos biológicos característicos de eleuterococo. Los principios activos se denominan genéricamente eleuterósidos. (WHO, 2004, Vol. 2).



**Figura 1.6. Partes aéreas y raíz de *Eleutherococcus senticosus*** (Foto: Alchetron Photo Gallery)

### **1.2.3.3. *Hedera helix***

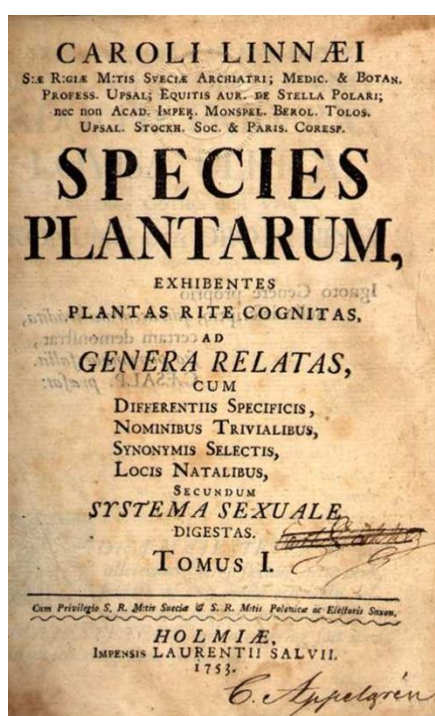
*Hedera helix* L. descrita por Carlos Linneo y publicada en *Species Plantarum* 1: 202. 1753 (**Figura 1.7**), conocida como hiedra, se cultiva ampliamente para recubrimiento de muros, más o menos expuestos según las distintas variedades, o en macetas o para revestimiento de suelo (Lahitte y col., 2000; Fiaschi, 2008).





Es una planta muy común que crece hasta 1200 m de altitud en bosques, setos y zonas rocosas frescas, buscando zonas umbrías o casi umbrías.

Posee tallos sarmentosos tendidos y radicales o trepadores y provistos de ganchos. Las hojas caulinares están divididas en 3 a 5 lóbulos triangulares (8 - 10 x 10 -12 cm) mientras que las de las ramas floríferas heliófilas son ovales y enteras (6 - 8 x 4-6 cm). Las flores se encuentran agrupadas en umbelas terminales, los frutos son bayas globulosas negruzcas con un círculo en su ápice (**Figura 1.7**).



**Figura 1.7.** Portada de la obra de Linneo *Species Plantarum* (1753), La primera flora de la taxonomía moderna.

Las hojas proporcionan esteroides, una pequeña cantidad de productos hidrodestilables (germacreno B, címenos), flavonoides, faltarinol, faltarinona, 11,12-dehidrofaltarinol. El contenido en saponósidos varía del 5 al 8 %. Estas hederasaponinas (B a I) son bidesmósidos del ácido oleanólico, de la hederagenina (hidroxilada en C-23) o de la bayogenina (dihidroxilada en C -2P



y C-23). La hederasaponina C (= hederacósido C) es muy mayoritaria y su contenido varía según la estación del 5 al 7 %.



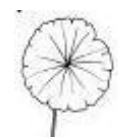
**Figura 1.7.** *Hedera helix* L. (Foto: J.F. Pensiero jfpensi@fca.unl.edu.ar).

Los preparados a base de hiedra se utilizan principalmente en productos cosméticos: cremas, lociones, champús, preparaciones “anticelulíticas”.

El extracto del leño de hiedra, considerado tradicionalmente como expectorante, utilizado por vía oral, en el tratamiento sintomático de la tos y en afecciones bronquiales agudas benignas.

El extracto de las hojas es también citotóxico y antibacteriano. Los saponósidos de las bayas son moluscicidas.

En uso tópico, las hojas se emplean tradicionalmente como coadyuvante en regímenes adelgazantes y como tratamiento suavizante y antipruriginoso en afecciones dermatológicas, como trófico protector en el tratamiento coadyuvante de grietas, excoriaciones, cortaduras y contra las picaduras de insectos (Bruneton, 2001).



## *Capítulo 2*

# *Antecedentes de Hydrocotyle*

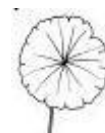
## **2.1. Género *Hydrocotyle***

Muchos autores han considerado las familias dicotiledóneas, Apiaceae y Araliaceae como estrechamente relacionadas. La primera clasificación donde se destacaron los caracteres morfológicos de *Hydrocotyle* la hizo Tournefort en 1694, cuando incluyó al género por primera vez dentro de las Umbelíferas, teniendo como base caracteres de la inflorescencia, la flor y la morfología del fruto (Arenas, 1993). El género *Hydrocotyle* se consideraba dentro de la familia Apiaceae y formaba parte de las Umbelliferae, en la subclase Rosidae (Cronquist, 1981; Plunkett 2004)

En el sistema de Engler Diels de 1936, al que se adscriben las floras regionales de Argentina y al que hacen referencia en las clasificaciones taxonómicas numerosos herbarios, siempre se ha considerado a las Araliaceae como muy próximas a las Umbelliferae. En la actualidad, *Hydrocotyle* se incluye dentro de la familia Araliaceae.

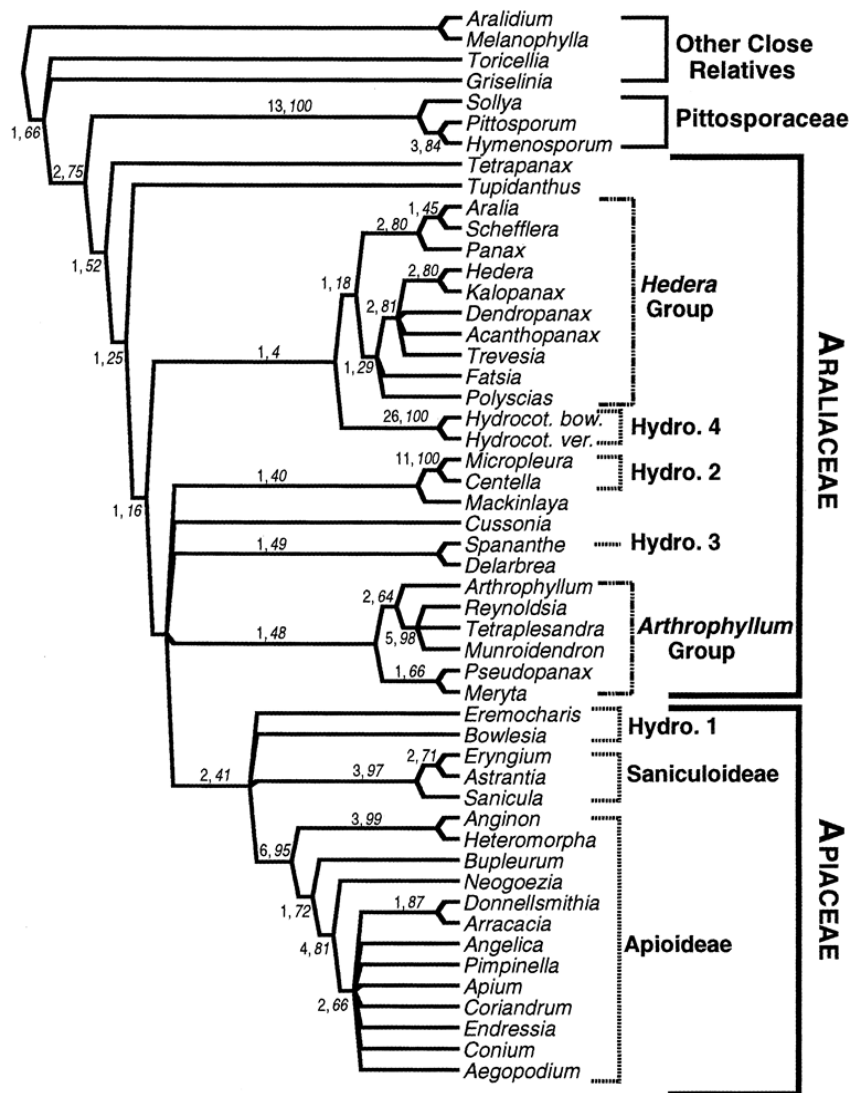
El orden de angiospermas de Apiales ha tenido una larga historia taxonómica, y la relación entre las dos familias constituyentes, Apiaceae y Araliaceae, ha resultado difícil de dilucidar utilizando los caracteres taxonómicos tradicionales. (Chandler, 2004). Las apiaceas son en su mayoría de clima templado y herbáceo, mientras que las araliaceas son en su mayoría tropicales y leñosas (Plunkett y col., 1996), sin embargo, hay pocos caracteres definitorios que se pueden usar para distinguir estas dos familias y muchos taxones poseen una combinación de características consideradas típicas de cada familia lo que lleva a algunos autores a unir Apiaceae y Araliaceae en una sola familia (Thorne, 1968).

Dentro de Apiaceae, el sistema de Drude (1898) es el más comúnmente empleado, en el cual la familia se divide en tres subfamilias: Apioideae, Saniculoideae e Hydrocotyloideae. Estudios filogenéticos, particularmente aquellos basados en datos moleculares, han coincidido en que la subfamilia hidrocotiloidea es polifilética y que varios géneros incluidos tradicionalmente en



esta subfamilia, parecen estar más estrechamente relacionados con Araliaceae (Figura 2.1) (Plunkett y col., 1996; Plunkett y col., 1997; Chandler y col., 2004).

De acuerdo a esto, Plunkett y col. (2004) dividieron las Hydrocotyloideas en tres grupos: Araliaceae (a donde fueron transferidos *Hydrocotyle* y *Trachymene*.) y dos nuevas subfamilias en Apiaceae que son: *Azorelloideae* y *Mackinlayoideae*.



**Figura 2.1** Arbol filogenético, esquema arbóreo que muestra las relaciones evolutivas entre las familias Apiaceae y Araliaceae. (Fuente: Plunkett y col., 1996)



Tal como ha ocurrido con otras especies, gracias a dichos estudios moleculares, se han producido modificaciones taxonómicas. En el caso de *Hydrocotyle*, pasaron a considerarlo perteneciente a Araliaceae (Figura 2.2) debido a similitudes morfológicas que las vinculan a los miembros de esa familia, así fue descrito por Chandler y Plunkett (2004).

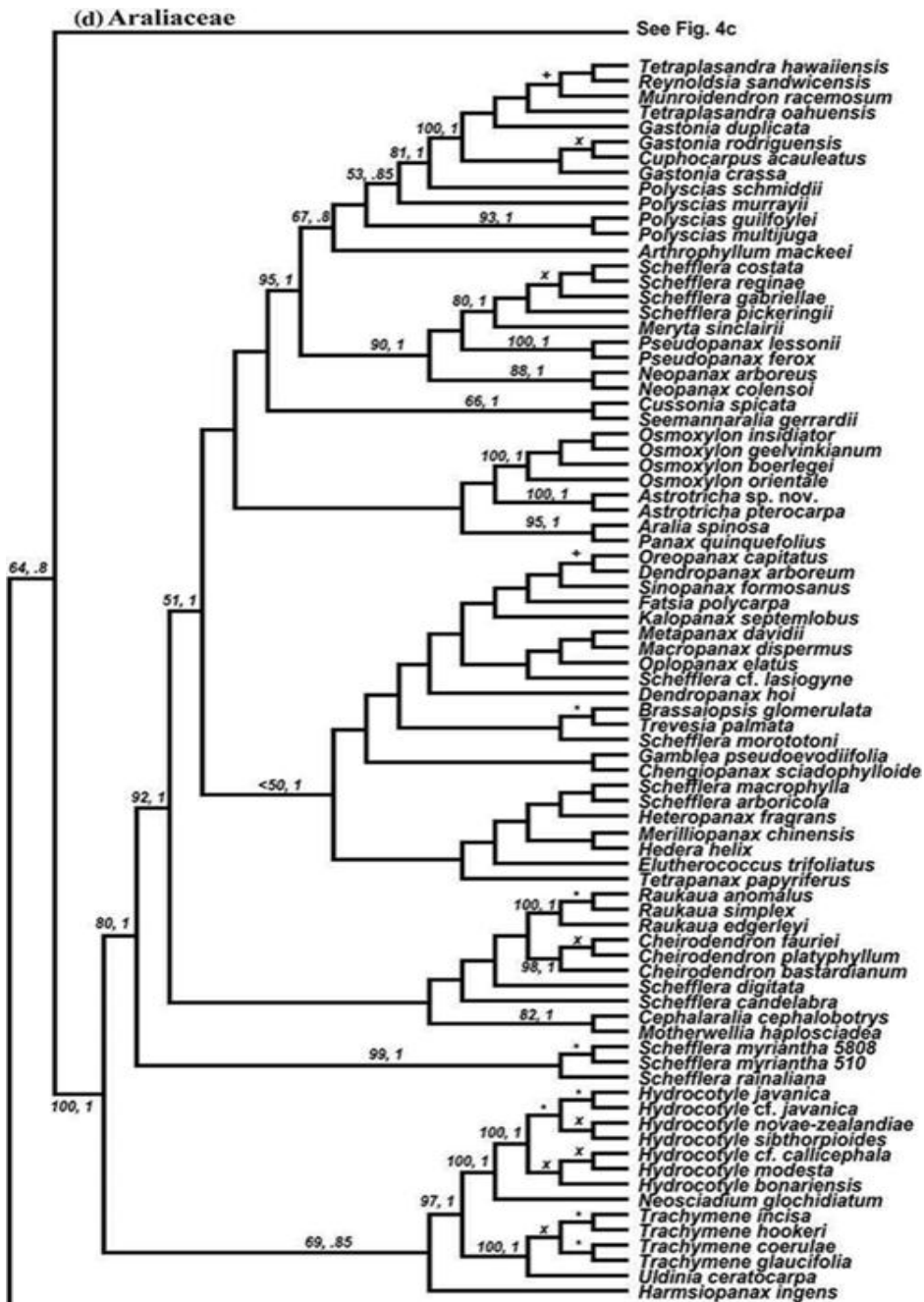


Figura 2.2. Esquema arborescente de algunas especies de la familia Araliaceae (Fuente: Nicolas y col. 2009).



*Hydrocotyle*, género ampliamente distribuido de más de 130 especies con notables variaciones morfológicas tanto dentro como entre las especies (Nicolas y col., 2009). Se reconoce principalmente por presentar hierbas perennes, con tallos radicales en los nudos, hojas generalmente peltadas, estípulas y umbelas multifloras simples o prolíferas; sus frutos son comprimidos lateralmente, con 5 costillas, sin carpóforos y presentan semillas con endospermo leñoso.

En Argentina, particularmente en la provincia de Buenos Aires, crecen varias especies del género *Hydrocotyle* (selvas ribereñas del Delta, del Río de la Plata y en el césped de la ribera platense) (Ratera y col., 1980).

Nombre genérico de 'hidros: agua', en referencia a su hábitat y 'kotyle: recipiente, copa', en alusión a la forma de las hojas umbilicadas en las que se forma una pequeña depresión en el centro.

En el Catálogo de plantas vasculares de Argentina (2018), se describen 13 especies de *Hydrocotyle* distribuidas en el país: *H. bonariensis*, *H. bowlesioides*, *H. callicephalo*, *H. chamaemorus*, *H. cryptocarpa*, *H. exigua*, *H. filipes*, *H. indecora*, *H. leucocephala*, *H. modesta*, *H. pusilla*, *H. ranunculoides*, *H. verticillata* (Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II).

Otras especies del género distribuidas mundialmente son *H. asiatica*, *H. itatiaiensis*, *H. langsdorfii*, *H. poeppigii*, *H. quinqueloba*, *H. sibthorpioides*, *H. umbellata*.

Diversas especies de este género han sido descritas como medicinales. A continuación, se describen usos tradicionales de algunas de ellas:

- ***Hydrocotyle bonariensis***: se destaca su uso tradicional contra los eritemas cutáneos (Lucena y col., 2001).
- ***Hydrocotyle asiatica***: para el tratamiento de úlceras leprosas y desórdenes venosos. (WHO, 1999).



- ***Hydrocotyle ranunculoides***: posee similares usos a *H. bonariensis*. La raíz tiene propiedades diuréticas y desobstruyente del hígado. También se utiliza para enfermedades infecciosas (Lucena y col., 2001).

-***Hydrocotyle leucocephala***: posee diacetilenos inmunosupresores, ceramidas y cerebrósidos que demostraron ser activos en el ensayo de producción de citoquinas inducida por lipopolisacáridos (LPS) para IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ ; por ello tendría un potencial uso en el tratamiento de la artritis reumatoidea (Ramos y col., 2006).

- ***Hydrocotyle sibthorpioides***: demostró actividad antitumoral en ratas (Yu y col., 2007) y efecto protector en el daño hepático y la fibrosis inducida por la ingesta crónica de alcohol en ratas (Huanga y col., 2013).

- ***Hydrocotyle umbellata***: ha demostrado tener efecto ansiolítico y sedante en ratones (Rocha y col., 2011).

Teniendo en cuenta la distribución regional, el uso medicinal y la relación taxonómica con la **centella asiática**, planta medicinal ampliamente utilizada, para este trabajo de tesis se seleccionó a *H. bonariensis*. A continuación, se destacan aspectos y antecedentes en el conocimiento biológico y tradicional de ambas especies.

### **2.1.1. *Hydrocotyle asiatica* (L.) Urban**

*Hydrocotyle asiatica* (L.) Urban llamada comúnmente centella asiática, gotukola, gotukola, hidrocotile, Indian pennywort, water pennywort, herba pegagan, es una especie cuyos usos tradicionales fueron motivo de importantes investigaciones que han llevado a su validación como medicinal (Lucena y col., 2001; WHO, 1999)

También se la llamó “hierba del tigre” porque, según la leyenda, el famoso tigre de Bengala curaba sus heridas revolcándose sobre esta planta y lamiéndolas con la saliva impregnada de su jugo. La evidencia científica de su uso tradicional contra la lepra fue notificada por primera vez por el Dr. Boileau en





1852. Este médico, que residía y trabajaba en la India, había contraído hacía algunos años una forma de lepra y decidió experimentar en sí mismo con centella asiática, resultando así su recuperación. Esta experiencia fue publicada y a partir de este momento, entre 1853 y 1855, se realizaron diversos estudios en India, Francia y España (Alonso, 2009; Vanaclocha, 2003).

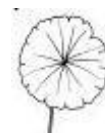
En el siglo XIX se incluyó en la farmacopea de la India, en la francesa apareció en 1884, mismo año que en el Codex, y posteriormente en las farmacopeas de todo el mundo. En la actualidad su monografía está incluida también en European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) y en las elaboradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Es una planta exótica originaria de zonas subtropicales de la India, distribuida en las costas del Océano Indico hasta Madagascar e Indonesia.

La planta es originaria de las regiones más cálidas de ambos hemisferios, incluyendo África, Australia, Camboya, América Central, China, Indonesia, la República Democrática Popular Lao, Madagascar, las Islas del Pacífico, Tailandia, el sur de los Estados Unidos de América, Vietnam y América de Sur (donde se distribuye en el Sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y norte de Argentina).

Crece espontáneamente en lugares húmedos, orillas de lagunas, zonas pantanosas y regiones propias de climas tropicales y subtropicales, como zonas pantanosas de la India, la República Islámica de Irán, Pakistán y Sri Lanka hasta una altitud de aproximadamente 700 m (WHO, 1999). **(Figura 2.3)**

Es una hierba perenne, de 3-20 cm de altura; tallos rastreros, subterráneos o postrados, rizomatosos o estoloníferos, estriados, glabros o levemente pilosos; entrenudos de 2-10 cm, nudos radicantes de los cuales nacen uno o varios tallos aéreos fértiles y ramificaciones provistas de 2-5 hojas. Escapos más cortos que los pecíolos, densamente revestidos con pelos largos cuando son jóvenes y glabros cuando son adultos. Lámina foliar coriácea a subcoriácea, oval-elíptica, 7-(9)-palmati-nervada, base cordado-emarginada, ápice obtuso a agudo, márgenes crenados, de 1,8-4,5 cm de longitud, ambas superficies



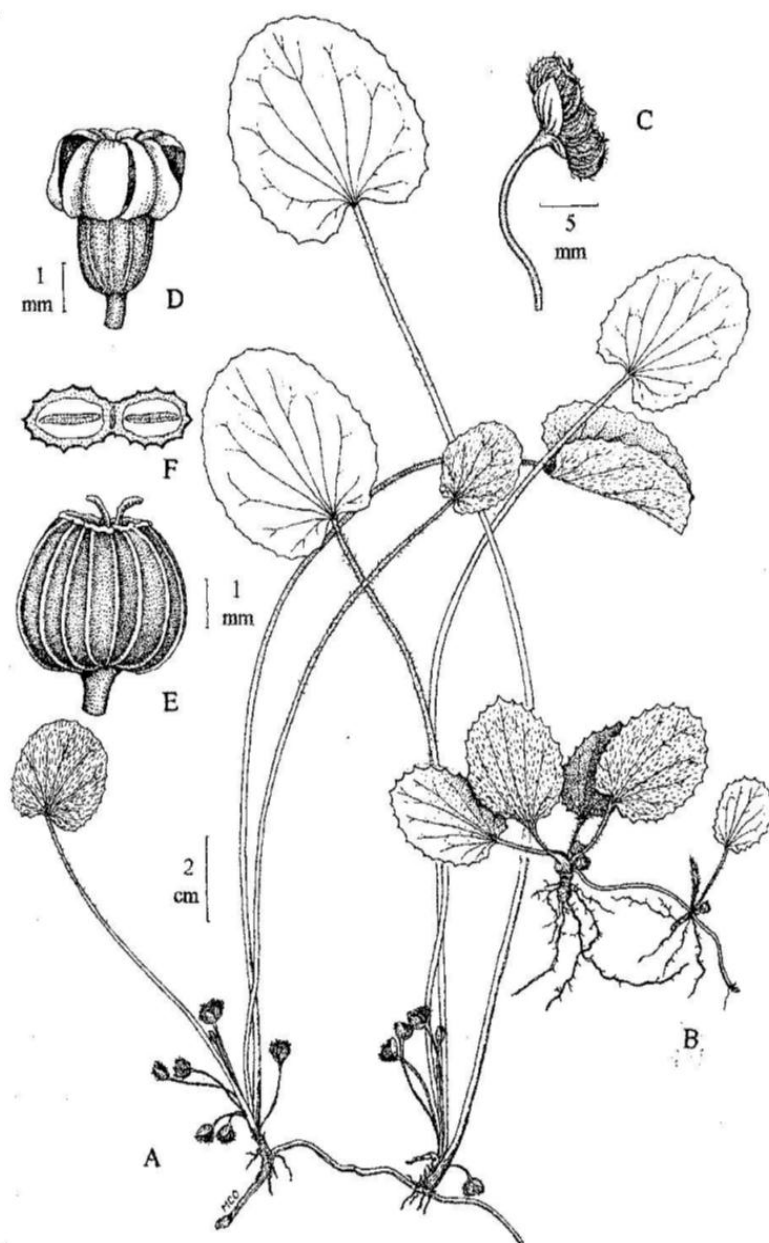
densamente pilosas en hojas jóvenes, en las adultas sólo con pelos en el envés; pecíolo estriado, pubescente, base envainadora, sin estípulas, de 1,8-18 cm, vaina de 2,3-3,0 mm, margen ciliado.



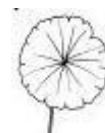
**Figura 2.3.** Distribución geográfica de centella asiática  
(Fuente: Alonso, 2009)

Flores pequeñas, de aproximadamente 2 mm, de color blanco a rosado pálido reunidas en umbelas simples, por lo general en número de 3 a 5 con pedúnculo generalmente corto, de color blanco a rosado pálido. Fruto orbicular, diaquenio, tan ancho como largo, comprimido lateralmente, con 7 nervaduras por mericarpo, pericarpo muy grueso, reticulado, de color pardo oscuro. Semillas comprimidas y pequeñas. (Lucena y col., 2001; Farmacopea Argentina VII Ed. 2013) (**Figura 2.4**).





**Figura 2.4.** Aspectos morfológicos de *Hydrocotyle asiatica* (centella asiática). A y B, formas extremas de plantas creciendo a la sombra y al sol, respectivamente; C, infrutescencia; D, flor; E y F, vista externa y transcorte de fruto. A, C-F, de Novara 10881; B, de Novara 10882. (Fuente: Herbario MCNS. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta).



Se utiliza la planta entera, aunque frecuentemente suele emplearse la parte aérea seca (Alonso, 2004).

Tiende a arrastrarse o trepar gracias a sus tallos a partir de los cuales parten las raíces (**Figura 2.5**).

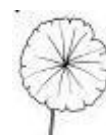


**Figura 2.5.** *Hydrocotyle asiatica* (vista de la planta y ejemplar de herbario) (Fuente: Azis H.A. y col., 2017).

Las plantas medicinales tienen una larga historia terapéutica durante miles de años y todavía se consideran prometedoras.

*H. asiatica*, fue empleada desde hace unos 3000 años en la medicina tradicional hindú y por los indígenas africanos en el tratamiento de la lepra.

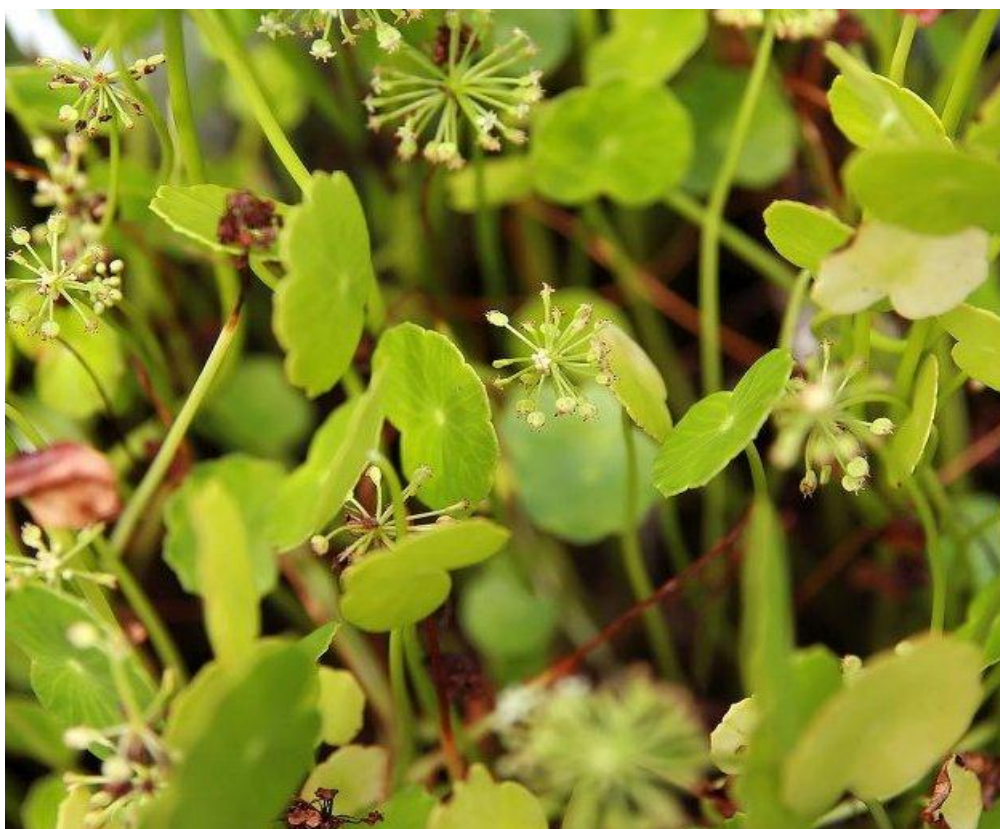
La medicina ayurvédica fue quien difundió sus propiedades desde la India a todo el mundo, indicando su acción en dermatología y como revitalizador psico-físico y purificador de la sangre. Actualmente, es utilizada en el tratamiento de insuficiencia venosa crónica, de microangiopatía diabética y de placas arterioescleróticas por vía oral. Como uso tópico en patologías dermatológicas como cicatrización de heridas y escaras, prevención de estrías del embarazo y psoriasis, úlceras dérmicas, bucales o corneales, blefaritis, conjuntivitis y



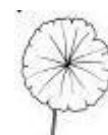
quemaduras (Wagner y col., 2006). Las acciones farmacológicas de la centella se centran en su actividad anticelulítica y estimulante circulatoria.

### **2.1.2. *Hydrocotyle bonariensis* Lam.**

*Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae), es una planta herbácea comúnmente conocida como “redondita de agua”, “paragüita”, “caá hay”, “cucharita”, “oreja de agua”, “tembladerilla”, “perejil de agua”, “sombriilla de sapo”, de amplia distribución en Sudamérica, fundamentalmente en Brasil, Chile, Uruguay y Argentina. La **Figura 2.6** muestra detalles de las partes aéreas de ejemplares en su hábitat.



**Figura 2.6.** Vista de ejemplares de *H. bonariensis*. (Fuente: Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri, USA).



En Argentina es muy frecuente encontrarla en praderas húmedas, pajonales y médanos del este y sur de la provincia de Buenos Aires. Habita en céspedes de parques y jardines, prefiere los suelos arenosos, húmedos y aún anegadizos o pantanosos, sombreados; pajonales y médanos. Vegeta durante todo el año, florece desde mediados de primavera hasta mediados de otoño, se propaga por semillas y rizomas (Cabrera, 1965; Ratera y col., 1980).

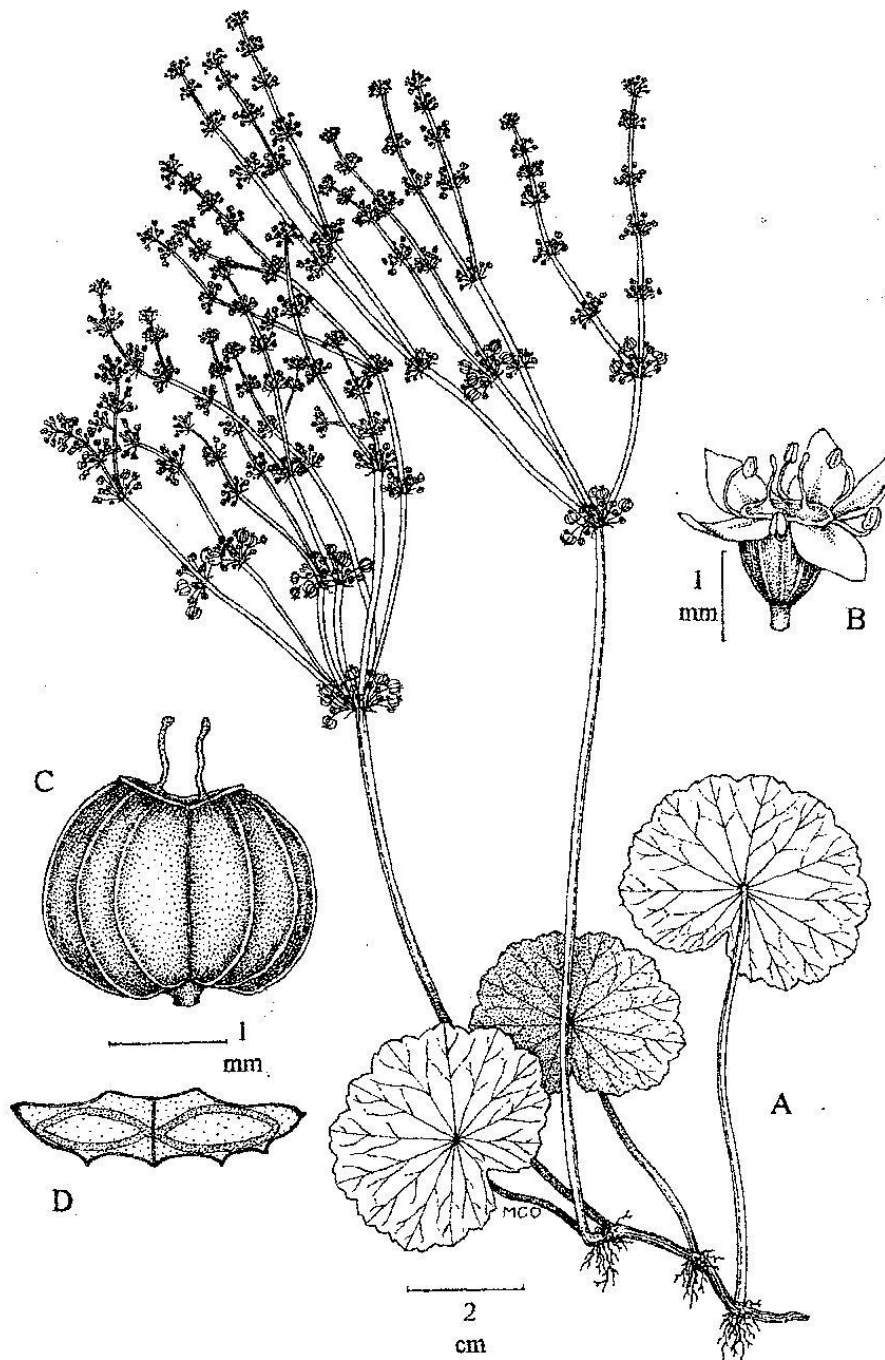
Es una planta perenne, glabra, con tallos delgados, rastreros y hasta subterráneos, radicales, de 2-4 mm de diámetro, emitiendo en cada nudo 1-2 hojas largamente pecioladas, peltadas, con láminas orbiculares, con pecíolo erguido, de 2-10 cm de diámetro. Flores muy pequeñas blanco amarillentas, en umbelas pluriflores, compuestas, con pedúnculo solitario en cada nudo del tallo. Frutos orbiculares, reniformes o elípticos, muy comprimidos lateralmente, de 2 mm de diámetro, emarginados en la base con canales oleíferos rudimentarios y sin carpóforo (Cabrera, 1965; Marzocca, 1997). La **Figura 2.7** presenta aspectos morfológicos.

La especie ha sido empleada antiguamente en América del Sur para tratar los eritemas cutáneos. Sus hojas son administradas bajo la forma de cataplasmas para curar heridas inflamadas e inflamaciones del cutis. De la planta fresca puede destilarse un agua que se usa en cosmética para “borrar” las pecas. El “jugo” se considera emético y hepático.

Las infusiones preparadas con las hojas, sumidades floridas y tallos se usan en medicina popular como diurética, estimulante, emenagoga y antiséptica (Marzocca, 1997; Hieronymus, 1882) (**Figura 2.8**).







**Figura 2.7.** Aspectos morfológicos de *Hydrocotyle bonariensis* Lam.: A, planta fértil; B, flor; C, fruto; D, transcorte del fruto. De Novara 9652. (Fuente: Herbario MCNS. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta).



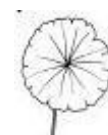


**Figura 2.8.** *Hydrocotyle bonariensis* Lam (Araliaceae). Fotografía tomada durante la colecta efectuada en la costa de Miramar, Buenos Aires, en febrero de 2013.

## **2.2. Fitoquímica y actividades biológicas del género *Hydrocotyle***

Entre las especies vegetales dotadas de propiedades cicatrizantes y antisépticas principalmente, se incluyen plantas de diversos géneros con aceites esenciales como por ejemplo el árbol del té, *Melaleuca alternifolia*, o plantas con taninos y quinonas como el nogal, *Juglans regia*, y otras del género *Hydrocotyle* con otros principios activos como saponinas en la centella asiática, *Hydrocotyle asiatica*.

En este contexto, se describen a continuación antecedentes científicos de *H. asiatica* y de la especie motivo de esta tesis, *H. bonariensis*, en relación a los



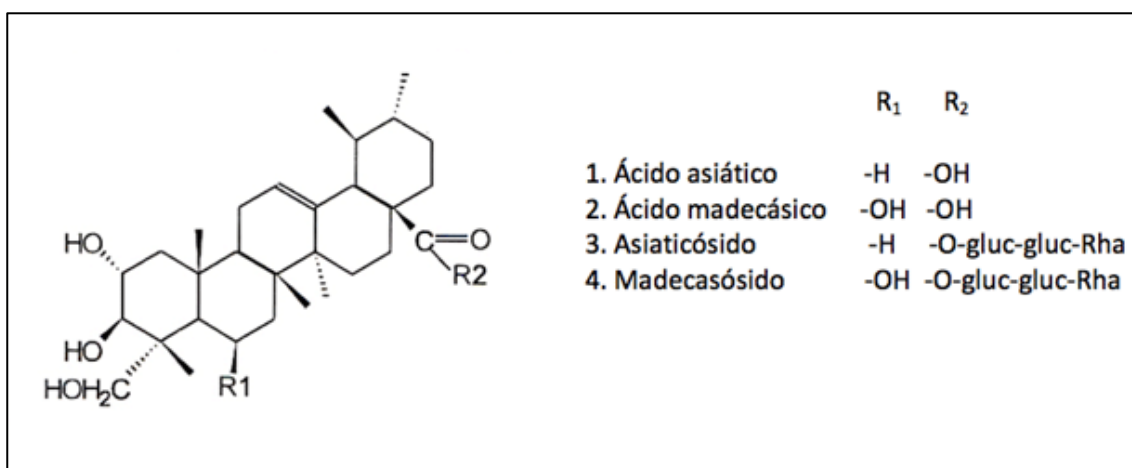


grupos químicos biosintetizados, a las actividades biológicas y a la importancia farmacéutica.

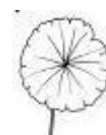
### 2.2.1. *Hydrocotyle asiatica* (L.) Urban

*Hydrocotyle asiatica* (Linn.) Urban es una planta medicinal importante con propiedades rejuvenecedoras, utilizada en la medicina tradicional hindú para promover la vitalidad y la vida. La planta es considerada como una "panacea" para varias enfermedades humanas y las acciones biológicas se han atribuido a sus compuestos, ácidos triterpénicos asiático y madecásico, y sus ésteres glicosídicos o saponósidos, asiaticósido y madecasósido.

Estos principios activos, son saponinas triterpénicas pentacíclicas, que pueden variar del 1 al 8%. Las principales saponinas son el asiaticósido (éster del ácido asiático y un trisacárido) y madecasósido (éster del ácido madecásico y un trisacárido). La cadena trisacárida está constituida por una ramnosa y dos glucosas. Otras saponinas minoritarias son el centellósido, el brahmósido, y las centellosaponinas B, C y D. (WHO, 1999; Sudhakaran, 2017). La **Figura 2.9** presenta las principales estructuras.



**Figura 2.9.** Estructura molecular de los ácidos asiático y madecásico, y sus glicósidos (Fuente: WHO, 1999)



Además contiene abundantes taninos (20-25 %), aceite esencial (0,1 %, con  $\beta$ -cariofileno, trans- $\beta$ -farneseno y germacreno D como compuestos mayoritarios,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno), fitoesteroles (campesterol, sitoesterol, estigmasterol), mucílagos, resina, aminoácidos libres (alanina, arginina, serina, tirosina, prolina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptofano y treonina), flavonoides (quercetina, kaempferol, 3-O-glucosil-quercetina y 3-O-glucosil-kaempferol), ácidos clorogénico y dicafeoilquínico, un alcaloide (hidrocotilina), un principio amargo (vallerina), ácidos grasos (linoleico, linolénico, lignocérico, oleico, palmítico, elaídico y esteárico) (Alonso, 2004; Barnes y col., 2005; Brinkhaus y col., 2000; Vanaclocha y col., 2003; WHO, 1999).

Resulta importante destacar también que ha sido descrito el aislamiento de polisacáridos a partir de la centella. La estructura fundamental constituye un arabinogalactano (AG) altamente ramificado cuya cadena principal contiene  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal, con restos de Ara unidos a la posición 3 de la Gal, restos de  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-GalA y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-Ram (Wang y col., 2004).

Los usos de la *H. asiatica* están relacionados con su alto contenido en geninas y saponinas triterpénicas. Los extractos que contienen saponinas triterpénicas estimulan la biosíntesis de colágeno fisiológico tipo I y tipo III, previniendo así la fibrosis. Estos extractos, regulan los genes asociados a los fibroblastos dérmicos que contribuyen a la cicatrización de heridas, incluyendo a los que están involucrados en la síntesis de la matriz extracelular (Ferraro y col. 2012)

Los extractos de centella y en particular su principal glicósido del éster triterpénico, el asiaticósido, tienen importancia, en el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides. También, se ha informado que el asiaticósido disminuye la fibrosis en las heridas, previniendo así la formación de nuevas cicatrices. Esto se fundamenta en el mecanismo de acción, donde se produce un aumento de la síntesis de colágeno y mucopolisacáridos ácidos y a su vez, una inhibición de la fase inflamatoria de cicatrices hipertróficas y queloides. (WHO,1999). Así como lo describe Vanaclocha en una de sus investigaciones,



(Vanaclocha y col., 2003), el asiaticósido estimula la activación fibroblástica, con lo que tiene un efecto reepitelizante, al estimular la producción de colágeno, una proteína clave en la curación de heridas y también inhibe el proceso inflamatorio que podría provocar hipertrofia en cicatrices.

Estudios *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que los extractos y principios activos de esta planta, tienen actividad antioxidante captadora de radicales libres, así como actividad antiinflamatoria; ambas actividades contribuyen positivamente a la cicatrización. En macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS), inhiben la producción de óxido nítrico (NO) y de factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), siendo el asiaticósido, el saponósido más activo. Igualmente, este compuesto, administrado oralmente a ratas, disminuye el proceso inflamatorio y la fiebre en animales tratados con LPS, probablemente a través de una inhibición en la producción de TNF- $\alpha$ , interleuquina 6 (IL-6) y prostaglandina (PGE2), en la expresión de la ciclooxigenasa (COX-2) y en la actividad mieloperoxidasa. (Carretero Accame, 2013).

También posee efecto astringente por los taninos y efecto antiséptico por los taninos y el aceite esencial.

Los flavonoides y sus derivados constituyen un gran grupo con diversas actividades biológicas dentro de los productos naturales. Estos metabolitos se encuentran en muchos tejidos de vegetales, donde están presentes dentro de las células o en la superficie de diferentes órganos vegetales. La estructura química está basada en un esqueleto de C6-C3-C6 (Bruneton, 2001).

Los flavonoides pueden ser modificados fundamentalmente por hidroxilación, metoxilación, O-glicosilación del grupo hidroxilo o C-glicosilación directamente en un átomo del carbono del esqueleto del flavonoide. Los derivados acilados de glicósidos de flavonoides, con moléculas de ácidos alifáticos o aromáticos, son termolábiles y su aislamiento y posterior purificación sin una degradación parcial es dificultosa. De la multiplicidad de posibles modificaciones en flavonoides, resultan más de 6000 compuestos diferentes que se han conocido



en los últimos tiempos y este número continua en crecimiento (Harborne y Williams, 2000).

El extracto acuoso de *H. asiatica* demostró in vitro una actividad antiproliferativa del crecimiento de queratinocitos, inhibiendo la replicación de los mismos, probablemente este efecto producido se deba a sus dos glucósidos triterpenoides, el madecasósido y el asiaticósido. Estos estudios sugieren el uso de extractos de centella asiática como un agente antipsoriático tópico. (Sampson y col. 2001).

La centella se ha considerado como un agente eficaz en el tratamiento de la psoriasis y como antiinflamatorio. Teniendo en cuenta, la capacidad de los extractos de centella, para normalizar el metabolismo de las células del tejido conectivo, ejercer un efecto antiinflamatorio y drenante y regular la microcirculación, podemos considerarla también eficaz en el tratamiento de la celulitis. (Carretero Accame, 2013).

Las plantas y sus metabolitos pueden ser una fuente importante de compuestos inmunomoduladores novedosos. Desde el punto de vista molecular, los compuestos con actividad inmunomoduladora, pueden pertenecer a cualquier clase química estructural. Se han identificado compuestos activos que pertenecen a los siguientes grupos de sustancias: carbohidratos, terpenos, esteroides, fenoles, cumarinas, aminoácidos, péptidos, proteínas, glicoproteínas.

Los carbohidratos representan un grupo importante de agentes inmunomoduladores. En estudios orientados inmunológicamente, varios polisacáridos, polisacáridos sulfatados, lipopolisacáridos y glicoproteínas han mostrado actividad inmunomoduladora interesante.

Las pectinas son polisacáridos heterogéneos complejos; la pectina aislada de *H. asiatica*, como algunas saponinas demostraron ser inmunoestimulantes de manera activa (Jayathirtha y col., 2004; Wang y col., 2003).



### 2.2.2. *Hydrocotyle bonariensis* Lam.

Como mencionamos en párrafos anteriores, esta especie motivo de esta tesis doctoral, está emparentada con *Hydrocotyle asiatica* y ha sido utilizada popularmente en patologías dérmicas.

Mientras la centella cuenta con numerosos estudios científicos en diversos lugares del mundo, *Hydrocotyle bonariensis* está menos estudiada científicamente desde el punto de vista farmacológico y fitoquímico, aun así, se utiliza popularmente en forma de infusión preparada a partir de la planta, como antiinflamatoria para tratar alteraciones dérmicas de la piel. (Lucena y col., 2001)

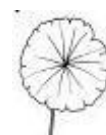
Tempone y colaboradores, 2008, describen la actividad del extracto de metanol de *H. bonariensis* contra *Leishmania amazonensis*, matando al 100% de los promastigotes de *L. chagasi* en su concentración más alta (500 µg / ml). *L. chagasi* es el agente etiológico de la leishmaniasis visceral en Brasil, una enfermedad sistémica que mata al 100% de los pacientes no tratados (Rath y col., 2003).

*H. bonariensis* también presentó una actividad antifúngica marcada contra la cepa *Candida krusei* resistente a FCZ. La candidiasis es una infección por hongos que comúnmente afecta la piel humana. Muchas plantas se han utilizado en la medicina popular para tratar las infecciones por hongos (Lorenzi y col. 2002).

Entre las plantas utilizadas para tratar enfermedades de la piel, *H. bonariensis*, se ha utilizado en medicina popular para tratar la psoriasis, un trastorno inflamatorio de la piel (Natarajan y col., 1973).

Además, es utilizada para el tratamiento de la tuberculosis, aliviando el dolor del reumatismo y artritis, para aumentar la capacidad cerebral y para la longevidad (Masoumian, 2011).

Los flavonoides son una gran familia de metabolitos de plantas secundarias, y están presentes en tejidos de plantas en concentraciones relativamente altas



como conjugados de azúcar y son comunes en hojas, tejidos en floración y pólenes (Anderson y col., 2006). Existen algunos antecedentes de estudios fitoquímicos que describen la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y saponinas como componentes bioactivos (Ajani y col., 2009).

### **2.2.3. Enfermedades inflamatorias de la piel: Psoriasis**

El término psoriasis deriva del griego “psora” = picazón. Hipócrates (460-377 a.C.) mencionó a la psoriasis, aunque su naturaleza no estaba todavía separada de otras afecciones cutáneas, incluida la lepra. Esta confusión duró varios siglos y derivó en que estos pacientes fueran abandonados y separados de la sociedad. El médico griego Galeno de Pérgamo (130-200 a.C.) utilizó la denominación “psoriasis vulgaris” o psoriasis común para incluir todas las dermo y epidermopatías acompañadas de prurito (Buzzi, 2011).

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria de la piel, de etiología desconocida y curso crónico, con gran variabilidad clínica y evolutiva, que se caracteriza por la erupción bilateral y simétrica de placas rojas cubiertas de escamas, bien delimitadas, que son la base del diagnóstico (Grimalt y col., 2002).

La prevalencia es elevada, abarcando entre el 2 y el 5 % de la población, según los distintos países, pudiendo iniciarse a cualquier edad. En el 30-50 % de los casos hay antecedentes familiares de esta enfermedad.

La edad de inicio de la psoriasis y la presencia de antecedentes familiares identifica 2 grupos de curso y pronóstico diferente: la psoriasis tipo I, que se inicia en la infancia tardía o la pubertad, tiene antecedentes familiares y se asocia con clínica más grave, y la psoriasis tipo II, con inicio en la cuarta década, menos intensa y sin tanta predisposición genética.

Actualmente la psoriasis se considera una enfermedad inmunitaria caracterizada por infiltrados de células T y células del sistema inmune innato como neutrófilos, células dendríticas, natural killer y macrófagos. Los linfocitos



T activados actúan regulando un complejo conjunto de reacciones inflamatorias en la piel, que se concretan en dos componentes: por un lado la hiperproliferación de la epidermis, que se renueva a una velocidad mucho mayor de lo normal, junto a una diferenciación alterada, lo que conduce a la aparición de escamas, y por otro, la inflamación de la dermis (Brufau y col., 2010).

Actualmente la psoriasis se considera una enfermedad inmunitaria. Los linfocitos T activados actúan regulando un complejo conjunto de reacciones inflamatorias en la piel, que se concretan en la hiperproliferación de la epidermis, cuyas células no pueden entrar en diferenciación celular, y se renueva a una velocidad mucho mayor de lo normal, lo que conduce a la aparición de escamas, y además promueven la activación de macrófagos que inducen una respuesta inflamatoria de la dermis (Clark y col., 2006; Brufau y col., 2010). Es un hecho conocido que los macrófagos liberan intermediarios proinflamatorios como prostaglandinas (PGs), citoquinas y NO (óxido nítrico), y también son fuente de especies reactivas del oxígeno (EROS), que potencian el efecto sobre la inflamación (Harizi y col., 2011). De todas las células mencionadas son los linfocitos y los macrófagos las que tienen un rol crítico en el desarrollo de la enfermedad.

Entre el 5 y el 40 % de los pacientes con psoriasis desarrollan artritis psoriásica, la cual es una enfermedad crónica y sistémica, autoinmune caracterizada por la presencia concomitante de artritis inflamatoria y psoriasis. Es una enfermedad compleja y multifacética, que la mayoría de las veces presenta también afectación emocional y psicológica de los pacientes; algunos pueden presentar una forma leve de la enfermedad con mínimo compromiso funcional y de la calidad de vida, muy sensible al tratamiento; mientras que otros pacientes pueden desarrollar una forma severa de la enfermedad, con artropatía erosiva asociada a una acentuada discapacidad, con un alto deterioro en la calidad de vida y mortalidad aumentada (Castelli, 2012).



Esto se produce como consecuencia de una respuesta exacerbada del sistema inmune y respuesta inflamatoria local que lleva a la hiperproliferación de los queratinocitos. Según la OMS, es una enfermedad crónica no transmisible dolorosa, desfigurante y discapacitante. El tratamiento de esta patología se realiza en primer lugar con fármacos de acción local como los corticoides, análogos de la vitamina D, retinoides, queratolíticos, fototerapia, y en segundo lugar con fármacos de acción sistémica como los inmunosupresores (ciclosporina, metotrexato) e inmunomoduladores, que producen graves efectos adversos tanto a nivel local como sistémico, además de recidivas.

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos, resulta importante la búsqueda de nuevas drogas capaces de modular la inflamación, el sistema inmune y la proliferación celular, que a la vez sean más inocuas y eficaces. Una fuente de obtención de nuevas drogas la constituyen las plantas medicinales, ya que producen metabolitos secundarios activos capaces de curar sus propias enfermedades. Un grupo de metabolitos activos lo constituyen los compuestos fenólicos que presentan conocida actividad antiinflamatoria y moduladora de la proliferación celular. También los triterpenos y los hidratos de carbono han demostrado este tipo de actividades.

En todos los casos, resulta importante además analizar la actividad antioxidante.

Considerando los antecedentes de la especie *Hydrocotyle asiatica* (Sampson y col., 2001) se seleccionó para esta tesis doctoral a una especie autóctona de nuestro país, *Hydrocotyle bonariensis*, planta medicinal empleada tradicionalmente para tratar problemas como los descritos en párrafos anteriores.





## *Capítulo 3*

# *Objetivos*

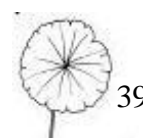
### **3.1. Objetivo general**

Como objetivo general de la tesis en estudio, se propuso ampliar el conocimiento fitoquímico y farmacológico de una especie vegetal muy utilizada de la flora medicinal argentina, *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Apiaceae) actualmente *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae), buscando justificar científicamente el uso popular.

En este contexto, la investigación se dirigió al estudio fitoquímico y a las actividades antiinflamatoria e inmunomoduladora de la especie.

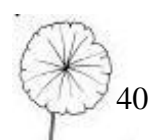
#### **Para alcanzar el Objetivo se establecieron Objetivos específicos:**

- Contribuir al conocimiento integral de una especie de la flora medicinal argentina muy utilizada.
  
- Aislar y caracterizar los principales compuestos activos que puedan tener una potencial aplicación terapéutica.
  
- Demostrar su actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora teniendo en cuenta su utilización tradicional.
  
- Establecer una correlación entre el uso tradicional de la especie y su actividad farmacológica.
  
- Contribuir al Control de Calidad de la especie.



### **3.2. Metas de trabajo**

- Colección, identificación y herborizado de las partes aéreas de la planta.
- Acondicionamiento, secado y molienda del material vegetal.
- Obtención de extractos en escala analítica y semipreparativa; fraccionamiento.
- Determinación de actividades biológicas (antiinflamatoria, antiproliferativa, antioxidante).
- Aislamiento y caracterización de los principales compuestos activos.
- Contribución al establecimiento de parámetros de calidad de la especie para su aplicación en Salud.



*Segunda Parte*

*Materiales y Métodos*

*Capítulo 4*

*Experimental*

#### **4.1. Material vegetal**

Las partes aéreas constituidas por hojas y flores de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae), se colectaron en el Parque Pereyra Iraola, Provincia de Buenos Aires, Argentina, en abril de 2005. La colección e identificación fue realizada por el Dr. Gustavo Giberti. Un ejemplar de herbario se encuentra depositado en el Museo de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, bajo el código Leg. G. C. Giberti 652 (BAF).

Luego de su colección, las partes aéreas se secaron al aire y bajo techo durante 5 días, y posteriormente en estufa de convección de aire forzado termostatzado a 40 °C. El material vegetal seco fue reducido a polvo en un molino eléctrico a cuchillas rotativas “Arthur Thomas”.

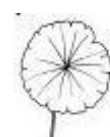
#### **4.2. Material e instrumental de laboratorio para los análisis de extractos orgánicos**

Los solventes utilizados fueron de calidad pro-análisis, Sintorgan ® o Merck ®, con excepción de aquellos empleados para los estudios de HPLC o RMN, que fueron de la calidad correspondiente.

Los extractos orgánicos fueron llevados a sequedad a presión reducida en un evaporador rotatorio Büchi ® R 110.

Para las cromatografías en columna se utilizó Sephadex LH 20 Pharmacia (Fine Chemicals) como fase estacionaria.

Para las cromatografías en placa delgada (TLC) se utilizaron como fases estacionarias cromatofolios de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> de 0,2 mm de espesor (Merck ®) y cromatofolios de celulosa POLYGRAM ® CEL 300 UV<sub>254</sub> de 0,1 mm de espesor (Macherey-Nagel ®). Para las cromatografías preparativas en papel (PC) se utilizó papel Whatman N° 3 MM.



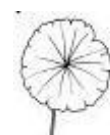
El seguimiento y análisis de las fracciones eluidas de las columnas se realizó por cromatografía analítica en capa delgada. El revelado de los cromatogramas se efectuó por observación bajo luz UV (254 y 366 nm, empleando una lámpara Desaga UVIS) sin y con previa exposición a vapores de amoníaco concentrado y por la aplicación del reactivo NPR (Natural Product Reagent: 1 g del éster 2-aminoetil-difenilbórico, Sigma, disueltos en 100 ml de metanol) (Wagner y col., 1996).

Para los espectros de absorción ultravioleta-visible, se utilizaron dos espectrofotómetros UV-VIS marca Shimadzu ®; uno modelo UV-240 con microprocesador y registrador PR-1, y otro UV 2101 PC. Los reactivos de desplazamiento empleados en el análisis de los flavonoides se prepararon según los procedimientos descritos por Mabry y col. (1970).

La cromatografía instrumental líquida de alta performance (HPLC) para el análisis de los flavonoides del extracto de metanol se realizó en un cromatógrafo Varian ® de la serie 9000 que consta de una bomba cuaternaria modelo 9012 y dos detectores en serie: un detector espectrofotómetro UV/visible modelo 9050 y otro con arreglo de fotodiodos modelo Polycrom 9065. Se emplearon las columnas cromatográficas Phenomenex ® Luna (2) y Zorbax Agilent ®. Para la preparación de las fases móviles se usaron solventes grado HPLC Merck ® o Sintorgam ® y agua de 18  $\Omega$  de conductividad.

Las sustancias patrones de referencia utilizadas para los análisis cromatográficos se adquirieron en Sigma ® (rutina, quercetina, isoquercitrina, hyperósido, asiaticósido, ácido gálico, galicina o galato de metilo) y en Carl Roth ® (ácido clorogénico y ácido cafeico).

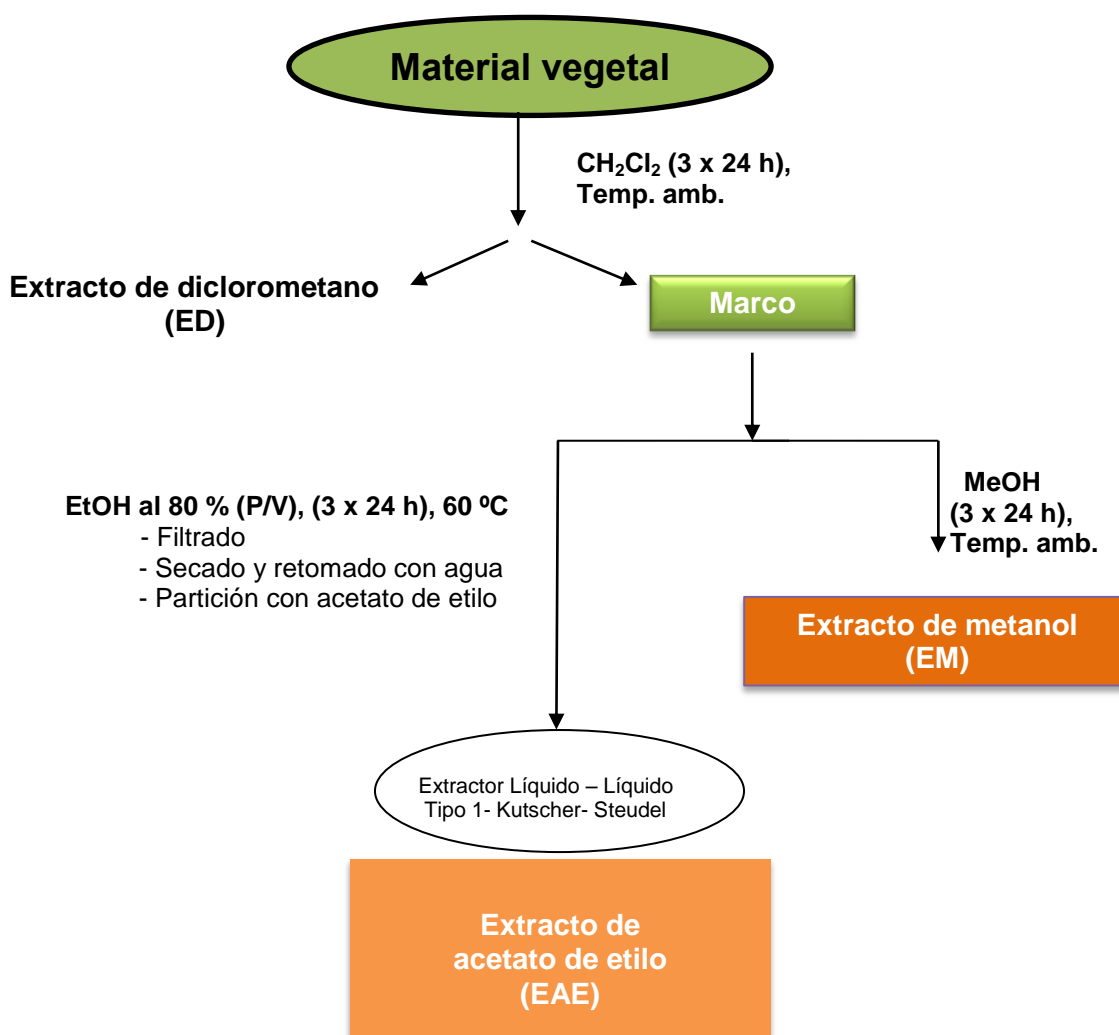
Las muestras se filtraron a través de filtros Millipore ® SJHVO 13 NS de 13 mm de diámetro antes de ser inyectadas en el cromatógrafo líquido.



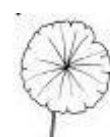
### 4.3. Preparación de los extractos orgánicos

#### 4.3.1. Extracto de diclorometano de *H. bonariensis*

Las partes aéreas secas y reducidas a polvo de *H. bonariensis* (400 g) se extrajeron con 3 litros de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) por maceración durante 24 horas, tres veces, filtrando luego de cada extracción. Los filtrados se reunieron y se llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio a presión reducida, trabajando a 40 °C. Se obtuvo así el **extracto de diclorometano (ED, Figura 4.1)** y se calculó el rendimiento.



**Figura 4.1.** Representación esquemática de la extracción secuencial con solventes orgánicos, de las partes aéreas de *H. bonariensis* (Araliaceae).





### **4.3.2. Extracto de acetato de etilo de *H. bonariensis***

Una parte del marco de la extracción con diclorometano se secó durante una noche a temperatura ambiente, al resguardo de la luz, bajo campana.

Luego se extrajo con 3 litros de etanol (EtOH) acuoso al 80 % (P/V) a 60 °C. Se filtró y se repitió la operación dos veces más, durante 24 h cada vez. Los extractos fueron reunidos y el etanol fue eliminado en evaporador rotatorio a presión reducida, a 40 °C. El remanente acuoso se extrajo en un extractor líquido-líquido de tipo 1 Kutscher-Steudel para solventes más livianos que el agua, con 3 porciones iguales de 200 ml de acetato de etilo (EtAcO). Los extractos de acetato de etilo (EAE) obtenidos se reunieron y se llevaron a sequedad a presión reducida en un evaporador rotatorio (**Figura 4.1**).

## **4.4. Fraccionamiento y análisis del extracto de acetato de etilo y sus fracciones**

### **4.4.1. Columna Sephadex LH 20**

Sesenta mg del extracto de acetato de etilo obtenido se fraccionaron mediante cromatografía a presión hidrostática en una columna de 40 cm de largo x 3 cm de diámetro interno, empleando Sephadex LH 20 como fase estacionaria. Se empaquetó la columna con una suspensión de 40 g de Sephadex LH 20 en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se sembró la muestra y se utilizaron como solventes de elución mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH. Se eluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (9:1) desde la fracción 1 hasta la 35; con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (8:2) desde la fracción 36 a la 65; con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (7:3) desde la fracción 66 hasta la 75 y con MeOH desde la fracción 76 hasta la última fracción 95. Las fracciones se llevaron a sequedad a presión reducida en evaporador rotatorio a 40 °C.



#### **4.4.2. Análisis de las fracciones por cromatografía en capa delgada (TLC)**

El análisis cualitativo de la composición de las fracciones obtenidas como se describió en el ítem anterior se realizó por TLC, empleándose un sistema cromatográfico constituido por celulosa UV<sub>254</sub> como fase estacionaria y ácido acético al 25 % como fase móvil (Stahl, 1969).

El revelado de los cromatogramas se realizó mediante luz UV a 254 y 366 nm, sin y con previa exposición a vapores de amoníaco. Luego se revelaron por aspersión con el reactivo NPR, posterior secado de la placa bajo aire caliente y observación a luz la UV de 366 nm (Wagner y col., 1996).

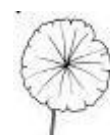
Como resultado del análisis cromatográfico descrito, se reunieron las fracciones similares y se utilizaron para el siguiente análisis cualitativo por cromatografía planar.

De acuerdo a la similitud en el perfil cromatográfico, las fracciones reunidas resultaron: 3-5; 6-24; 25-27; 28-33; 36-42; 43-45; 46, 47 y 48 (que precipitaron en frío); 50-56; 57-60; 61 a 66 (que también precipitaron en frío); 67-71; 72-75; 76-85; 86-90; 91-95.

Las fracciones reunidas se analizaron empleando el mismo sistema cromatográfico anterior (fase estacionaria celulosa UV<sub>254</sub>, fase móvil ácido acético al 25 %) (Stahl, 1969).

De las fracciones **46**, **47** y **48** que precipitaron en frío, se recuperaron los precipitados, los cuales fueron analizados mediante cromatografía planar en tres sistemas distintos:

- a) fase estacionaria (FE): papel; fase móvil (FM): ácido acético al 20 % V/V
- b) FE: sílicagel G60 F<sub>254</sub>; FM: acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético - agua (100:11:11:26)
- c) FE: celulosa 300 UV<sub>254</sub>; FM: ácido acético al 25 % V/V



#### **4.4.3. Columna Sephadex LH 20 de fracciones seleccionadas de la columna anterior**

Las fracciones 43-45, 46-48, 61-66 eluidas de la columna de Sephadex LH 20 del extracto de acetato de etilo y reunidas, se suspendieron en 1,5 ml de MeOH y se analizaron por cromatografía a presión hidrostática en una columna de 40 cm de largo x 3 cm de diámetro interno empleando Sephadex LH 20 como fase estacionaria. Se sembró la columna y se utilizaron como fase móvil mezclas de solventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH y MeOH. Se eluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (9:1) desde la fracción 1 hasta la fracción 11; con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (5:5) desde la fracción 12 a la fracción 21; y con MeOH desde la fracción 22 hasta la última fracción 31. Las fracciones se llevaron a sequedad a presión reducida en evaporador rotatorio a 40 °C.

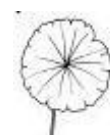
#### **4.4.4. Análisis por cromatografía en capa delgada (TLC)**

El análisis de la composición cualitativa de las fracciones obtenidas como se describió en el ítem anterior se realizó mediante TLC. Para ello se utilizó como fase estacionaria Sílica gel 60 F<sub>254</sub> y como fases móviles una mezcla de solventes compuesta por acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético y agua (100:11:11:26). El revelado de los cromatogramas se realizó mediante luz UV a 254 y 366 nm sin y con previa exposición a vapores de amoníaco. Luego se revelaron por aspersión con el reactivo NPR, posterior secado de la placa bajo aire caliente y observación a luz la UV de 366 nm (Wagner y col., 1996).

Finalmente se reunieron aquellas fracciones que mostraron composición similar.

Las fracciones que resultaron de interés (**14** y **15**) se utilizaron para el análisis cualitativo por cromatografía planar en los siguientes sistemas:

- I) FE: Sílica gel 60 F<sub>254</sub>; FM: tolueno – metanol - ácido acético (90:16:8)



II) FE: Sílica gel 60 F<sub>254</sub>; FM: acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético - agua (100:11:11:26) (Wagner y col., 1984)

III) FE: celulosa 300 UV<sub>254</sub>; FM: ácido acético al 25 % V/V

Tales fracciones también fueron analizadas por cromatografía en papel preparativa, utilizando ácido acético al 15 % V/V como fase móvil y papel Whatman N° 3 MM como fase estacionaria (Markman, 1975). El revelado se realizó mediante luz UV sin y con previa exposición a vapores de amoníaco.

Las bandas obtenidas (**14/1**, **14/2**, **14/3**, **14/4**, **14/5**, **15/1**, **15/2** y **15/3**) fueron cortadas y eluidas con metanol.

La identidad de los compuestos aislados de las cromatografías en papel fue determinada por espectroscopía UV en MeOH y mediante sus respectivos desplazamientos salinos. Cuando fue posible, los espectros obtenidos fueron comparados con los de muestras puras de procedencia comercial o aisladas e identificadas previamente en nuestros laboratorios.

#### **4.5. Extracto de metanol de *H. bonariensis***

Otra parte del marco seco de la extracción con diclorometano (**Figura 4.1**), se extrajo por maceración con 2 litros de metanol (MeOH), durante 24 horas a temperatura ambiente. El extracto se filtró y el marco se extrajo en iguales condiciones, dos veces más. Los filtrados se reunieron y se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio a presión reducida, a 40 °C. Se obtuvo así el extracto de metanol (**EM, Figura 4.1**) y se calculó el rendimiento.

##### **4.5.1. Estudio cualitativo de los ácidos orgánicos, fenoles simples y polifenoles**

El estudio cualitativo de los ácidos orgánicos, los fenoles simples, los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides presentes en el extracto de metanol, se



realizó por TLC por comparación de la relación de frente de solvente (Rf), colores e intensidad de colores.

También se analizaron por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), por comparación de los tiempos de retención y los espectros UV de los compuestos presentes, con los obtenidos a partir de estándares de referencia.

#### **4.5.2. Estudio cuantitativo de los fenoles**

La determinación espectrofotométrica del contenido de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y col. (1999).

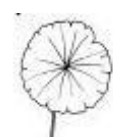
Las absorbancias fueron leídas a 765 nm en un espectrofotómetro, en una celda de 1 cm, usando como blanco agua destilada. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Las absorbancias de las muestras se interpolaron en la curva de calibración del ácido gálico usado como estándar.

La solución del estándar se preparó por disolución de 100 mg del compuesto puro en agua destilada llevando a volumen final de 1 litro, obteniendo así una solución estándar de 100 ppm de ácido gálico. De ella, se tomaron 5 alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 ml, las que fueron llevadas a volumen final de 100 ml con agua destilada. Finalmente, de cada una se tomó 1 ml, trabajando por duplicado.

Las muestras se prepararon por duplicado, por disolución en agua de 205 y 203 mg en cada caso, llevando a volumen final de 10 ml; de esta solución se tomó 1 ml y se llevó a 100 ml de volumen final utilizándose para el ensayo 1 ml de esta última dilución.

Todas las diluciones finales de la solución estándar y de la muestra fueron tratadas con 5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido. Este último se preparó tomando 10 ml del reactivo y llevando a volumen final de 100 ml con agua destilada.



Luego de 5 minutos de agregado el reactivo, se añadieron en cada caso 4 ml de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  preparada a partir de la disolución de 37,50 g +/- 0,01 g de la sal anhidra, en un volumen final de 500 ml de agua destilada.

Finalmente se dejó transcurrir 60 minutos al abrigo de la luz, se determinaron las absorbancias a 765 nm.

El blanco también se preparó por duplicado a partir de 1 ml de agua destilada tratado como se indicó para el estándar y la muestra.

El resultado de la cuantificación fue expresado en equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (GAE/g).

## **4.6. Purificación y análisis cromatográfico de los fenoles de los extractos**

### **4.6.1. Análisis por cromatografía en capa delgada (TLC)**

Los fenoles presentes en las fracciones obtenidas de la purificación de los extractos se analizaron por TLC en los siguientes sistemas cromatográficos:

- I) FE: Sílica gel 60 F<sub>254</sub>; FM: acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético - agua (100:11:11:26) (Wagner y col., 1984)
- II) FE: Sílica gel 60 F<sub>254</sub>; FM: tolueno – metanol - ácido acético (90:16:8)
- III) FE: celulosa 300; FM: ácido acético al 15 % V/V
- IV) FE: celulosa 300; FM: ácido acético al 40 % V/V (Stahl, 1969)

Los cromatogramas se observaron bajo la luz UV de 254 nm y de 366 nm. Posteriormente, los obtenidos con los sistemas I y II se revelaron por aspersion con una solución de tricloruro férrico en etanol al 5 % V/V (Waldi, 1965).

Los cromatogramas obtenidos con los sistemas III y IV se revelaron mediante luz UV a 254 y 366 nm sin y con previa exposición a vapores de amoníaco. Y a continuación, por aspersion con el reactivo NPR, posterior secado de la placa bajo aire caliente y observación a la luz UV de 366 nm (Wagner y col., 1996).



#### **4.6.2. Análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC)**

Mediante HPLC se realizó el análisis de la fracción **14** procedente del extracto de acetato de etilo (disuelta en MeOH con ayuda de un baño de agua con ultrasonido) y del **extracto de metanol**. Las muestras una vez disueltas, se filtraron por membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se inyectaron en el cromatógrafo.

Se utilizó el siguiente sistema cromatográfico:

Columna y FE: Phenomenex IB-SIL®, RP18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ).

FM: una mezcla binaria compuesta por los solventes A: agua - ácido acético (98:2) y B: metanol - ácido acético (98:2), empleando un gradiente lineal de 85 a 50 % de A en 30 minutos y de 50 a 15 % de A en 10 minutos.

Flujo: 1,20 ml/min.

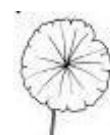
Volumen de inyección: 20  $\mu\text{l}$ .

Detección: se utilizó un detector espectrofotométrico UV/VIS con arreglo de diodos, a 254 y a 270 nm para los flavonoides. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los tiempos de retención y los espectros UV de los compuestos presentes, con los obtenidos con patrones de referencia.

#### **4.7. Análisis de saponinas en un extracto de metanol**

Por otra parte, a fin de analizar las saponinas presentes en *H. bonariensis*, fundamentalmente el asiaticósido, se determinó el perfil de un extracto de metanol preparado como se describe más abajo, por cromatografía en capa delgada (TLC) según la monografía de “centella asiática” (FA, 2013).

El sistema cromatográfico estaba constituido por Sílica gel 60 F254, como fase estacionaria y una mezcla recientemente preparada de butanol - 2-propanol – agua - metanol - amoníaco concentrado (30:30:20:5:1), como fase móvil.



En cuanto a la muestra, 5 g de las partes aéreas secas y reducidas a polvo de *H. bonariensis*, se extrajeron con metanol durante 4 h mediante un extractor tipo soxhlet. Luego se filtró, se trasvasó el extracto a un matraz de 50 ml y se llevó a volumen final con metanol.

Una vez desarrollado el cromatograma, se dejó secar y se efectuó el revelado mediante aspersion con una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico (9:1); posteriormente se examinó bajo la luz natural (FA, 2013).

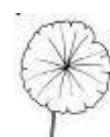
## **4.8. Extracción con agua**

### **4.8.1. Obtención de la Infusión al 5 % P/V**

Las partes aéreas secas y molidas de *H. bonariensis* (10 g) se extrajeron también con 200 ml de agua destilada recientemente hervida en un recipiente tapado. Se dejó reposar por 20 minutos y se filtró (FNA, 1978). La **infusión (I)** obtenida se llevó a seco por liofilización en un equipo Virtis® y se calculó el rendimiento. Posteriormente se efectuaron los análisis preliminares cuantitativos (determinación del % total de hidratos de carbono, ácidos urónicos, grupos sulfato y monosacáridos constituyentes mediante cromatografía planar, previa hidrólisis de la muestra) como se describe más adelante. La **Figura 4.2** presenta el esquema de trabajo.

### **4.8.2. Fraccionamiento de la infusión al 5 % P/V**

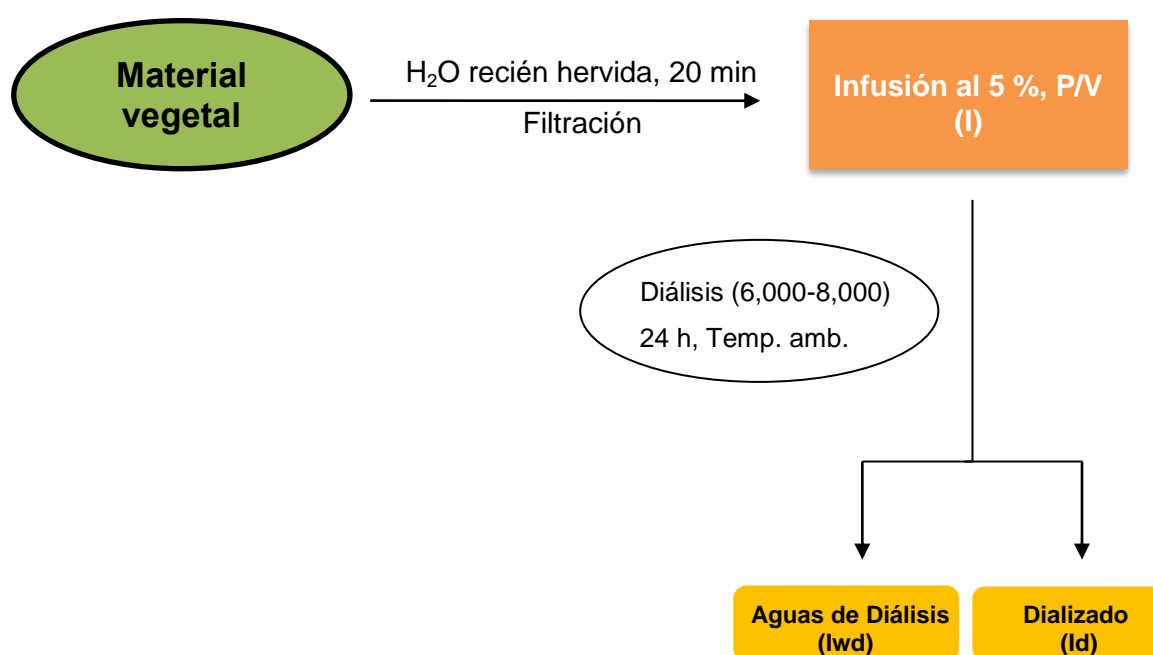
Una porción de 0,45 g de la infusión fue suspendida en 15 ml de agua destilada e introducida en una bolsa de diálisis (6,000-8,000), sometiendo el sistema a una diálisis cerrada contra 200 ml de agua destilada, 24 h, a temperatura ambiente. Posteriormente el dializado (**Id**) y las aguas de diálisis (**Iwd**), fueron concentradas a presión reducida en un evaporador rotatorio y llevadas a seco mediante liofilización (**Figura 4.2**).



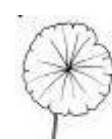


Tanto el extracto acuoso (I), como Id y lwd, fueron analizados en su composición de hidratos de carbono sin y con hidrólisis previa, obteniéndose perfiles mediante cromatografía planar (sobre papel Whatman N° 1 con *n*-butanol-piridina-agua, 10:3:3) y HPLC utilizando un detector de índice de refracción (IR) en el caso de la infusión (I). La proporción de azúcares totales se determinó mediante el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico a 490 y 482 nm (Dubois y col., 1956) y para cuantificar los ácidos urónicos se utilizó el método propuesto por Filisetti-Cozzi y Carpita (Filisetti-Cozzi y col., 1991).

El contenido de grupos sulfatos fue determinado por el método turbidimétrico de cloruro de bario-gelatina, a 360 nm (Dodgson, 1961; Dodgson y col., 1962).



**Figura 4.2.** Representación esquemática de la extracción acuosa y del fraccionamiento de las partes aéreas de *H. bonariensis* (Araliaceae).



#### **4.8.2.1. Hidrólisis ácida (Morrison, 1988)**

Alrededor de 3 mg de muestra fueron colocados en viales provistos de tapas de teflón y se le adicionaron 0,5 ml de TFA 2 M. Tras calentamiento en estufa a 121 °C durante 90 min, los hidrolizados fueron evaporados a seco a presión reducida con agregados sucesivos de agua destilada hasta la eliminación total del olor al ácido. Los residuos fueron mantenidos en un desecador al vacío durante una noche.

#### **4.8.2.2. Cromatografía planar para hidratos de carbono**

Cromatofolio de 10 cm de alto.

Fase estacionaria: papel Whatman N° 1.

Fase móvil: *n*-butanol-piridina-agua (10:3:3).

Sustancia patrón: soluciones acuosas de galactosa, fucosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico.

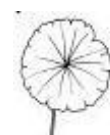
Muestra: producto nativo o hidrolizado como se indicó más arriba, retomado en agua destilada.

Procedimiento: se sembraron 5 bandas superpuestas (dejando secar entre cada siembra) de Muestra en un extremo del cromatofolio a 1 cm de distancia de cada borde, se dejó secar el sembrado y se efectuó el desarrollo ascendente con la Fase móvil. De igual forma se procedió con la Sustancia patrón, sembrando a 1,5 cm de la Muestra. Finalizada la cromatografía, se retiró el cromatograma y se dejó secar a temperatura ambiente.

Revelado: se utilizó el revelado específico para hidratos de carbono que se describe a continuación.

Revelado específico:

1- Nitrato de plata al 40 % (al momento de usar, diluido 1:40 en acetona).



2- Hidróxido de sodio en etanol (1 ml de hidróxido de sodio 10 M más 20 ml de etanol).

3- Tiosulfato de sodio al 2,5 % en agua destilada.

Técnica: se realizó la inmersión del cromatograma en un recipiente que conteniendo el reactivo 1. Se dejó escurrir y se lavó exhaustivamente con el reactivo 2, usando la misma técnica de inmersión. Luego se fijó con el reactivo 3 para evitar que se desvanezcan las manchas y para solubilizar el exceso de óxido de plata.

#### **4.8.2.3. Cromatografía líquida de alta performance con detector de índice de refracción (HPLC-IR)**

La infusión previamente hidrolizada como se indicó más arriba fue analizada mediante HPLC empleando un equipo Waters system y un detector de índice de refracción (RI Waters 2414).

Se trabajó con una columna Supelcogel Ca (300 x 7,8 mm) y un flujo de 0,5 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 80 °C (Harborne, 1991; Scherz and Bonn, 1998).

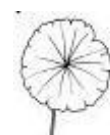
#### **4.8.2.4. Determinación de hidratos de carbono totales**

Se efectuó por el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico (Dubois y col., 1956).

#### **Reactivos**

Solución de fenol al 5 % en agua, obtenido por disolución de 50 g de fenol en 1 litro de agua. Esta solución es estable durante varios meses conservada a temperatura ambiente.

Ácido sulfúrico grado analítico 98 %.



### **Procedimiento para productos solubles**

A 0,5 ml de solución conteniendo aproximadamente hasta 100  $\mu\text{g/ml}$  de hidratos de carbono se le agregaron directamente 0,5 ml de fenol al 5 %, se mezclaron y se dejaron caer 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un máximo calentamiento. Transcurridos 10 min los tubos se agitaron en un vórtex y se mantuvieron 20 min más a temperatura ambiente. Paralelamente se efectuó un blanco con 0,5 ml de agua destilada. La cantidad de hidratos de carbono se determinó por la lectura de la absorbancia del color desarrollado a 490 nm por referencia a curvas patrón de galactosa y de glucosa [100  $\mu\text{g/ml}$ ]. La proporción se expresó como porcentaje de azúcar anhidro ( $\times 162/180$ ).

#### **4.8.2.5. Determinación de ácidos urónicos**

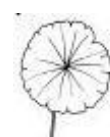
Se utilizó la modificación de Filisetti-Cozzi y Carpita (Filisetti-Cozzi y col., 1991) del método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen (Blumenkrantz y col., 1973).

#### **Reactivos**

Solución A: ácido sulfámico / sulfamato de potasio 4 M (pH 1,6). Se agitaron 38,8 g de ácido sulfámico en 50 ml de agua y se agregó hidróxido de potasio saturado gota a gota hasta disolución. Finalmente, la solución se ajustó a pH 1,6 con HCl, y se llevó a 100 ml.

Solución B: ácido sulfúrico - tetraborato de sodio, de concentración 0,0125 M de la sal en ácido sulfúrico concentrado, grado analítico.

Solución C: *m*-hidroxidifenilo (0,15 %) en hidróxido de sodio acuoso al 0,5 %. Esta solución es estable durante siete semanas si se mantiene refrigerada.



## **Procedimiento**

Alícuotas de una solución de la muestra conteniendo hasta 200 nmoles de ácido hexurónico (Ahmed y col., 1977) se diluyeron con agua hasta 0,5 ml. Luego se adicionaron 40  $\mu$ l de la solución A a cada tubo y se agitaron. Se colocaron los tubos en baño de hielo y se les agregó 2,5 ml de la solución B. Se agitaron vigorosamente y se llevaron a un baño de agua a temperatura de 100 °C durante 20 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente rápidamente, en un baño de hielo y se les adicionó 80  $\mu$ l de la solución C. Tras agitar y dejar reposar las muestras 5 a 10 minutos, se procedió a leer las absorbancias a 525 nm dentro de los 60 minutos. Se preparó un blanco de agua destilada y se utilizó una solución patrón de D-glucuronolactona de 80  $\mu$ g/ml. Se considera que la absorbancia producida por reacción con azúcares neutros es 1/40 de la que produce el ácido glucurónico.

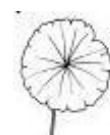
### **4.8.2.6. Determinación del contenido de sulfato**

Se utilizó el método turbidimétrico (Dodgson, 1961; Dodgson y col., 1962).

## **Reactivos**

Reactivo de cloruro de bario-gelatina, preparado por disolución de 200 mg de gelatina (Oxoid, libre de sulfatos) en 40 ml de agua destilada (o desionizada, grado HPLC), a 70 °C. La solución resultante se mantuvo en heladera durante no menos de 6 h, y luego se disolvió en ella 200 mg de cloruro de bario (grado analítico) y se dejó nuevamente en heladera durante 3 h o más. Este reactivo es estable durante una semana si se lo conserva a menos de 4 °C.

Solución de ácido tricloroacético al 3 % acuoso (TCA), preparada a partir de 15 g del ácido y posterior disolución en agua destilada (o desionizada), llevando a un volumen final de 500 ml. La solución resultante también se mantuvo en heladera, y allí es estable.



### **Procedimiento**

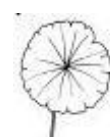
Hasta 3 mg de muestra conteniendo entre 20 y 200  $\mu\text{g}$  de  $\text{SO}_4$ /0,2 ml de solución final se pesaron y se colocaron en viales provistos de tapas de teflón. Se les agregó 1,5 ml de HCl 1 M y se hidrolizaron en estufa a 110 °C durante 4,5 h. A partir del hidrolizado se tomaron alícuotas de 100 a 400  $\mu\text{l}$ , se llevaron a volumen final de 400  $\mu\text{l}$  con ácido clorhídrico 1 M cuando fue necesario. Cada una de las diluciones resultantes se agregó sobre 2,8 ml de la solución de ácido tricloroacético al 3 % acuoso. Tras la agitación de los tubos en un vórtex se les adicionaron 800  $\mu\text{l}$  del reactivo cloruro de bario-gelatina, se volvió a agitar y se dejaron a temperatura ambiente durante no más de 20 min.

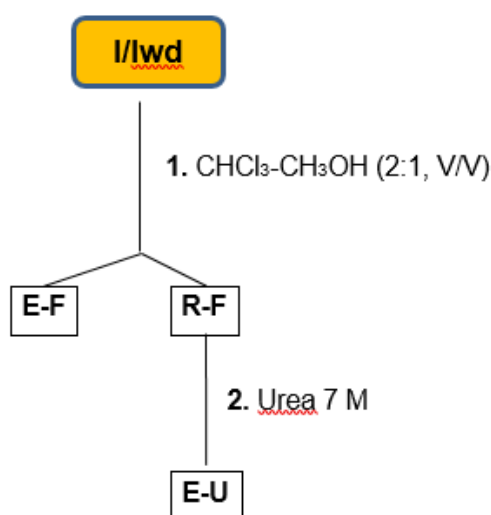
Posteriormente se procedió a la lectura de las absorbancias correspondientes (turbidez) a 360 nm. El blanco se preparó con 400  $\mu\text{l}$  de HCl 1 M, de igual forma. La solución patrón utilizada se preparó por disolución de sulfato de sodio anhidro en ácido clorhídrico normal de tal forma que la concentración fue de 118  $\mu\text{g}$  de S/ml (equivalente a 354  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en  $\text{SO}_4$ ).

La medición debe ser realizada dentro de la primera hora, debido a que luego el sulfato de bario tiende a precipitar.

### **4.8.3. Fraccionamiento de los componentes solubles de la infusión y de las aguas de diálisis**

I y/o Iwd se fraccionaron mediante distintos procedimientos extractivos, los que se aplicaron secuencialmente (**Figura 4.3**). En todos los casos se utilizó agitación magnética. Los productos solubles y los correspondientes residuos fueron separados por centrifugación, y diálisis si correspondiera. Finalmente se concentraron y se llevaron a seco en estufa de vacío.





**Figura 4.3.** Esquema de fraccionamiento de los componentes solubles de la infusión y de las aguas de diálisis de las partes aéreas de *H. bonariensis* (Araliaceae).

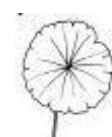
1. Extracción con cloroformo - metanol (2:1, V/V), 15 ml por cada 100 mg de residuo, durante 24 h, a temperatura ambiente, a fin de solubilizar los lípidos (Folch y col., 1957)

2. Tratamiento con un agente caotrópico, urea 7 M acuosa (Manzi y col., 1990), mediante 2 extracciones sucesivas de 25 ml por cada 100 mg de residuo, durante 12 h cada vez, a temperatura ambiente.

#### 4.8.4. Fraccionamiento de los polisacáridos del dializado (Id) por cromatografía de intercambio aniónico y filtración por geles

Una porción de **Id** se fraccionó mediante cromatografía de intercambio iónico (Stortz y col., 1997) sobre DEAE Sephadex A-50 combinado con Sephadex G-100 estabilizado con NaCl 0,2 M (Flores, 2000; Flores y col., 2000).

El fraccionamiento se realizó en una columna de 1,0 x 18 cm. El gel se preparó con 10 ml de una suspensión de DEAE-Sephadex A-50 (Sigma) en NaCl 0,2 M, a la que se le agregaron 500 mg de Sephadex G-100 o G-75 previamente



suspendido en NaCl 0,2 M. El gel se dejó hinchar en caliente durante 1 h, se enfrió y desgasificó en un desecador de vacío, y posteriormente se incorporó a la columna y se estabilizó con NaCl 0,2 M. A continuación, se sembraron 15 mg de **Id** que se eluyeron con concentraciones crecientes de NaCl hasta 4 M colectando fracciones de 1,5 ml. En todas las fracciones colectadas las muestras eluidas se cuantificaron por el método del fenol-ácido sulfúrico como se indicó más arriba (Dubois y col., 1956).

Las fracciones eluidas de la columna preparativa se reagruparon de acuerdo al perfil cromatográfico, se dializaron por separado (bolsa de poro 3,000 – 3,500), se llevaron a seco, y posteriormente fueron analizadas en su composición general.

#### **4.8.4.1. Determinación de azúcares totales**

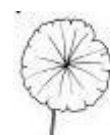
Se efectuó por el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico (Dubois y col., 1956), como se describió anteriormente.

#### **4.8.4.2 Determinación de los hidratos de carbono por cromatografía gaseosa**

Se realizó mediante cromatografía gas líquido (CGL) previa hidrólisis y derivatización de las muestras, empleando un detector FID.

##### **4.8.4.2.1. Hidrólisis ácida** (Morrison, 1988)

Alrededor de 3 mg de muestra fueron colocados en viales provistos de tapas de teflón y se le adicionaron 0,5 ml de TFA 2 M. Tras calentamiento en estufa a 121 °C durante 90 min, los hidrolizados fueron evaporados a seco a presión reducida con agregados sucesivos de agua destilada hasta la eliminación total del olor al ácido. Los residuos fueron mantenidos en un desecador al vacío durante una noche.





#### **4.8.4.2.2. Preparación de los aldononitrilos peracetilados** (Seymour y col., 1979; Albersheim y col., 1967)

A los hidrolizados secos se les agregó 10 mg de clorhidrato de hidroxilamina y 0,5 ml de piridina anhidra en viales cerrados, y el conjunto se llevó a estufa a 85 °C durante 30 min. Luego se enfriaron los viales, se les adicionó 0,5 ml de anhídrido acético y se los llevó nuevamente a estufa a igual temperatura por otros 30 min. Una vez enfriadas las soluciones, los derivados fueron extraídos con 1 ml de cloroformo-agua (1:1). Los extractos clorofórmicos se lavaron 3 veces con un 1 ml de una solución saturada de bicarbonato de sodio, otras 2 veces con agua destilada y finalmente fueron secados con sulfato de sodio anhidro. El extracto clorofórmico se evaporó a sequedad, y el residuo resultante se disolvió en 20  $\mu$ l de cloroformo inmediatamente antes de ser inyectado en el cromatógrafo gaseoso.

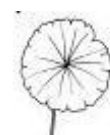
#### **4.8.4.2.3. Sistema cromatográfico**

La cromatografía se llevó a cabo en un cromatógrafo gas líquido Shimadzu GCMSQP2010 equipado con un detector de ionización de llama (FID), con una relación de Split de 45:1, utilizando nitrógeno como gas portador (Flores, 2000).

Se utilizó una columna capilar SP-2330 (Supelco) de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20  $\mu$ m de espesor de la fase líquida. El flujo del gas portador (N<sub>2</sub>) fue de 1 ml /min; la presión en cabeza de columna fue de 104 kPa (= 1,02 atm o 15 Psi). El desarrollo se efectuó mediante una corrida isotérmica a 220 °C, siendo las temperaturas del inyector y del detector, de 235 °C.

#### **4.8.5. Análisis de hidratos de carbono por cromatografía gaseosa – espectrometría de masas (CGL-MS)**

A fin de corroborar las estructuras de los hidratos de carbono se analizaron las muestras, previa hidrólisis y derivatización a los correspondientes aldononitrilos



peracetilados, mediante CGL-MS.

Los espectros de masa fueron realizados en un espectrómetro de masas Shimadzu GCMS – QP2010 acoplado a un cromatógrafo gaseoso Shimadzu GC-2010, a un potencial de ionización de 70 Ev.

Para el desarrollo cromatográfico, se empleó una columna SPB-5 de fase aglomerada, poli (5 % difenil/95 % dimetilsoxano), 60 m de longitud, 0,25 mm de d. i. y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de la fase líquida. Se trabajó con helio como fase móvil, manteniendo la temperatura del horno a 220 °C y del inyector a 235 °C, y un flujo de 1 ml/min. Las restantes condiciones para la cromatografía fueron indicadas en la sección anterior.

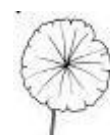
#### **4.8.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970)**

Se utilizó un equipo Mini-Protean II (Bio Rad), que permite correr dos geles simultáneamente, uno de los cuales se coloreó para la detección de proteínas con Coomassie blue (Hames, 1990), y el otro se tiñó mediante el reactivo ácido periódico-Schiff (PA-S) para la visualización de los hidratos de carbono (Fairbanks, 1971). Los geles fueron coloreados con plata a continuación de las coloraciones mencionadas anteriormente, a fin de lograr mayor sensibilidad en la detección (Oakley y col., 1980; Jay y col., 1990).

##### **4.8.6.1. Preparación de los reactivos**

Buffer catódico (Tris base 0,1 M; Tricina 0,1 M; SDS 0,1 %): se pesaron 6,055 g de Tris base [tris(hidroximetil)aminometano], 8,96 g de Tricina (N-[tris(hidroximetil)metil]glicina), 0,5 g de SDS (dodecilsulfato de sodio) y se disolvieron en agua grado HPLC, llevando a volumen final de 500 ml.

Buffer anódico: (Tris HCl 0,2 M; pH 8,9): se pesaron 21,18 g de Tris base, 3,84 g de Tris HCl ([tris(hidroximetil)aminometano].HCl) y se disolvieron en agua grado HPLC, llevando a volumen final de 1000 ml.



Gel buffer: preparado con 25,17 g de Tris base, 14,55 g de Tris HCl y 0,3 g de SDS que se disolvió en agua grado HPLC y se llevó a volumen final de 100 ml.

Buffer de siembra ("sample buffer", debe conservarse a temperatura ambiente): se preparó mezclando 1,0 ml de Tris HCl pH 6,8, 0,4 ml de 2-mercaptoetanol, 0,8 ml de glicerol, 1,6 ml de SDS (10 % P/V) y 0,2 ml de azul de bromofenol al 0,05 % P/V.

Tris HCl pH 6,8: se disolvieron 6 g de Tris base en 60 ml de agua, se ajustó el pH a 6,8 con ácido clorhídrico concentrado y se completó hasta un volumen final de 100 ml, con agua. Este reactivo debe conservarse en heladera a temperaturas  $\leq 4$  °C.

SDS al 10 % P/V: se obtuvo por disolución de 10 g de dodecilsulfato de sodio en agua y se ajustó el volumen a 100 ml.

Acrilamida / Bis Acrilamida (30 % T; 2,67 % C) (= Monómero): se obtuvo a partir de 87,6 g de acrilamida y 2,4 g de *N,N'*-bismetilenacrilamida, suspendidos en 300 ml de agua grado HPLC. La suspensión filtrada se conservó a 4 °C, se protegió de la luz, por no más de 30 días.

APS al 10 %: se utilizó solución de persulfato de amonio al 10 % P/V en agua desionizada calidad HPLC.

Colorante para proteínas: la solución al 0,1 % V/V fue preparada por disolución del reactivo Coomassie blue R-250 en una mezcla constituida por metanol al 40 % y ácido acético al 10 %.

Decolorante: se partió de una mezcla formada por metanol al 40 % y ácido acético al 12 % en agua destilada, se llevó a volumen final de 100 ml.

Reactivo de Schiff: se preparó a partir de 0,1 g de fucsina en 60 ml de agua destilada (Hames, 1990; Fairbanks y col., 1971). La mezcla se calentó hasta disolución completa, y luego se le agregó 1 g de sulfito de sodio anhidro disuelto en 10 ml de agua destilada, y 1 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Finalmente se completó a 100 ml el volumen de la solución con agua destilada



y se dejó durante al menos 1 h en reposo antes de ser utilizado.

#### **4.8.6.2. Procedimiento de preparación de los geles**

Los geles se armaron en el soporte de armado (“casting stand”) según las instrucciones del manual del equipo Mini-Protean II (Bio Rad). Se utilizaron espaciadores de 0,75 mm y peines de 10 calles. Se marcaron con un marcador para vidrio 1 cm por debajo del borde del peine (1 cm del gel concentrador, “stacking gel”).

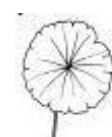
La **Tabla 4.1** muestra los componentes de los geles y las cantidades de cada uno recomendadas en cada caso. El orden en que están ubicados los reactivos corresponde al que se debió seguir durante el agregado de los mismos en el armado de los geles.

**Tabla 4.1.** Protocolo de preparación los geles de poliacrilamida (Córdoba y col., 1997).

Reactivos	T SDS-PAGE 10 %		Gel separador 16 %		Gel concentrador 2 geles
	1 gel	2 geles	1 gel	2 geles	
Monómero	2,0 ml	4,0 ml	3,2 ml	6,4 ml	0,66 ml
H <sub>2</sub> O	1,2 ml	2,4 ml	-	-	3,10 ml
Gel Buffer	2,0 ml	4,0 ml	2,0 ml	4,0 ml	1,24 ml
Glicerol	0,65 ml	1,3 ml	-	-	-
TEMED	5 µl	10 µl	5 µl	10 µl	6 µl
APS 10%	50 µl	100 µl	50 µl	100 µl	60 µl

#### **4.8.6.3. Preparación de las muestras**

Las muestras insolubles o poco solubles (alrededor de 1 mg) se colocaron en un tubo eppendorff, se les agregó un volumen de buffer de siembra (30-50 µl) y se mantuvo la mezcla durante 3 min a 90 °C en un baño de agua. Las mezclas pueden conservarse en freezer.



Las muestras hidrosolubles se disolvieron previamente en agua destilada (alrededor de 1 mg en 100 ml) y a partir de esta solución se tomaron de 10 a 30  $\mu$ l, y se les agregó un volumen igual del buffer de siembra procediendo luego como se indicó en el párrafo anterior para los materiales insolubles.

Una vez enfriadas las mezclas, se sembraron en las calles correspondientes de los geles, hasta un volumen máximo de 30  $\mu$ l.

#### **4.8.6.4. Condiciones de la corrida**

Desarrollo en el gel concentrador: a 45 V.

Desarrollo en el gel separador: se aumentó gradualmente desde 45 V hasta llegar a 110 V como máximo y se dejó en ese valor durante todo el resto de la corrida. Al finalizar la electroforesis y antes de abrir el sistema, se bajó el voltaje a 3 V.

#### **4.8.6.5. Coloración de los geles para la localización de las proteínas** (Laemmli, 1970)

Una vez finalizada la corrida, se separaron los geles y se colocaron en un recipiente que contenía la solución decolorante para fijar las sustancias separadas. Uno de los geles se transfirió a una cuba en donde se le agregó el colorante Coomassie blue R250 preparado como se indicó anteriormente, y se lo dejó en contacto durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se procedió al desteñido dejando el gel en contacto con la solución decolorante con cambios sucesivos de la misma hasta que sólo se visualizaron las bandas correspondientes a las proteínas y/o péptidos de color azul violáceo y el resto del gel se observa transparente. La coloración es estable si se conservaron los geles en solución decolorante.



#### **4.8.6.6. Coloración de los geles para la localización de los hidratos de carbono** (Hames, 1990)

- 1) Fijación: se efectuó sumergiendo el gel en ácido tricloroacético al 12,5 % durante 2 h. A continuación el gel se lavó exhaustivamente con agua destilada.
- 2) Oxidación: se incubó el gel durante 2 h en una solución de ácido periódico al 1 % en ácido acético al 3 %. Luego el gel se lavó con abundante cantidad de agua destilada durante una noche.
- 3) Reactivo de Schiff: tras la oxidación y lavado, el gel se incubó durante 60 min con el reactivo. Finalmente se lavó repetidas veces con una solución acuosa de metabisulfito de sodio al 0,5 % hasta que sólo se visualizaron las bandas color rosado correspondientes a los hidratos de carbono y desapareció el color en el resto del gel. Los geles así coloreados son estables si se los en un baño de la solución decolorante (metabisulfito de sodio al 0,5 %).

#### **4.8.6.7. Tinción de los geles con plata** (Oakley y col., 1980; Jay y col., 1990)

- 1) Los geles sin coloración previa, se fijaron en una mezcla de metanol al 50 % y ácido acético al 12 %; y los ya coloreados con Coomassie blue o con PA-Schiff, se mantuvieron en el decolorante correspondiente.
- 2) Se lavaron los geles fijados o decolorados, con etanol al 50 %, 3 veces, durante 20 min cada vez.
- 3) Se rehidrataron los geles con abundante agua calidad HPLC, evitando que el gel se vaya a la superficie o se doble.
- 4) Pretratamiento con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ : se realizó con una solución acuosa de la sal pentahidratada al 2 % (= 0,2 g/l), recientemente preparada, durante 1 min.
- 5) Se efectuaron enjuagues con agua calidad HPLC (3 de 20 seg cada uno).
- 6) Impregnación: se utilizó una solución de nitrato de plata preparada con 200



mg por cada 100 ml, y 75  $\mu$ l de formaldehído al 37 %, durante 20 min.

7) A continuación se realizaron lavados con abundante agua calidad HPLC (2 de 20 seg cada vez).

8) Desarrollo: se efectuó en una solución que contenga 6 g de carbonato de sodio, 50  $\mu$ l de formaldehído al 37 % y 2 ml de la solución preparada para efectuar el pretratamiento (paso 4), llevada a 100 ml con agua grado HPLC. Los geles se mantienen en esta mezcla 10 min.

9) Se lavaron con agua calidad HPLC. Se indican 2 veces de 2 min en cada caso, pero hay que observar detenidamente ya que, si el gel continúa oscureciéndose, el lavado deberá ser en menor tiempo.

10) Se fijaron con una mezcla de metanol al 50 % y ácido acético al 12 %, durante 10 min.

11) Se lavaron con abundante metanol al 50 %, 20 min cada vez. Se conservan a 4 °C.

#### **4.8.7. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el análisis de las fracciones del extracto acuoso**

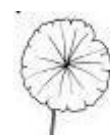
Las fracciones resultantes del fraccionamiento de la infusión mediante diálisis, **Id** e **Iwd** (**Figura 4.2**), fueron analizadas mediante HPLC en fase reversa (RP).

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta performance Waters 1525 Binary HPLC equipado con un detector de arreglo de diodos Waters 2996.

A continuación se describe el sistema utilizado:

Fase estacionaria: columna de fase reversa C18 Water Simetric 300 de 250 x 4,6 mm y 5  $\mu$ m de diámetro de partícula.

Fase móvil: **A**, acetonitrilo; **B**, agua-ácido acético 40:1.



Gradiente utilizado: 0 a 15 min, 85 % de B; 15 a 45 min, de 85 a 65 % de B; 45 a 47 min, de 65 a 0 % de B; 47 a 48 min, de 0 a 85 % de B; 48 a 54 min, de 85 % de B. Se trabajó a un flujo constante de 1 ml/min.

Sustancia de referencia: extracto alcohólico de *Ginkgo biloba*.

Muestra: 0,5 mg de **Id** e **Iwd** se disolvieron en 500 µl de agua destilada; se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 5 min y se filtró por membrana de 0,20 µm de diámetro de poro.

Volumen de inyección: 200 µl.

La detección se realizó a una longitud de onda de 254 y de 365 nm (Apdti y col., 2002).

Los tiempos de retención reales fueron corregidos según la siguiente ecuación: (Alcalde Bahamonde, 2013):

$$t_{RC} = (t_{Rr} - t_i) + [(0,fx) \times 60/100]$$

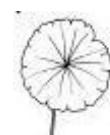
donde  $t_{RC}$  corresponde al tiempo de retención corregido;  $t_{Rr}$ , es el tiempo de retención real que grafica el equipo;  $t_i$  es el tiempo de inyección; 0,fx corresponde a la fracción de minutos que indica el informe del cromatograma, el cual se transforma a segundos. Los  $t_{RC}$  se expresan en minutos seguidos de los segundos.

## **4.9. Actividades biológicas**

### **4.9.1. Toxicidad aguda**

La toxicidad aguda se determinó sobre una porción de la infusión al 5 % P/V obtenida como se indicó más arriba.

Para ello, a 5 ratones macho y a 5 ratones hembra de la cepa CF-1 de 18 a 25 g de peso, se los mantuvo a una temperatura ambiente de  $22 \pm 1$  °C, con ciclos de 12 horas luz oscuridad. Se les administró una dieta estándar y agua *ad libitum* (Canadian Council of Animal Care, 1993).





Los animales se distribuyeron al azar en 2 grupos: un grupo control y otro experimental. Se los mantuvo 24 horas en ayuno. Pasadas las 24 horas, al grupo experimental se le administró la infusión disuelta en agua destilada a razón de 1 g/2 ml (500 mg/ml), en una dosis de 5 g/kg de peso por vía oral mediante una sonda gástrica.

Al grupo control se le administró el vehículo (agua).

Luego del tratamiento los animales fueron observados durante 15 días consecutivos, 2 veces por día.

En las observaciones se evaluó la mortalidad, el comportamiento (estereotipia, irritabilidad, inquietud) y los perfiles neurológicos (convulsiones, incoordinación motora) y autónomos (salivación, piloerección, contorsiones, emesis). Al decimoquinto día, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los órganos vitales se observaron microscópicamente (pulmones, riñones, hígado, bazo e intestino).

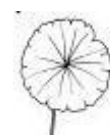
#### **4.9.2. Actividad antiinflamatoria**

La actividad antiinflamatoria se determinó en dos modelos: ensayo del edema plantar inducido por carragenina y ensayo del edema de la oreja inducido por el 12-O-tetradecanoilforbol-13 acetato (TPA).

El extracto de metanol se ensayó sobre el primer modelo, mientras que el extracto de metanol y la infusión, fueron ensayados sobre el segundo modelo.

##### **4.9.2.1. Edema plantar inducido por carragenina**

Se utilizaron 12 ratas hembras Sprague-Dawley de 180 a 200 g de peso, divididas en dos grupos de 6 animales cada uno, un grupo control y otro de ensayo. Antes del experimento, los animales se mantuvieron 16 horas en ayunas, con agua *ad libitum* y con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Los animales se trataron según los principios internacionales y regulaciones locales



de cuidado y uso de animales de laboratorio (Canadian Council of Animal Care, 1993).

El edema se indujo inyectando 0,1 ml de carragenina al 1 % en solución fisiológica, subcutáneamente en la pata trasera debajo de la aponeurosis plantar (Winter y col., 1962).

El extracto de metanol se disolvió en EtOH -Tween80 - H<sub>2</sub>O (5:5:90) y se administró en dosis de 100 y 300 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.) y 300 mg/kg por vía oral (v.o.), 30 y 60 min antes de la inyección de carragenina, respectivamente. La indometacina (control de referencia antiinflamatorio), se administró en una dosis de 10 mg/kg de peso corporal. Al grupo control se le administró el vehículo (5 ml/kg i.p.).

La inflamación se cuantificó midiendo el volumen desplazado por la pata con un pletismómetro (Ugo Basile) a tiempo 0 (basal), a 1 hora, a las 3 horas, a las 4 horas y a las 5 horas después de la inyección de carragenina.

La diferencia de volúmenes entre la pata derecha e izquierda fue indicativa del grado de inflamación. El porcentaje de inhibición del edema se calculó por comparación con el grupo control.

Las diferencias obtenidas entre los grupos control y de ensayo se trataron estadísticamente empleando el ensayo de varianza ANOVA y luego el ensayo de Dunnett (Graph a pad in Stat, 1998). Los valores de probabilidad P menores de 0,05 se consideraron significativos. Todos los datos se expresaron como media  $\pm$  ESM.

#### **4.9.2.2. Edema en oreja de ratón inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)**

La actividad antiinflamatoria tópica de la infusión y del extracto de metanol se evaluó utilizando el ensayo del edema de oreja en ratón inducido por el 12-o-tetradecanoilforbol-13 acetato (TPA), descrito por Carlson y col., 1985.



Para ello, se utilizaron dos grupos de 10 ratones hembra Swiss cada uno, de 25 a 30 g de peso. Los animales se trataron de acuerdo a los principios internacionales y regulaciones locales de cuidado y uso de animales de laboratorio (Canadian Council of Animal Care, 1993). Tuvieron libre acceso a una dieta comercial standart, agua *ad limitum* y se mantuvieron a una temperatura de  $22 \pm 1$  °C con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad.

La oreja derecha de cada ratón recibió una aplicación tópica de 2,5 µg de TPA disuelto en 10 µl de acetona (concentración 0,25 µg/ml) en cada lado de la oreja. La oreja izquierda, utilizada como control, recibió el vehículo.

Inmediatamente después de la aplicación de TPA, se administró 1 mg/oreja de la infusión o del extracto de metanol, disueltos en etanol - agua (80:20). Se utilizó indometacina (0,5 mg / oreja / 20 µl) como control positivo de referencia.

Después de 4 h de la administración de TPA, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se cortaron con un sacabocados, discos de 5 mm de diámetro de cada oreja para determinar su peso. La diferencia de peso entre la oreja derecha e izquierda se tomó como expresión del edema y se calculó el porcentaje de inhibición del edema en los animales tratados con respecto al grupo control, según la expresión:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\Delta (\text{Od-OI}) \text{ tratado} - \Delta (\text{Od-OI}) \text{ control}}{\Delta (\text{Od-OI}) \text{ control}}$$

donde, Od: oreja derecha; OI: oreja izquierda

Los resultados fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza de una vía. Se utilizó el enayo de Dunnett (Graph a pad in Stat, 1998) para determinar las diferencias entre los valores de las medias. Un valor de probabilidad  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Todos los datos se expresaron como media  $\pm$  ESM.

#### **4.9.3. Actividad antioxidante**

Se determinó sobre el extracto de metanol, la infusión, el dializado y las aguas



de diálisis obtenidos según se indicó anteriormente en este capítulo.

Los extractos y fracciones de pesaron y se disolvieron en metanol o en agua según su solubilidad, en diferentes concentraciones.

#### **4.9.3.1. Determinación de actividad eliminadora del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH)**

La capacidad eliminadora de radicales libres, considerada como un índice de actividad antioxidante, se determinó a través de la medición del radical libre difenilpicrilhidrazilo (DPPH) según la metodología de Blois (1958). De acuerdo a este método, se determina por espectrofotometría al visible la absorción del DPPH a 517 nm en su forma de radical, en presencia y ausencia de muestra.

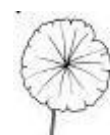
Cuando el radical se reduce por acción de una sustancia antioxidante, su absorbancia decrece.

Para el ensayo se hicieron reaccionar 100 µl de las muestras constituidas por la infusión, el dializado y las aguas de diálisis en diferentes concentraciones (1000 µg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml y 0,1 µg/ml) en 400 µl de buffer Tris-clorhídrico (100 mM), con 500 µl de una solución de DPPH preparada en etanol absoluto (500 µM). Se incubaron en oscuridad 20 minutos y se leyeron las absorbancias a 517 nm. Para calcular la actividad antioxidante, se comparó la absorbancia obtenida con la muestra y la obtenida con el control (buffer Tris-clorhídrico).

Los resultados se expresaron como actividad eliminadora de radicales libres (% respecto al control), según la siguiente ecuación:

$$\frac{[(\text{Abs muestra} - \text{Abs control}) / \text{Abs control}] \times 100}{}$$

Los valores representaron la media ± ESM de tres experimentos realizados por duplicado. Se calculó la concentración efectiva media de actividad antioxidante (CE<sub>50</sub>) por el método de Alexander (1999); la potencia se calculó como -log CE<sub>50</sub>.



Como control positivo de la actividad antioxidante, se analizaron diferentes concentraciones (0,1, 1, 10, 100, 1000 µg/ml) del ácido ascórbico (Vitamina C) (Burit y col., 2000).

El análisis estadístico de la varianza se realizó utilizando el test de Anova, seguido por el test de Dunnet. Los valores se consideraron significativos cuando  $p < 0,05$ .

#### **4.9.3.2. Determinación de actividad superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad se determinó según la técnica descrita por Carrillo y col, 1991. Este método se basa en la capacidad que puede tener un extracto en inhibir la oxidación espontánea de la adrenalina a adenocromo, a través de la reducción del oxígeno. La adrenalina se autooxida a pH 10,7 formándose un compuesto llamado adenocromo, de color rosado-rojizo que presenta absorción a 480 nm.

Las muestras ensayadas fueron la infusión, el dializado y las aguas de diálisis ensayadas en diferentes concentraciones (1000 µg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml y 1 µg/ml). Se adicionaron 910 µl de buffer fosfato 0,05 M, pH 10,7 (48,32 ml PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> 0,05 M + 1,68 ml NaOH 0,05 M); en el momento de comenzar la reacción se agregaron 40 µl de adrenalina 2 mM. Luego del agregado de la adrenalina, se midió la formación del adenocromo espectrofotométricamente a 480 nm en forma cinética durante 5 minutos (cada 10 segundos).

Se realizó un control de autooxidación de la adrenalina preparado con 960 µl del buffer fosfato 0,05 M, pH 10,7 y 40 µl de adrenalina.

Para calcular la actividad SOD, se determinó el  $\Delta$ Abs/min promedio (velocidad promedio) de la muestra obtenido en la porción lineal de la curva y el  $\Delta$ Abs/min promedio (velocidad promedio) de la adrenalina (control de autooxidación). Luego se calculó el % de inhibición (% de Inhib) de la oxidación de la adrenalina, aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhib} = (\Delta \text{Abs/min(adrenalina)} - \Delta \text{Abs/min(muestra)}) / \Delta \text{Abs/min(adrenalina)}$$



La actividad SOD se calculó teniendo en cuenta que 1 U SOD inhibe la autooxidación de la adrenalina en un 50 %.

Los resultados se expresaron como U/ml de actividad y representan la Media  $\pm$  ESM de tres experimentos realizados por duplicado.

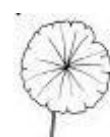
#### **4.9.3.3. Determinación de la capacidad reductora**

La determinación del poder reductor se realizó según la técnica descrita por Ferreira y col, 2007. La técnica se fundamenta en la reacción del ferricianuro de potasio o hexaciano ferrato III de potasio, con el extracto o compuesto que al tener capacidad reductora, reduce el Fe III a Fe II formando hexaciano ferrato II de potasio el que a su vez reacciona con cloruro férrico para dar un complejo que absorbe a 700 nm. Es decir, a mayor poder reductor mayor absorbancia. Para el estudio se realizó una curva de calibración con un antioxidante de referencia constituido por un estándar de ácido ascórbico en concentraciones de 2,5 a 80  $\mu\text{g/ml}$  en agua.

En un tubo de ensayo se colocaron 2,5 ml de la muestra o de la solución de referencia y se agregaron 2,5 ml de agua, 2,5 ml de buffer fosfato (pH 6,6; 0,2 M) y 2,5 ml de ferricianuro de potasio (10 mg/ml); se incubaron a 50 °C durante 20 minutos. Luego se retiraron los tubos del baño termostatzado y se colocaron

inmediatamente en un baño de hielo. Se agregaron 2,5 ml de ácido tricloroacético al 10 % y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se transfirieron 2,5 ml del sobrenadante a otro tubo y se agregaron 2,5 ml de agua destilada y 0,5 ml de tricloruro férrico al 0,1 %. Se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se determinaron las absorbancias a 700 nm. El blanco de muestra se realizó con agua destilada.

La capacidad reductora fue determinada para la infusión, el dializado y las aguas de diálisis ensayadas en diferentes concentraciones (1000  $\mu\text{g/ml}$ , 100



µg/ml, 10 µg/ml y 1 µg/ml). Los resultados se expresaron como absorbancia y representan la Media ± ESM de tres experimentos realizados por duplicado.

#### **4.9.3.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la peroxidación de los fosfolípidos del huevo**

La actividad antioxidante se determinó en un modelo de peroxidación de fosfolípidos en yema de huevo (Kuppusamy y col., 2002).

La técnica permite determinar la capacidad de una muestra de inhibir la formación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, que son los productos finales de la reacción de peroxidación lipídica o lipoperoxidación (degradación oxidativa de los lípidos). Este es el proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares. Este proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena de un radical libre. En la mayoría de los casos, afecta los ácidos grasos poliinsaturados debido a que contienen múltiples dobles enlaces entre los cuales se encuentran los grupos metileno, que poseen hidrógenos particularmente reactivos.

Al igual que cualquier reacción con radicales, ésta consiste en tres pasos fundamentales: iniciación, propagación y terminación.

La metodología empleada se basa en provocar la peroxidación de los fosfolípidos de la yema de huevo lo que produce aumento de malondialdehído, cuya producción se cuantifica espectrofotométricamente.

Las muestras analizadas fueron la infusión y el extracto de metanol ensayados en diferentes concentraciones (100 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml). Las diferentes concentraciones se mezclaron con 1 ml de yema de huevo, se emulsionaron con buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4) para obtener una concentración final de 25 g/l y 100 µl de Fe<sup>2+</sup> 1000 µM. La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora y luego se trató con 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 15 % recientemente preparado y 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico al 1 % (TBA).



Los tubos de reacción se mantuvieron en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Después de enfriar, los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos para eliminar la proteína precipitada. La formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se midió a 532 nm.

Como control de oxidación se utilizó yema de huevo, buffer fosfato y Fe<sup>2+</sup>. El blanco de extracto se preparó sin yema de huevo. Los valores del blanco se restaron de cada tubo de ensayo. Se usó butilhidroxitolueno (BHT) (1000 µg/ml) como compuesto antioxidante de referencia.

La actividad antioxidante se determina como la disminución en la producción de malondialdehído, que se observa como una disminución de la absorbancia.

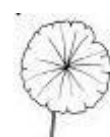
El resultado se expresa como % de inhibición (% de Inhib) según la expresión:

$$\% \text{ de Inhib} = (\text{Abs control} - \text{Abs muestra} / \text{Abs muestra}) \times 100$$

Los resultados se expresaron como % de inhibición y representan la Media ± ESM de tres experimentos realizados por duplicado.

#### **4.9.4. Actividad sobre la proliferación celular**

Todos los experimentos realizados con animales de laboratorio fueron diseñados acorde a los principios establecidos en *Guide for the care and use of laboratory animals* (U.S. National Research Council, 1996). Las técnicas utilizadas para el punto final humanitario se basaron en las *Recomendaciones para la Eutanasia de los Animales de Experimentación: Parte 1 y 2* (Comisión Europea, 1995). Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de experimentación con animales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Nro 220612-1.





#### **4.9.4.1. Metodología**

En el presente trabajo de tesis se utilizó una línea celular tumoral con el fin de evaluar los efectos antiproliferativos.

La línea celular BW5147 (ATCC) corresponde a un linfoma T inmaduro de ratón (cepa AKR/J), de origen espontáneo, con morfología linfoblástica. Expresa los siguientes marcadores: H-2 $\alpha$ ,  $\alpha\beta$ TCR y es sensible a cortisol (10<sup>-6</sup> M).

Dicha línea celular se mantuvo en cultivo con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) conteniendo antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin) y suero fetal bovino al 10 %. Las células se cultivaron en condiciones de esterilidad, en estufa de cultivo a 37 °C y con una tensión de CO<sub>2</sub> del 5 %.

- **Linfocitos**

Las células linfoides fueron purificadas a partir de ganglios linfáticos de ratones de cepas endocriadas BALB/c (H-2d) de 3-4 meses de edad. Las suspensiones de las células T se obtuvieron en condiciones de asepsia por purificación de los ganglios linfáticos con lana de nylon (Cremaschi y col., 1989).

Todos los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos de microtitulación de fondo plano, en un volumen final de 0,2 ml.

- **Macrófagos peritoneales**

Los macrófagos (M $\emptyset$ ) fueron aislados del peritoneo de los ratones BALB/c por lavados con buffer Hank's (Sigma). Luego los lavados se centrifugaron 2 veces y el pellet se llevó a una concentración adecuada con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma con 10 % SFB) para disponer en placas de cultivo estériles de 96 pocillos.



La población de MØ se enriqueció cultivando las células peritoneales durante 2 h en estufa de cultivo gaseada (a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>), tiempo en el cual se adhirieron a la placa. Pasado este tiempo, las células no adherentes fueron removidas por lavados con Hank's frío. Todos los experimentos se realizaron inmediatamente después de la purificación de los MØ, con excepción de las determinaciones de ON, que se realizó 48 h posteriores a la obtención de las células (Martino y col., 2010).

#### **4.9.4.2. Determinación del efecto sobre la proliferación celular**

El efecto de diferentes concentraciones del extracto de metanol, la infusión, las aguas de diálisis y el dializado (entre 0,1 y 1000 µg/ml), se evaluó sobre la proliferación de los linfocitos tumorales y normales.

Para evaluar este efecto, se utilizó la técnica de captación de timidina tritiada (T 3H) (Perkin Elmer, 20 Ci/mmol). Para ello,  $2 \times 10^5$  células/ml (linfocitos tumorales) y  $2 \times 10^6$  células/ml (linfocitos normales) se incubaron en placas de 96 pocillos, junto con las diferentes concentraciones de las muestras y  $3,75 \times 10^{-3}$  µCi/µl de T 3H, la cual fue agregada en las últimas 24 h de cultivo. La incorporación de T 3H fue medida en un contador de centelleo líquido (Beckman, MD, USA) después de retener la fracción macromolecular insoluble en un filtro de fibra de vidrio GF/C.

La actividad proliferativa o antiproliferativa fue determinada como un incremento o una disminución en la captación de T 3H con respecto al control.

Para los ensayos de proliferación las células tumorales fueron incubadas durante 24 h con las muestras, siendo este el tiempo óptimo de actividad antiproliferativa. En el caso de los linfocitos normales, éstos fueron incubados durante 48 y 72 h.

Las muestras se disolvieron en etanol logrando que la concentración de alcohol final por pocillo no superara el 0,5 %.



En los linfocitos normales los resultados se expresaron en cpm (cuentas por minuto), mientras que en las células tumorales los resultados se expresaron como % de inhibición (% de Inhib) (Davicino y col., 2010) el que fue calculado como sigue:

$$\% \text{ de Inhib de la proliferación} = \frac{[(\text{cpm tratada} - \text{cpm basal}) / (\text{cpm basal})] \times 100}{}$$

Con los datos de los porcentajes de inhibición de la proliferación, se calcularon las concentraciones efectivas medias (CE<sub>50</sub>) y la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>), como Citotoxicidad según la expresión:

$$\text{Citotoxicidad} = (100 - \% \text{ viabilidad})$$

Estas concentraciones fueron calculadas por el método de Alexander (1999).

Los resultados representan la media  $\pm$  Error estándar de la Media (ESM) de tres experimentos realizados por triplicado.

El análisis estadístico de la Varianza se realizó utilizando el ensayo de ANOVA, seguido por el ensayo de Dunnet, utilizando el software Graph Pad PRISM™ (Graph P Software Inc., San Diego, Ca). Los valores se consideraron significativos cuando  $p < 0,05$ .

#### **4.9.4.3. Determinación del efecto sobre la viabilidad celular**

La viabilidad se evaluó a través de la técnica de tinción con azul tripan que consiste en colorear a las células con un colorante vital (que colorea de azul a células muertas).

Esto permite identificar en el microscopio de contraste de fases, linfocitos vivos de muertos y determinar así células vivas, células muertas y viables como (células vivas / totales) x 100, y calcular la citotoxicidad como (100 - % células viables).

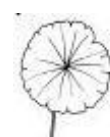


A partir de esos valores se calcula la  $CC_{50}$  (concentración citotóxica media) por el método de Alexander (trigonometría). La viabilidad sobre los linfocitos normales y los macrófagos se determinó luego de incubar las células durante 24, 48 y 72 h en presencia de diferentes concentraciones del extracto de metanol, la infusión, las aguas de diálisis y el dializado, entre 0,1 -1000  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **4.9.4.4. Determinación de nitritos totales**

Para determinar la producción de ON, los macrófagos se incubaron durante 24 h, sin ningún tratamiento (basal) o con glucosa (5,5; 11; 55; 110 mM) sola o en presencia de diferentes concentraciones de los extractos durante 24 h. Las células se centrifugaron luego a 900 rpm durante 10 minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante se separó para determinar los niveles de ON, se midió mediante la reacción de Griess (y N-( $\alpha$ -naftil) etilendiamida) (Becherel y col., 1997).

Seguidamente, se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de cada sobrenadante con 50  $\mu\text{l}$  de una solución de sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5 % y 50  $\mu\text{l}$  de una solución de dihidrocloruro de naftilenodiamina al 0,1 %. La mezcla se incubó luego a temperatura ambiente durante 10 minutos y se leyó la absorbancia a 550 nm. Como curva estándar, se emplearon diluciones seriadas (0-100  $\mu\text{M}$ ) de una solución de  $\text{NaNO}_2$ . Los niveles de ON se expresaron como  $\text{nM} / 10^6$  células. Cabe destacar que lo que se mide experimentalmente, son nitritos totales, entre los que se encuentra el ON en mayor concentración, lo cual significa que un aumento de nitritos totales representa un aumento de los niveles de ON.



*Tercera Parte*

*Resultados y Discusión*

## *Capítulo 5*

# *Estudio químico*

## 5.1. Extracción general y rendimientos

Las partes aéreas colectadas, secadas y reducidas a polvo de *H. bonariensis*, fueron sometidas a la secuencia extractiva que se presentó en el Capítulo 4 de este trabajo de tesis (**Figura 4.1**).

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

Los resultados se muestran en la **Tabla 5.1**. como puede observarse, los extractos de mayor polaridad resultaron con importante rendimiento. Por otra parte, resulta destacable que gran parte del material no fue extraído, lo cual sugiere claramente que deben existir otros metabolitos cuya obtención requiere el uso de solventes tales como el agua, por ej. hidratos de carbono.

**Tabla 5.1.** Rendimientos de los extractos de las partes aéreas de *Hydrocotyle bonariensis* obtenidos con solventes de polaridad creciente.

Extracto	Rendimiento (g)	Rendimiento (% P/P)
Cloruro de metileno	12,0664	3,00
Acetato de Etilo	5,7802	1,45
Metanol	62,055	15,51



## **5.2. Fraccionamiento y análisis de los extractos orgánicos**

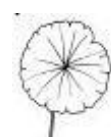
Teniendo en cuenta los antecedentes relacionados con la especie en estudio, los extractos orgánicos elegidos para profundizar su conocimiento en este trabajo de tesis fueron el de acetato de etilo y el de metanol.

La caracterización química de los extractos es uno de los pasos que se realizan para estudiar la composición de los mismos. En vista de los antecedentes científicos encontrados en distintos géneros pertenecientes a la familia Araliaceae (Deepa y col., 2013) se decidió realizar la determinación de polifenoles totales en el extracto de metanol de *H. bonariensis* (EM), mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (descrito en la sección 4.5.2 del capítulo de materiales y métodos de esta tesis) (Ferraro y col., 2008).

Los resultados obtenidos para el EM en la determinación de polifenoles totales se expresaron como equivalentes de ácido gálico por gramo de droga seca, resultando 48,5 mg GAE/g de *H. bonariensis*, como droga seca.

Paralelamente, los extractos fueron fraccionados mediante técnicas cromatográficas, tal como se describió en el capítulo de materiales y métodos. Las técnicas cromatográficas son una herramienta de mucha utilidad para el estudio de productos naturales ya que permiten de una manera sencilla separar e identificar los metabolitos presentes en la planta o en sus extractos. Las principales fracciones obtenidas se analizaron en su composición, en distintos sistemas cromatográficos. Para aquellos productos que resultaron promisorios para profundizar el conocimiento químico en relación a los usos medicinales y actividades biológicas, se efectuaron estudios más avanzados mediante HPLC y espectroscopía.

Como mencionamos anteriormente, uno de los grupos químicos de interés dada su directa relación con gran parte de los usos descritos para la especie en estudio, son los derivados fenólicos. Por ello, también realizamos análisis mediante cromatografía, fundamentalmente planar, a fin de determinar el perfil de los extractos y fracciones en referencia a su composición en ácidos





orgánicos, ácidos fenólicos y flavonoides. Los sistemas cromatográficos empleados (I, II, III y IV) se describieron en el Capítulo 4 de esta tesis.

Se compararon los resultados obtenidos con las distintas fracciones frente a estándares de referencia.

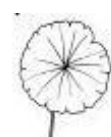
### **5.2.1. Fraccionamiento y análisis del extracto de acetato de etilo**

El extracto de acetato de etilo fue fraccionado mediante cromatografía en columna empleando, Sephadex LH20 y mezclas de diclorometano y metanol hasta llegar a metanol solo. Como resultado se obtuvieron un total de 95 fracciones, las cuales fueron agrupadas de acuerdo al perfil cromatográfico obtenido con ácido acético al 25 % sobre celulosa UV<sub>254</sub>. (**Figura 5.1**)

A partir de los perfiles obtenidos, se reagruparon fracciones tal como se describió en la sección 4.4.2 de materiales y métodos. De ellas surgieron 3 grupos interesantes en cuanto a los derivados fenólicos y flavonoides evidenciados en los cromatogramas. Estos fueron las subfracciones 43, 44 y 45, que se reunieron (**1**); las 46, 47 y 48 que precipitaron en frío y también se reunieron (**2**), y las subfracciones 61 a 66 que presentaron igual comportamiento en frío y se reunieron (**3**). En la **Tabla 5.2**, se describen los R<sub>f</sub> y los colores de las subfracciones reunidas obtenidos mediante cromatografía en capa delgada.

Los 3 grupos de subfracciones así obtenidos (**1**, **2**, **3**), fueron desarrollados en otra cromatografía en columna empleando Sephadex LH20 y mezclas de diclorometano y metanol hasta llegar a metanol solo. (**Figura 5.2**)

De allí surgieron 31 nuevas fracciones, para el grupo **2** que presentó el perfil más interesante, las cuales mediante una TLC sobre sílica gel desarrollada con acetato de etilo – ácido fórmico – ácido acético – agua (100:11:11:26), mostraron 2 zonas destacables que llamamos **14** y **15**. Los perfiles fueron corroborados también en otros sistemas cromatográficos planares como se describió en materiales y métodos. De allí, finalmente se obtuvieron mediante

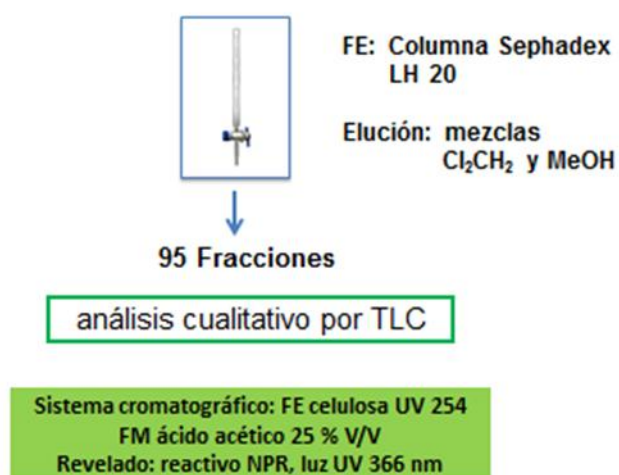


cromatografía en papel preparativa, con ácido acético al 15 %, 5 zonas para la muestra **14** (14/1 – 14/5) y 3 zonas para la muestra **15** (15/1 – 15/3).

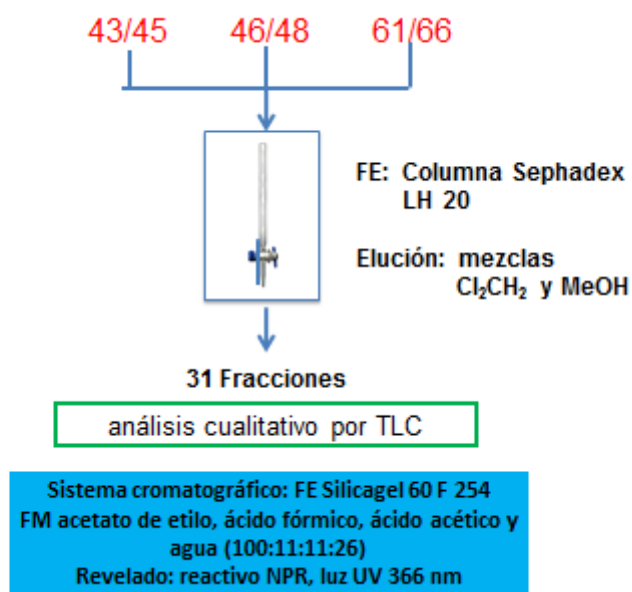
**Tabla 5.2.** Resultados del perfil cromatográfico de las subfracciones, provenientes del fraccionamiento mediante cromatografía en columna Sephadex LH20, del extracto de acetato de etilo de las partes aéreas de *H. bonariensis*, obtenidos mediante el **Sistema I**.

Subfracciones	Rf	Color
46/48; 61/64; 65/66	0,6	naranja
28/33; 61/64	0,9	naranja
43/45	0,5	celeste
43/45	0,8	celeste
61/64; 65/66	0,3	naranja

**Sistema I.** FE: Silicagel gel 60 F254; FM: acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético - agua (100:11:11:26).



**Figura 5.1.** Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo de las partes aéreas de *H. bonariensis*, mediante cromatografía en columna empleando, Sephadex LH20

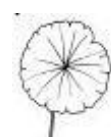


**Figura 5.2.** Cromatografía en columna empleando Sephadex LH20, de las fracciones seleccionadas de la columna anterior (**Figura 5.1**)

### 5.2.2. Espectroscopía de absorción UV-Vis

Tal como describen Cuesta y col. (2015), en *Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides*, la espectroscopia UV-Vis asistida por el empleo de reactivos de desplazamiento batocrómico, es una herramienta útil para confirmar estructuras o identificar determinadas características estructurales de los metabolitos aislados de las plantas.

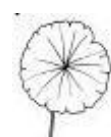
El espectro UV, determinado en solución de metanol, presenta dos máximos de absorción característicos de estos compuestos: la banda I, de  $\lambda$  300-360 nm y la banda II a  $\lambda$  240-285 nm. Las posiciones de estas bandas y las intensidades relativas de los máximos de absorción brindan información acerca del tipo de flavonoide y del patrón de sustitución, específicamente de oxigenación. Generalmente, los cambios en la sustitución de los anillos B y C de un flavonoide se visualizan en la



absorción de la banda I y la sustitución del anillo A se ve reflejada en la absorción de la banda II. La hidroxilación, está dada por el corrimiento de una determinada banda hacia mayores longitudes de onda; mientras que la metilación o glicosidación produce corrimientos hacia menores longitudes de onda.

Frente al agregado de reactivos específicos a la solución de metanol del flavonoide, que reaccionan con uno o más de los grupos funcionales, se inducen cambios en el espectro UV, ya que provocan desplazamientos de las bandas de absorción de acuerdo al patrón de oxigenación del compuesto en estudio, lo cual nos es útil para la elucidación estructural de productos naturales. Los reactivos utilizados son: metóxido de sodio (NaOMe), tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), tricloruro de aluminio + ácido clorhídrico ( $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  cc), acetato de sodio (NaAcO) y acetato de sodio + ácido bórico ( $\text{NaAcO} + \text{H}_3\text{BO}_3$ ).

En condiciones generales, el agregado de MeONa, base fuerte, a la solución de metanol del flavonoide, ioniza todos los grupos hidroxilos presentes en el núcleo. Por lo que en la mayoría de los flavonoides hidroxilados, se producen corrimientos de las bandas I y II hacia mayores longitudes de onda. La degradación del espectro en el tiempo indica la presencia, en la molécula, de grupos sensibles a álcali. En tanto, la adición de  $\text{AlCl}_3$  forma complejos ácidos-estables entre los grupos hidroxilo y cetona (C-4) y complejos ácidos-lábiles con grupos orto-diOH, tanto en el anillo A como en el anillo B de los flavonoides. El agregado de NaAcO, una base débil, a la solución metanólica de un flavonoide, produce la ionización de los grupos OH más ácidos del compuesto. Esto permitiría detectar la presencia de un grupo OH en posición C-7. En tanto, el reactivo  $\text{NaAcO}/\text{H}_3\text{BO}_3$  forma complejos con los grupos orto-

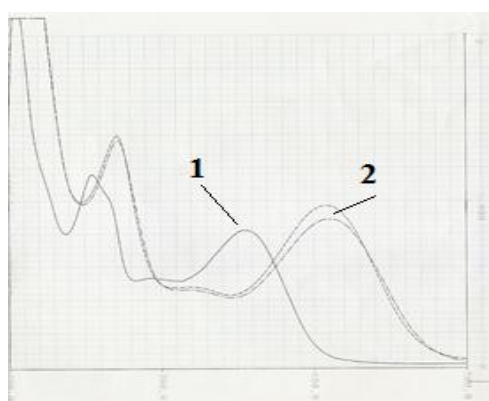


diOH presentes en las moléculas de los flavonoides y produce corrimiento de ambas bandas (Mabry y col., 1970; Cuesta y col., 2015).

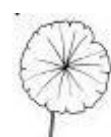
Por lo cual, la identidad de los compuestos aislados mediante purificación de las muestras **14** y **15** por cromatografía sobre Sephadex como se describió en los párrafos anteriores, fue determinada por espectroscopía UV-Vis en MeOH y mediante desplazamientos producidos por la adición de sales, en comparación con los espectros obtenidos de sustancias patrón o de referencia y bibliografía.

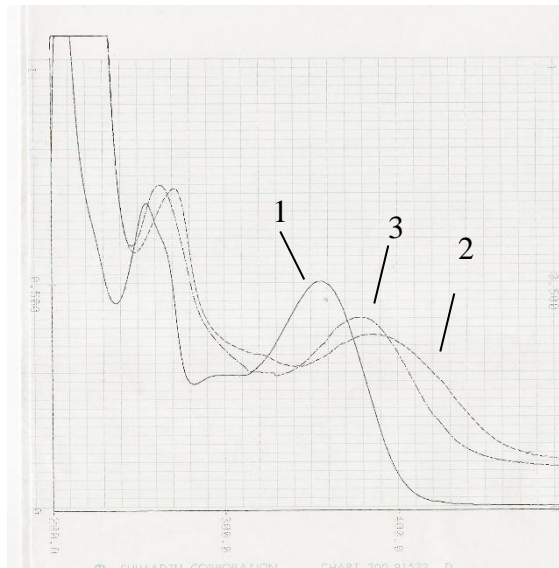
De todos los espectros obtenidos, resultaron importantes y definidos los obtenidos con las sustancias purificadas como 14/2, 14/3 y 15.

Las **Figuras 5.3** a **5.5** corresponden a los espectros de la muestra **14/2**. Resulta evidente que la sustancia se corresponde con un flavonol ya que posee ambas bandas de absorción marcadas, esto es la banda I a 356 nm y la banda II a 255 nm. Con metóxido de sodio (**Figura 5.3**) y con acetato de sodio (**Figura 5.4**), fueron observados corrimientos batocrómicos. Con cloruro de aluminio también se observó un marcado corrimiento batocrómico de los máximos, mientras que, al agregarle ácido clorhídrico, el espectro inicial se recuperó (**Figura 5.5**); esto condice con la presencia de hidroxilos fenólicos en C5 y/o en C3, además de otros adyacentes en el anillo A y/o en el anillo B (sustituyente arilo en el C2 del anillo C de los flavonoides).

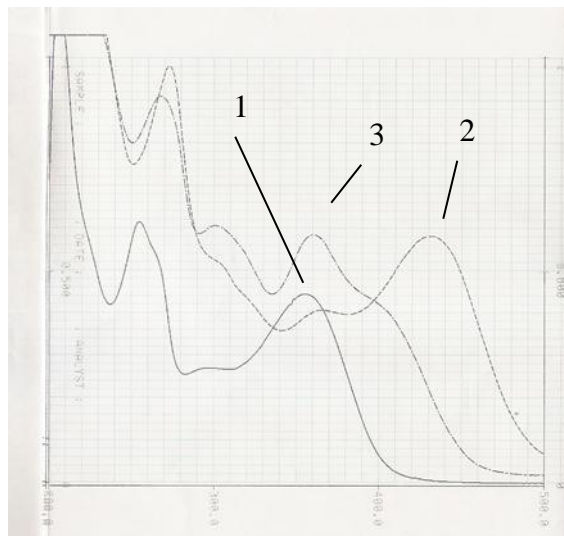


**Figura 5.3.** Espectro UV de la fracción **14/2** obtenida por fraccionamiento sucesivo del extracto de acetato de etilo (EAE) de las partes aéreas de *H. bonariensis*, en metanol (1) y en presencia de metóxido de sodio (2).





**Figura 5.4.** Espectro UV de la fracción **14/2** obtenida por fraccionamiento sucesivo del extracto de acetato de etilo (EAE) de las partes aéreas de *H. bonariensis*, en metanol (1) y en presencia de acetato de sodio (2), seguido de ácido bórico (3).



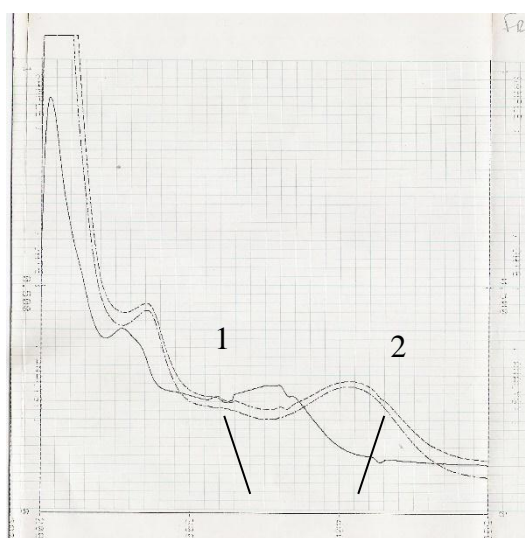
**Figura 5.5.** Espectro UV de la fracción **14/2** obtenida por fraccionamiento sucesivo del extracto de acetato de etilo (EAE) de las partes aéreas de *H. bonariensis*, en metanol (1) y en presencia de tricloruro de aluminio (2), seguido de HCl (3).



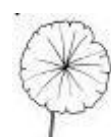
Comparando los espectros obtenidos en MeOH y los desplazamientos con los reactivos usuales empleados en esta tesis al analizar la subfracción 14/2 del extracto de acetato de etilo (EAE), con los espectros de sustancias patrón y con bibliografía (Mabry y col., 1970), la muestra **14/2** se corresponde con la **quercetina-3-O-metiléter**.

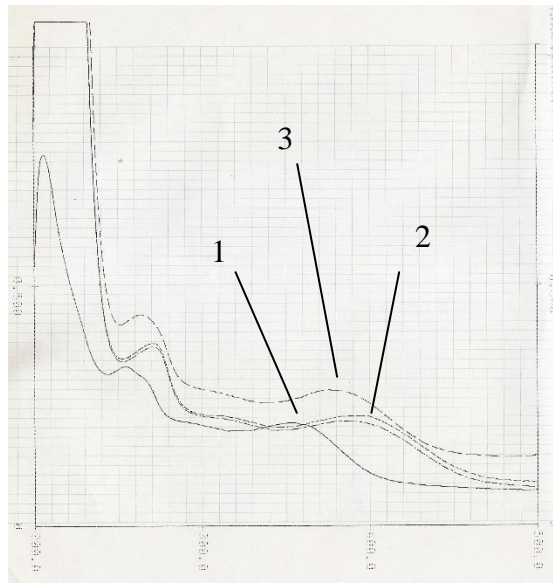
Por otra parte, se analizó también el comportamiento al UV en metanol y en distintos reactivos de desplazamiento, de la subfracción del extracto de acetato de etilo que denominamos muestra 14/3.

Las **Figuras 5.6 a 5.8** presentan los espectros obtenidos. Como puede observarse, los espectros guardan una similitud importante con los correspondientes a la muestra 14/2. Sin embargo, el máximo correspondiente a la banda I en este caso es un tanto más alto; por otra parte, frente al acetato de sodio y posterior agregado de ácido bórico, el comportamiento cambia con respecto a lo determinado para 14/2, evidenciando otro compuesto.

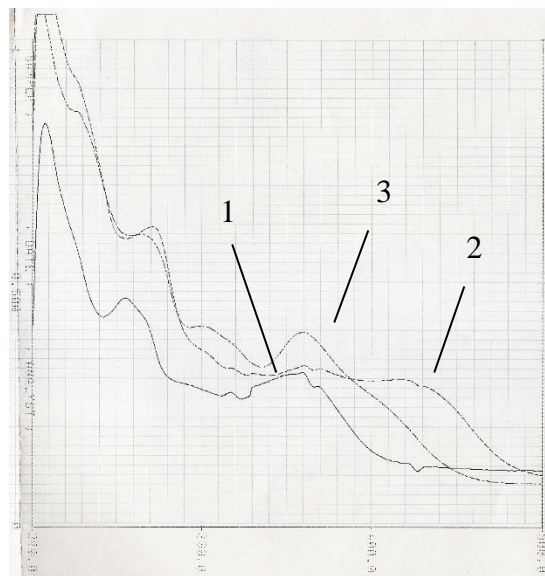


**Figura 5.6.** Espectro UV de la fracción **14/3** obtenida por fraccionamiento sucesivo del extracto de acetato de etilo (EAE) de las partes aéreas de *H. bonariensis*, en metanol (1) y en presencia de metóxido de sodio (2).





**Figura 5.7.** Espectro UV de la fracción **14/3** obtenida por fraccionamiento sucesivo del extracto de acetato de etilo (EAE) de las partes aéreas de *H. bonariensis*, en MeOH (1) y en presencia de acetato de sodio (2), seguido de ácido bórico (3).



**Figura 5.8.** Espectro UV de la fracción **14/3** obtenida por fraccionamiento sucesivo del extracto de acetato de etilo (EAE) de las partes aéreas de *H. bonariensis*, en MeOH (1) y en presencia de tricloruro de aluminio (2), seguido de HCl (3).

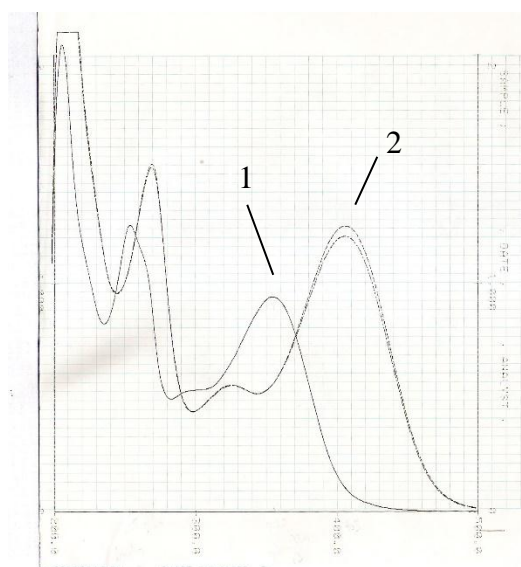




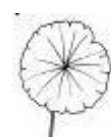
Sobre la base del análisis efectuado y por comparación de los espectros obtenidos en MeOH y con los reactivos usuales empleados en este estudio, con los espectros de sustancias patrón y con bibliografía (Mabry y col., 1970), la muestra **14/3** se corresponde con la **quercetina-3-O-galactósido (hiperósido)**.

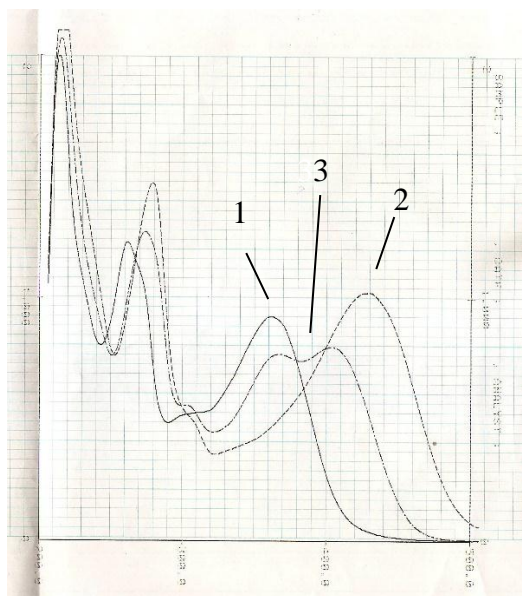
También analizamos los espectros de la muestra **15** obtenida a partir del subfraccionamiento del extracto de acetato de etilo. Si bien había originado 3 nuevas subfracciones, decidimos trabajarla en conjunto por la similitud del comportamiento de todas ellas en los sistemas cromatográficos empleados y la cantidad disponible de muestra.

Las **Figuras 5.9 y 5.10** muestran los espectros obtenidos al UV en metanol y con el agregado de cloruro de aluminio, seguido de ácido clorhídrico.



**Figura 5.9.** Espectro UV de la fracción **15** obtenida por fraccionamiento sucesivo del extracto de acetato de etilo (EAE) de las partes aéreas de *H. bonariensis*, en metanol (1) y en presencia de metóxido de sodio (2).

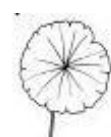




**Figura 5.10.** Espectro UV de la fracción 15 obtenida por fraccionamiento sucesivo del extracto de acetato de etilo (EAE) de las partes aéreas de *H. bonariensis*, en MeOH (1) y en presencia de tricloruro de aluminio (2), seguido de HCl (3)

Los espectros UV de la muestra **15**, en MeOH y tras el agregado de cloruro de aluminio seguido de ácido clorhídrico, en comparación con los espectros de sustancias patrón y con bibliografía (Mabry y col., 1970), sugieren que contiene fundamentalmente 3,4',7-trihidroxiavona, con restos de alguna otra sustancia semejante (**Figuras 5.9 y 5.10**).

En la **Tabla 5.3** se resumen los resultados obtenidos a partir del análisis de los espectros que se presentaron en las figuras precedentes.



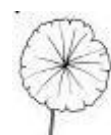
**Tabla 5.3.** Resultados del análisis espectrofotométrico de los constituyentes principales de las subfracciones mayoritarias del extracto de acetato de etilo (EAE) de las partes aéreas de *H. bonariensis*. (*n.d.*: no determinado; probable; 1: quercetina-3-*O*-metiléter; 2: quercetina-3-*O*-galactósido (hiperósido); 3: 3,4',7-trihidroxiflavona).

EAE	$\lambda_{\text{máx nm}}$						Metabolito Probable
	MeOH	NaOMe	NaAcO	NaAcO/ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	AlCl <sub>3</sub>	AlCl <sub>3</sub> / HCl	
14/2	255, 292h, 356	271, 322h, 410	262, 328h, 380	281, 321h, 385	280, 305h, 360h, 432	265, 300h, 360	1
14/3	255, 270h, 360	272, 410	270, 400	265, 380	275, 360, 432	265, 305h, 360	2
15	254, 268h, 295h, 355	270, 325h, 408	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	275, 305h, 365, 405	280, 310h, 430	3

### 5.2.3. Fraccionamiento y análisis del extracto de metanol

Tal como se describió en la sección 3.5 del capítulo de materiales y métodos de este trabajo de tesis, el extracto de metanol también fue analizado en su composición química, fundamentalmente en relación a los metabolitos de naturaleza fenólica, mediante distintos sistemas de cromatografía planar por comparación de  $R_f$  y comportamiento frente a la luz UV, como tal y previo revelado con reactivos específicos.

En las **Tablas 5.4 a 5.7**, se describen los  $R_f$  y los colores de los compuestos identificados en las fracciones mediante distintos sistemas cromatográficos, por comparación con estándares (se indican con un \*) y/o con bibliografía.



**Tabla 5.4.** Resultados del perfil cromatográfico del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*, obtenido mediante el **Sistema I**.

Compuesto probable	Rf / Color
Rutina	0,34 / naranja*
Hiperósido	0,49 / naranja*
ácido clorogénico	0,50 / celeste*
Isoquercitrina	0,55 / naranja
Quercitrina	0,68 / naranja
ácido isoclorogénico	0,80 / celeste
Quercetina	0,90 / naranja*

\*corroborado con el estándar correspondiente.

#### Sistema I.

FE: Silicagel gel 60 F<sub>254</sub>; FM: acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético - agua (100:11:11:26).

**Tabla 5.5.** Resultados del perfil cromatográfico del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*, obtenido mediante el **Sistema II**.

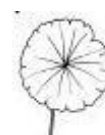
Compuesto probable	Rf / color
ácido gálico	0,20 / negro*
Gallicina	0,32 / violeta*

\*corroborado con el estándar correspondiente.

#### Sistema II.

FE: Silicagel gel 60 F<sub>254</sub>; FM: tolueno, metanol, ácido acético (90:16:8).

Revelado: observación a la luz UV de 254 nm y 366 nm. Posterior revelado con FeCl<sub>3</sub> al 5 % en etanol.



**Tabla 5.6.** Resultados del perfil cromatográfico del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*, obtenido mediante el **Sistema III**.

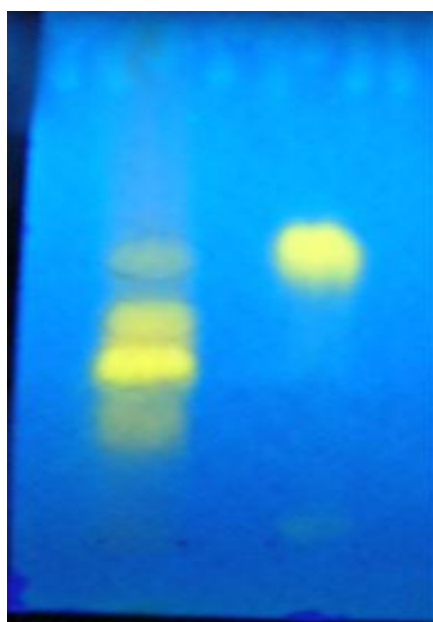
Compuesto probable	Rf / color
Hiperósido	0,34 / naranja*
Isoquercitrina	0,37 / naranja
Quercitrina	0,39 / naranja
Rutina	0,54 / naranja*

\*corroborado con el estándar correspondiente.

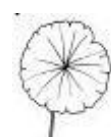
### Sistema III.

FE: Celulosa; FM: ácido acético al 15 % V/V.

Revelado: observación a la luz UV de 254 nm y 366 nm. Posterior revelado con NPR, secado y observación a la luz UV 366 nm.



**Figura 5.11.** Perfil cromatográfico en el **Sistema III** de una fracción purificada del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis* y una solución estándar de rutina.



**Tabla 5.7.** Resultados del perfil cromatográfico del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*, obtenido mediante el **Sistema IV**.

Compuesto probable	Rf / color
quercetina	0,12 / naranja*
hiperósido	0,54 / naranja*
ácido gálico	0,56 / marrón oscuro*
gallicina	0,70 / marrón*

\*corroborado con el estándar correspondiente

#### Sistema IV.

FE: Celulosa; FM: ácido acético al 40 % V/V. Revelado: observación a la luz UV de 254 nm y 366 nm. Posterior revelado con NPR, secado y observación a la luz UV 366 nm.

Como era de esperar, con metanol se extrajeron fundamentalmente los ácidos fenólicos y los derivados glicosilados de flavonoides. Resulta destacable que, en todos los sistemas dirigidos a este último grupo de metabolitos, pudo identificarse una sustancia que por su comportamiento cromatográfico permite inferir que se trata del hiperósido.

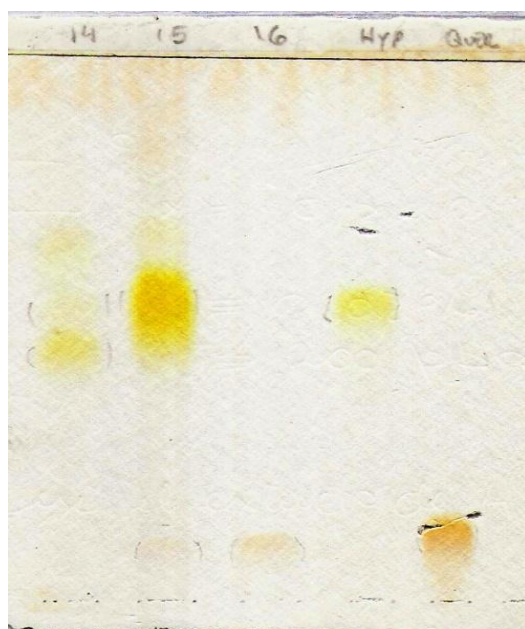
El hiperósido (quercetina 3-O-galactósido), también fue observado en los estudios de una subfracción del extracto de acetato de etilo, como se describió en párrafos anteriores. Probablemente en aquella muestra se extrajo el flavonoide, y con metanol se completó su extracción.

El extracto de metanol también contenía otros derivados de la quercetina (**Tablas 5.4 y 5.6; Figura 5.11**), quercetina (**Tablas 5.4 y 5.7**), ácido gálico y gallicina (**Tablas 5.5 y 5.7**), y ácidos clorogénico e isoclorogénico (**Tabla 5.4**).

La **Figura 5.12** muestra los resultados de subfracciones purificadas del extracto de metanol. Se destacan el hiperósido y la quercetina en otra de las fracciones.



Todos los metabolitos identificados resultan de importancia por sus actividades biológicas, sus implicancias ecológicas, como marcadores quimiotaxonómicos, entre otros.



**Figura 5.12.** Perfil cromatográfico de subfracciones purificadas del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*, y soluciones estándares de hiperósido y quercetina.

### **Sistema III.**

FE: Celulosa; FM: ácido acético al 25 % V/V. Revelado: observación a la luz UV de 254 nm y 366 nm; posterior revelado con NPR, secado y observación a la luz UV 366 nm.

Otros investigadores describen flavonoides en especies de la familia Araliaceae, como *Schefflera* spp., *Hedera* hélix, donde han aislado saponinas triterpénicas, flavonoides, poliacetilenos y compuestos fenólicos.

Estos estudios postulan la presencia de flavonoides en especies de la familia Araliaceae (Deepa y col., 2013; Young June Shin y col., 2015).

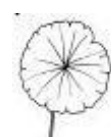
### **5.3. Análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD)**

Considerando los resultados descritos en las secciones anteriores del presente capítulo, decidimos analizar la composición de la subfracción **14** del extracto de acetato de etilo y del extracto de metanol, mediante un sistema cromatográfico instrumental, empleando un HPLC-DAD. Los detalles experimentales se describieron en la sección 4.6.2 del capítulo de materiales y métodos.

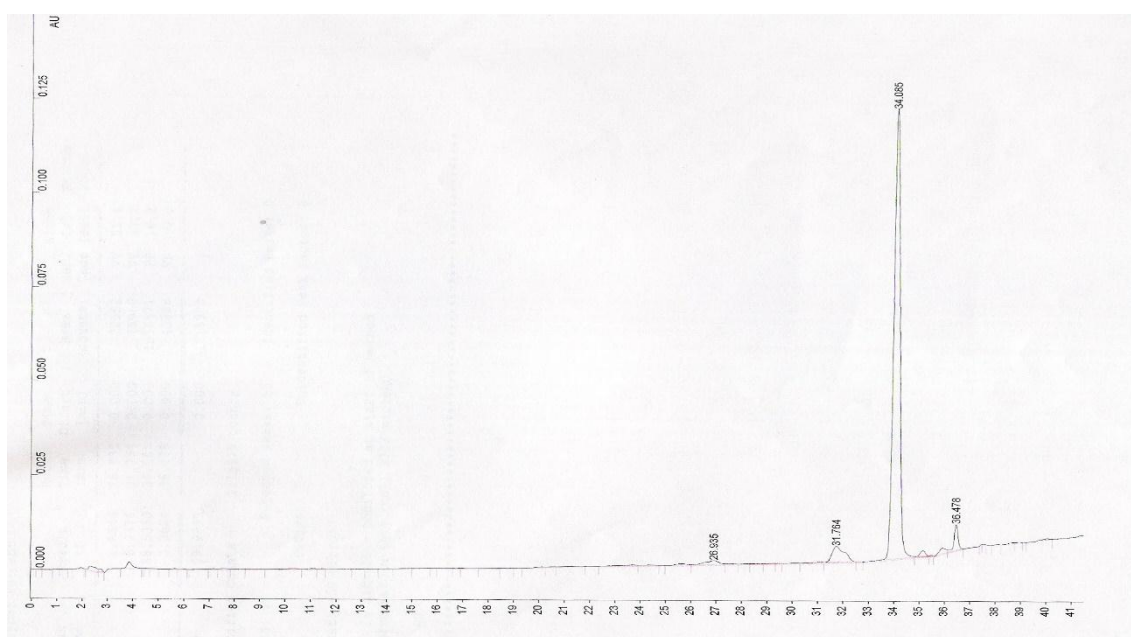
Las **Figuras 5.13** y **5.14** presentan los cromatogramas obtenidos. Los perfiles fueron comparados con los correspondientes a estándares y con bibliografía, permitiendo corroborar en la muestra **14**, la presencia de hiperósido como sustancia principal y dos señales muy pequeñas, en donde la de mayor tiempo de retención correspondería a la quercetina 3-O-metiléter (**Figura 5.13**). Ambos metabolitos los habíamos sugerido como probables a partir de las características espectrales que presentaban al UV las subfracciones de **14** (**Tabla 5.3**).

En cuanto al hiperósido, fue posible determinar, además, que representa un 0,02 % con respecto al peso seco de la droga vegetal constituida por las partes aéreas.

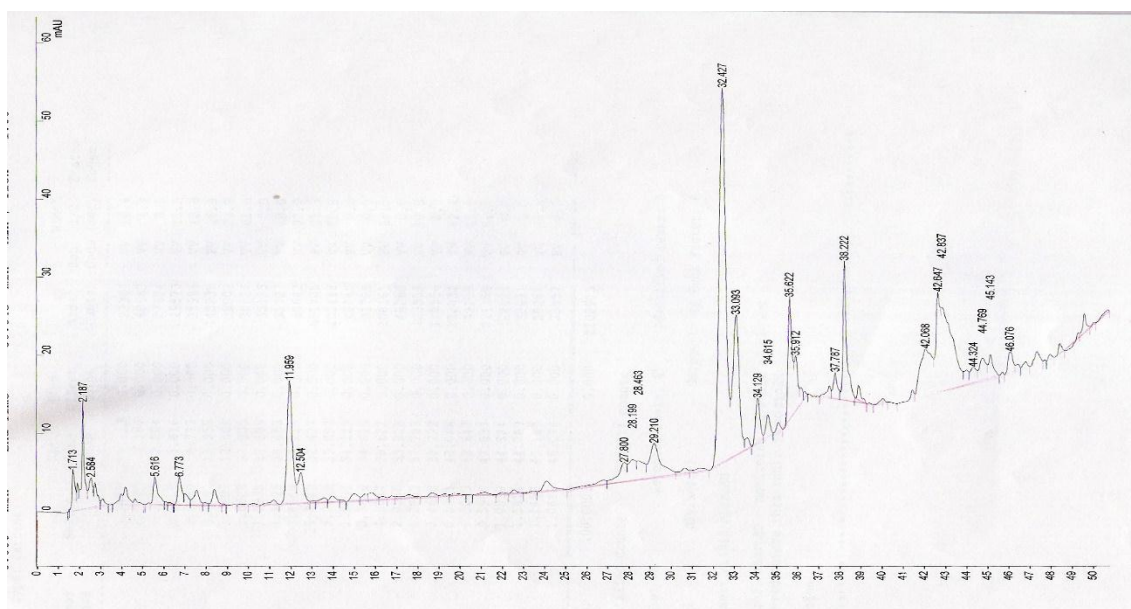
El extracto de metanol resultó de una complejidad importante, tal como puede observarse en el cromatograma obtenido (**Figura 5.14**). Fue posible corroborar la presencia de ácido clorogénico (Tr= 12,5 min), rutina (32,43 min), hiperósido (Tr= 34,13 min) y quercetina (Tr= 38,22 min). El ácido gálico y la gallicina probablemente corresponden a las señales de Tr= 5,62 min y 6,77 min.







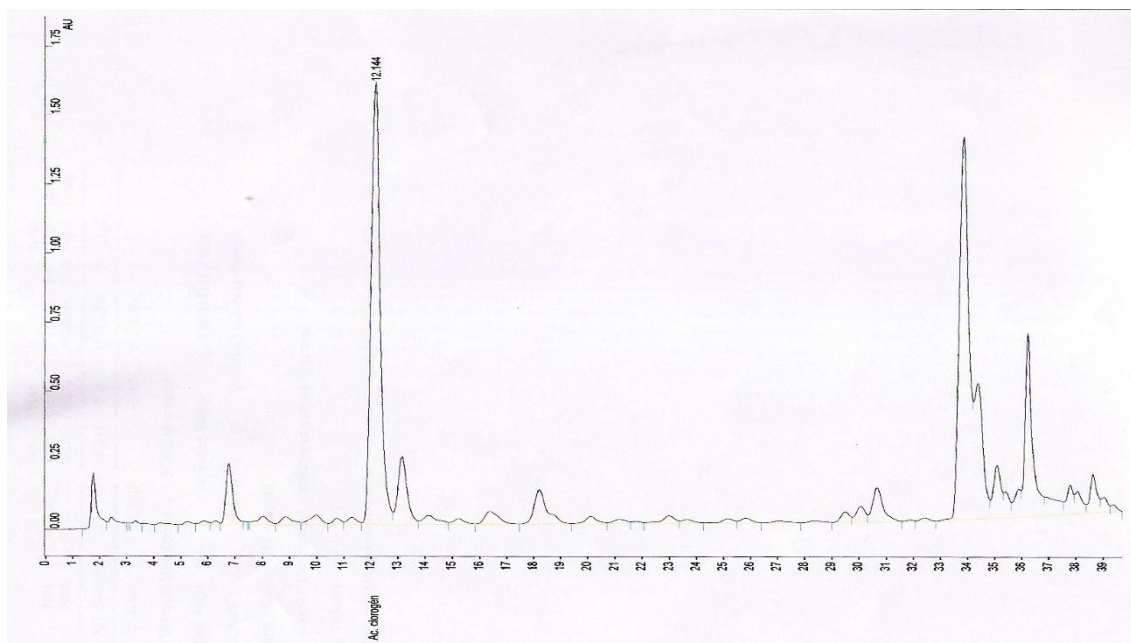
**Figura 5.23.** Perfil cromatográfico obtenido mediante HPLC-DAD, de la subfracción 14 del extracto de acetato de etilo de las partes aéreas de *H. bonariensis*. ( $T_r = 34,09$  min, corresponde al hiperósido).



**Figura 5.14.** Perfil cromatográfico obtenido mediante HPLC-DAD, del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*.

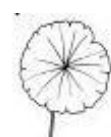


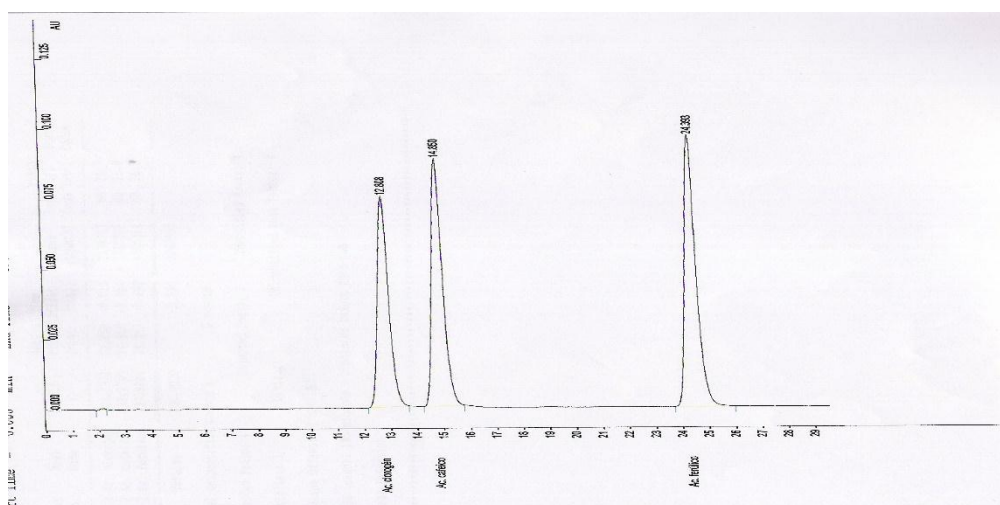
Por otra parte, se analizó también el perfil del extracto acuoso, correspondiente a la fase acuosa remanente de la partición con acetato de etilo del extracto de etanol al 80 %, llevado a seco y retomado con agua (ver **Figura 4.1** en el capítulo de materiales y métodos de este trabajo de tesis).



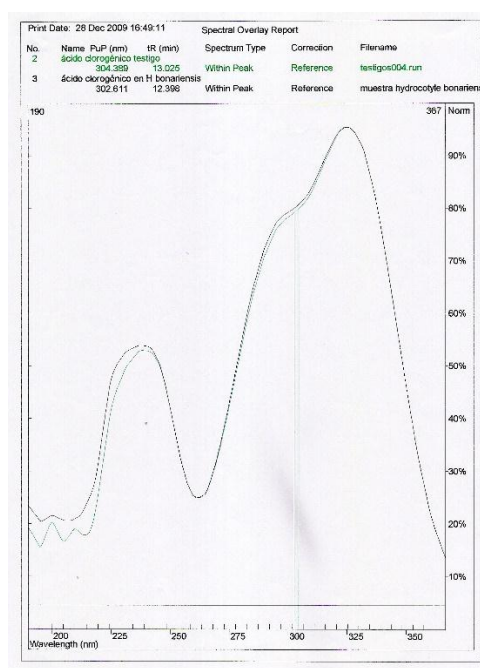
**Figura 5.15.** Perfil cromatográfico obtenido mediante HPLC-DAD, del extracto acuoso de las partes aéreas de *H. bonariensis*.

En el perfil cromatográfico del extracto acuoso de *H. bonariensis*, puede observarse la presencia de una señal mayoritaria, con un tiempo de retención de 12,2 minutos. Por comparación del tiempo de retención y del espectro UV con un estándar de referencia (**Figuras 5.16** y **5.17**, respectivamente), el metabolito fue identificado como **ácido clorogénico** y representó un 0,22 % del peso seco de las partes aéreas de la planta.



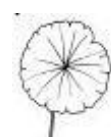


**Figura 5.16.** Perfil cromatográfico obtenido mediante HPLC-DAD de soluciones estándar de ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido ferúlico. ( $Tr_{\text{ác. clorogénico}} = 12,98 \text{ min}$ ;  $Tr_{\text{ác. cafeico}} = 15,05 \text{ min}$ ;  $Tr_{\text{ác. ferúlico}} = 24,79 \text{ min}$ ).



**Figura 5.17.** Espectro UV del ácido clorogénico y de la señal obtenida mediante HPLC-DAD a  $Tr = 12,98 \text{ min}$ .

En síntesis, podemos concluir que a partir del estudio de productos purificados a partir de los extractos de acetato de etilo (EAE) y de metanol (EM), mediante



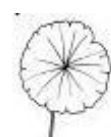
el uso de diversos sistemas cromatográficos planares e instrumentales, determinación de los espectros UV en metanol y tras el agregado de los reactivos usuales de desplazamiento, se identificaron importantes derivados fenólicos. Resultaron destacables por su importancia en Salud y por su rol como marcadores quimiotaxonómicos, el **ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico)**, el **metil 3,4,5-trihidroxibenzoato (galato de metilo, gallicina)**, el **ácido 3-O-cafeilquínico (ácido clorogénico)**, el **ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido isoclorogénico)**, y los flavonoides **3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona (quercetina)**, **quercetina-3-O- $\beta$ -rutinósido (rutina)**, **quercetina-3-O- $\beta$ -glucósido (isoquercitrina)**, **quercetina-3-O- $\beta$ -ramnósido (quercitrina)**, **quercetina-3-O-galactósido (hiperósido)**.

La clasificación quimiotaxonómica de los vegetales sobre la base de los principios activos mayoritarios, ha demostrado que con el uso de métodos instrumentales se puede determinar la autenticidad de los productos naturales y consecuentemente, la calidad de estos. En la actualidad la quimiotaxonomía vegetal hace uso de muy diversas metodologías analíticas, como la cromatografía de alta performance (HPLC) para analizar los flavonoides presentes en diferentes especies vegetales autóctonas (Romero y col., 2004).

Los flavonoides han sido dentro de los metabolitos secundarios, los más empleados en las determinaciones quimiotaxonómicas, dadas sus características estructurales (Harbone, 1994) y dada la particular abundancia que presentan en la familia Araliaceae.

#### **5.4. Análisis de saponinas en un extracto de metanol y en la infusión**

Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral buscaba contribuir al establecimiento de parámetros de calidad de la droga en estudio, para su aplicación en Salud. En este contexto, si bien se priorizó la investigación de metabolitos de polaridad importante dada su relación con los usos tradicionales



descriptos, sobre todo derivados fenólicos e hidratos de carbono, efectuamos un análisis preliminar de las saponinas en comparación con la *Centella asiatica* para verificar la presencia o ausencia de asiaticósido.

Para ello, tal como se describió en la sección 4.7 del capítulo de materiales y métodos, se preparó un extracto con metanol y se efectuó la cromatografía según lo descrito en la monografía “centella asiática” de la Farmacopea Argentina 7° Ed. (2013). La **Figura 5.18** presenta el cromatograma obtenido.



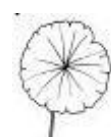
**Figura 5.18.** Perfil cromatográfico del extracto de metanol preparado según la monografía “centella asiática” de la Farmacopea Argentina 7° Ed. (2013), de las partes aéreas de *H. bonariensis*, y una solución estándar de asiaticósido.

#### **Sistema.**

FE: Sílica gel 60 F<sub>254</sub>; FM: butanol - 2-propanol – agua - metanol - amoníaco concentrado (30:30:20:5:1).

Revelado: aspersion con una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico (9:1), seguido de observación bajo la luz natural.

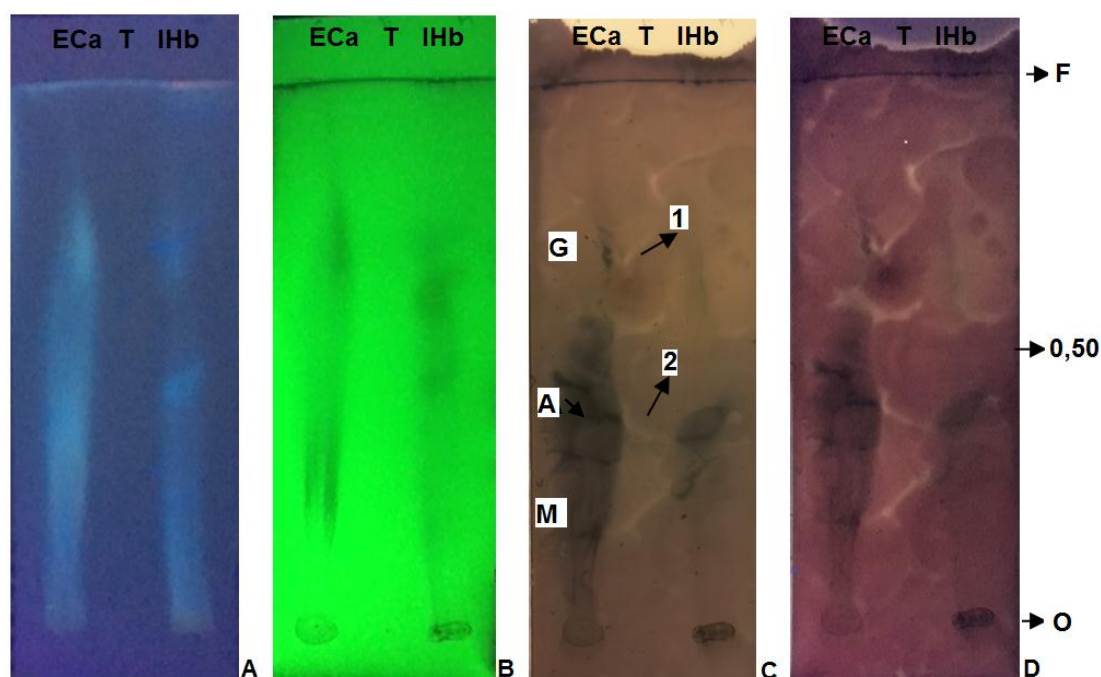
Como se observa en la **Figura 5.18**, en el extracto de metanol de *H. bonariensis* no se visualizó ninguna mancha que se corresponda en R<sub>f</sub> ni color



con el asiaticósido (aproximadamente 0,40, violáceo). Por debajo de la zona de este metabolito se evidenció para nuestro extracto, al menos 3 zonas de menor Rf y muy concentradas. Es posible inferir que se trate de otras saponinas denominadas bonarienosidos (A-E), que fueron descritas para los rizomas de la especie en estudio en esta tesis doctoral, por otros investigadores (Tabopda y col., 2012).

Por otra parte, decidimos analizar también la presencia de este grupo químico en la infusión que habíamos preparado considerando que es una de las formas de mayor uso en medicina tradicional.

En este caso se desarrolló una cromatografía en capa fina sobre Sílica gel G60F<sub>254</sub>, con cloroformo - ácido acético glacial - metanol - agua (60:32:12:8) (Wagner y Bladt, 2009). La **Figura 5.19** presenta el cromatograma obtenido.



**Figura 5.19.** Perfil cromatográfico de la infusión de las partes aéreas de *H. bonariensis* (IHb), en comparación con *Centella asiatica* (ECa) y una solución estándar de aescinol (1) y aescina (2).



### Sistema.

FE: Sílica gel G60F<sub>254</sub>; FM: cloroformo - ácido acético glacial - metanol - agua (60:32:12:8).

Revelado: luz UV<sub>365</sub> (A), luz UV<sub>254</sub> (B), aspersion con el reactivo anisaldehído - ácido sulfúrico en alcohol (0,05:10), seguido de calentamiento a 100 °C por 5-10 min y observación bajo la luz natural (C) y la luz UV<sub>365</sub> (D).

Tal como se observa en el cromatograma con los distintos reveladores empleados, pudieron definirse 3 zonas importantes tanto en el extracto de *Centella asiatica* (ECa) como en la infusión de *Hydrocotyle bonariensis* (IHb). En la primera, correspondiente a la zona central (Rf= 0,42), se observó el asiaticósido (A, indicado en la **Figura 5.19. C**). A diferencia de lo determinado en el extracto de metanol (**Figura 5.18**), este sistema cromatográfico permitió demostrar que *H. bonariensis* biosintetiza este metabolito y que se extrajo con agua mediante infusión.

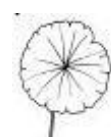
La segunda zona corresponde a la ubicada por debajo del asiaticósido (M, indicada en la **Figura 5.19. C**), y está representada fundamentalmente por madecasósido (mezcla de asiaticósido A, B); esta zona en *H. bonariensis* no fue observada.

Y una tercera zona con Rf mayores a 0,50 (0,65 – 0,75), correspondiente a geninas (G, indicada en la **Figura 5.19. C**); esta zona en *H. bonariensis* fue observada muy tenue.

El análisis efectuado, aunque preliminar, constituye un aporte no descrito anteriormente, que puede constituirse en una herramienta válida para el control de calidad de la droga vegetal empleada en medicina tradicional.

## 5.5. Estudio de la Infusión

Considerando que la forma más usual de la droga vegetal en estudio en medicina tradicional es la infusión, y teniendo en cuenta que no existían hasta



esta tesis, antecedentes del estudio de hidratos de carbono de *H. bonariensis*, se decidió preparar el infuso y profundizar el conocimiento de estos metabolitos (ver **Figura 4.2** en el capítulo de materiales y métodos de esta tesis).

El rendimiento del extracto fue alto, de 23,9 %, lo cual resultó interesante ya que sugería la presencia de sustancias polares extraíbles fácilmente con agua hervida, por digestión durante 20 min.

### **5.5.1. Estudios preliminares**

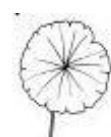
Los primeros estudios consistieron en determinar la proporción de los hidratos de carbono totales, el porcentaje de ácidos urónicos, de grupos sulfato, y los monosacáridos constituyentes del extracto. Los detalles experimentales fueron descritos en el capítulo de materiales y métodos de este trabajo de tesis.

La infusión (**I**) presentó un 25 % de hidratos de carbono totales, destacándose en su composición galactosa, ramnosa, glucosa y ácidos urónicos. Además, se determinó que contenía 5 % de ácidos urónicos y 7 % de grupos sulfatos, lo cual sumado a los monosacáridos constituyentes y a las características del extracto, evidenció la posible presencia de oligo y/o polisacáridos en la infusión.

### **5.5.2. Fraccionamiento de la infusión**

Teniendo en cuenta los primeros resultados, se decidió efectuar un primer fraccionamiento mediante diálisis cerrada, utilizando una bolsa de poro grande (es decir que solo permitiría mantener en el interior macromoléculas de masa molecular mayor a 6,000 – 8,000), como se indicó en el capítulo de materiales y métodos, a fin de intentar purificar el/los polisacáridos que pudieran estar presentes.

El fraccionamiento dio origen a dos productos que denominamos **Id** (dializado de la Infusión, correspondiente al material que quedó retenido dentro de la bolsa de diálisis) y **Iwd** (aguas de diálisis de la Infusión, lo que pudo salir de la





bolsa debido a que estaba constituido por sustancias de masa molecular más pequeña que pudieron atravesar los poros). En la **Figura 4.2** del capítulo de materiales y métodos se presentó el esquema de trabajo.

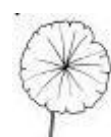
Los rendimientos de **ld** y de **lwd** fueron muy importantes, representando un 14,0 y un 85,0 %, respectivamente, con respecto al peso seco de la infusión. En la **Tabla 5.8** se presentan los resultados generales del extracto y sus fracciones.

Al efectuar la cuantificación de hidratos de carbono totales, **ld** resultó constituido casi exclusivamente por carbohidratos, conteniendo un cierto grado de sulfatación. Los ácidos urónicos representaron un 15 %.

A fin de conocer la naturaleza de los monosacáridos constituyentes, se desarrolló un perfil cromatográfico planar, previa hidrólisis de la muestra, el cual mostró que contenía galactosa y ramnosa (en una relación de aproximadamente 1:1), y ácido galacturónico. Estos resultados fueron semejantes a los obtenidos también para la infusión, aunque en el extracto se detectó también ácido glucurónico (**Tabla 5.8**).

Por otra parte, se analizó también **lwd**, fracción que representó un 85 % de la infusión. Su composición en hidratos de carbono evidenció además la presencia de restos de arabinosa (**Tabla 5.8**).

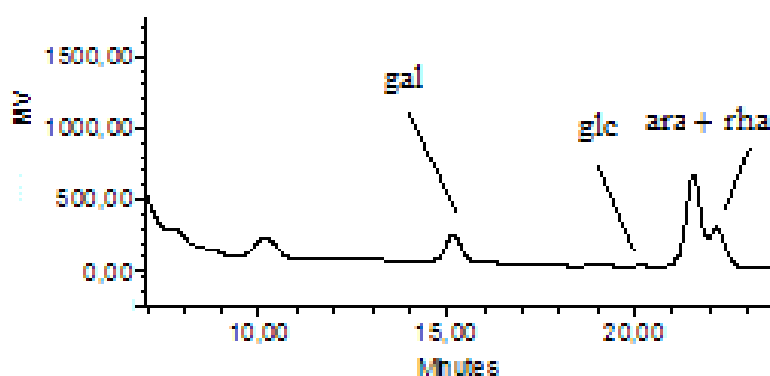
Los resultados que se habían obtenido hasta acá guardaban relación con la posible presencia de polisacáridos ácidos como ramnogalacturonanos y ramnogalactanos, los cuales han sido descritos en otras plantas medicinales, como responsables de actividades biológicas, incluyendo especies de las Araliaceae (Hsich y col., 2001; Lui y col., 2012; Dartora y col., 2013).



**Tabla 5.8.** Resultados del rendimiento y del análisis de los hidratos de carbono de la infusión y sus fracciones obtenidas mediante diálisis, de las partes aéreas de *H. bonariensis*.

MUESTRA	Rendimiento. (%)	H. de C. (%)	Ácidos urónicos (%)	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> (%)	H. de C.
I	23,9	25,0	5	7,1	gal, ram, glc, galA, glcA
Id	14,0	99,9	15	6,0	gal, ram, galA
lwd	85,0	47,0	5	4,0	gal, glc, ram, ara, glcA

La infusión previamente hidrolizada como se indicó más arriba fue analizada también mediante HPLC empleando un detector de índice de refracción (HPLC-RI) como se describió en el capítulo de materiales y métodos de esta tesis. La **Figura 5.20** muestra el cromatograma obtenido.



**Figura 5.20.** Cromatograma de la infusión hidrolizada de las partes aéreas de *H. bonariensis*, obtenido mediante HPLC-RI.



Como se observa en el cromatograma, si bien la resolución no fue completa, se pudo diferenciar que la infusión contenía además de los hidratos de carbono mencionados en la **Tabla 5.8**, arabinosa. En cuanto a los ácidos urónicos, pudo inferirse por comparación con estándares, que forman parte de la señal observada a 10,1 min (indicada con una flecha en la **Figura 5.20**).

### **5.5.3. Análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

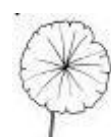
Por otra parte, a fin de analizar la presencia de posibles agregados macromoleculares, se realizó una electroforesis unidimensional sobre geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), para la infusión (**I**) y la fracción correspondiente al dializado (**Id**). Los detalles experimentales se describieron en la sección 4.8.6 del capítulo de materiales métodos de esta tesis.

Una vez coloreados ambos geles (uno para proteínas y el segundo para hidratos de carbono), se efectuó una tinción con plata para incrementar la sensibilidad y poder observarlos en detalle. Así se pudo determinar para **Id**, 8 zonas con masa molecular aparente entre 18,8 y 39,0 kDa, fundamentalmente en el gel que había sido tratado previamente con PA-Schiff para hidratos de carbono (**Tabla 5.9**). El otro gel mostró para **Id**, tres zonas de menor masa molecular, aunque muy tenues y menores de 20 kDa.

En el caso de la infusión (**I**), se observaron sólo dos zonas (**Tabla 5.9**), posiblemente porque la complejidad química del extracto completo dificultó el desarrollo y la separación mediante la electroforesis realizada.

En síntesis, es posible sugerir que podría haber algunos agregados macromoleculares con los polisacáridos, aunque no destacables en el caso de las proteínas.

Estos resultados son inéditos para la especie en estudio, inclusive para el género, ya que no había descripciones anteriores de este tipo de análisis.



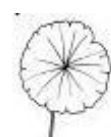
**Tabla 5.9.** Resultados de la electroforesis en SDS-PAGE de la infusión (**I**) y de la fracción dializada (**Id**) de las partes aéreas de *H. bonariensis*.

<b>Marcador de MW (kDa)</b>	<b>I (Infuso, kDa)</b>	<b>Id (fracción dializada, kDa)</b>
66,0		
45,0		
		39,3
36,0		38,4
		34,5
		32,7
29,0		29,4
		26,5
24,0	24,5	23,9
20,0	18,4	18,9
14,2		
5,6		

#### 5.5.4. Fraccionamiento secuencial de la infusión y de las aguas de diálisis

Teniendo en cuenta que mediante infusión se extraen diversos compuestos de naturaleza polar o medianamente polar, **I** e **Id** se fraccionaron mediante distintos procedimientos extractivos, los que se aplicaron secuencialmente (ver **Figura 4.3**, en la sección 4.8.3. del capítulo de materiales y métodos de esta tesis).

El tratamiento con una mezcla de cloroformo y metanol (2:1), conocida como extracción de Folch, destinada a la obtención de lípidos y ácidos grasos, como



era de esperar extrajo no más del 2 % en ambas muestras. A continuación, los residuos se trataron con urea 7 M, lo cual produjo una degradación total en ambos casos por lo que se analizaron en su composición.

#### **5.5.5. Fraccionamiento de los polisacáridos del dializado (Id) por cromatografía de intercambio aniónico y filtración por geles**

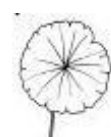
A fin de profundizar el conocimiento de los hidratos de carbono presentes en la infusión, se efectuó un subfraccionamiento cromatográfico de la fracción dializada de la infusión (**Id**), como se describió en la sección 4.8.4 del capítulo de materiales y métodos de esta tesis.

Esta metodología es empleada para muestras que contienen polisacáridos neutros, ácidos y/o sulfatados ya que permite separar por intercambio y por masa molecular (Stortz y col., 1997; Flores, 2000). En este caso se utilizó Sephadex DEAE A-50 (para separar los hidratos de carbono por carga o sea los neutros de los que contengan grupos sulfatos y/o ácidos urónicos), diluido o combinado con Sephadex G-100, un gel neutro que separa por tamaño molecular.

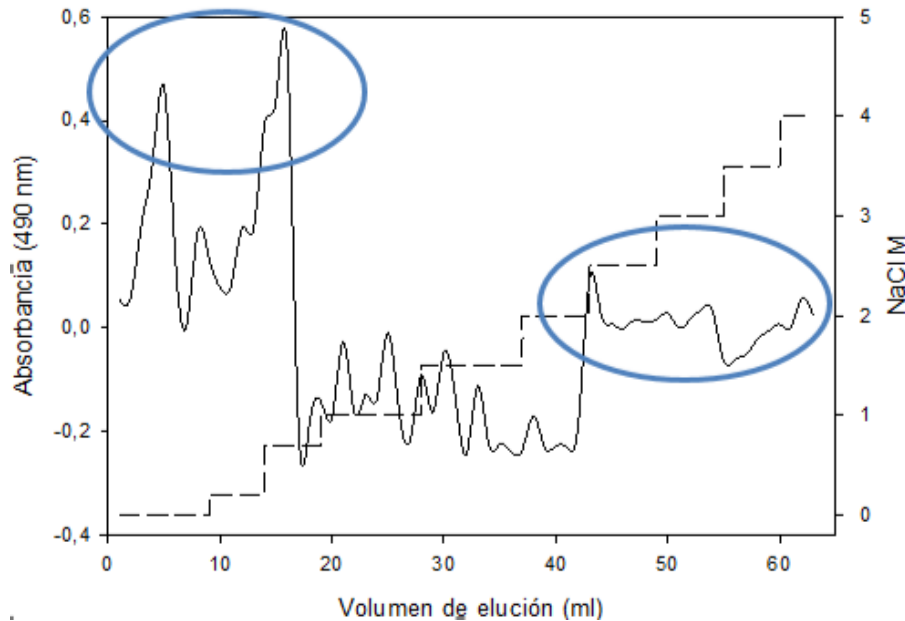
Las subfracciones fueron eluidas con concentraciones crecientes de NaCl desde 0 M (sólo agua) hasta 4 M. En todos los casos el perfil se obtuvo mediante el seguimiento de las subfracciones por el método del fenol-ácido sulfúrico, a 490 nm. Finalmente, las subfracciones obtenidas se reagruparon de acuerdo al perfil cromatográfico, se dializaron (bolsa de poro de 3,500) y se liofilizaron.

A partir del sistema cromatográfico empleado, **Id** dio como resultado tres fracciones principales. La **Figura 5.21** muestra el perfil obtenido.

Como se puede observar en el perfil, las fracciones eluidas con concentraciones de 0; 0,2 y 0,7 M de NaCl, fueron las más importantes, con un rendimiento > al 90 %. También se obtuvieron fracciones minoritarias (1 %), con 3,5 y 4 M de NaCl.



Las mayoritarias estaban compuestas por carbohidratos neutros o escasamente sulfatados (< de 3 %); las dos fracciones menores contenían derivados ácidos de hidratos de carbono y mayor sulfatación (> de 5 %).



**Figura 5.21.** Perfil obtenido mediante la cromatografía de intercambio aniónico y filtración por geles del dializado (**Id**) de la infusión de las partes aéreas de *H. bonariensis*.

De las mayoritarias, la fracción principal resultó ser la eluida con una concentración de 0,2 M de NaCl, indicando la presencia de importantes proporciones de polisacáridos neutros. Mediante cromatografía planar en papel empleando el sistema general descrito en el capítulo 4 de esta tesis, tal fracción evidenció que se hallaba compuesta mayoritariamente por ramnosa y galactosa. Esto condice con la probable presencia de un ramnogalactano como principal polisacárido.

La fracción eluida con NaCl 0,7 M, contenía galactosa, ramnosa y ácido galacturónico, con restos de sulfato, sugiriendo la posible presencia de galactoramnanos y galacturonanos.



Con NaCl de 1,5 a 2 M, se identificaron también ramnosa, galactosa y ácido galacturónico, sugiriendo la presencia de ramnogalacturonano y galactano sulfatado.

Por el contrario, como era esperable, las fracciones minoritarias resultaron ricas en ácido urónico y en galactosa con grupos sulfatos, sugiriendo la presencia de polisacáridos ácidos y altamente sulfatados, aunque en muy baja proporción.

Otros estudios realizados con polisacáridos de plantas medicinales también emplearon esta metodología, demostrando la presencia de diferentes hidratos de carbono enriquecidos en galactosa, manosa, ramnosa, con restos de otros constituyentes (Zhang y col., 2017).

Schetkin y col. (2005), purificaron mediante un sistema cromatográfico semejante cinco polisacáridos de tipo arabinogalactanos II de distinto tamaño molecular, a partir de las piñas de *Juniperus scopulorum* (Cupresaceae), responsables de una importante actividad inmunomoduladora.

En este trabajo de tesis también se realizó el fraccionamiento de las aguas de diálisis (**lwd**) resultantes de la diálisis de la infusión, aunque decidimos continuar trabajando sólo con el dializado dado que allí es donde se concentran los hidratos de carbono que estarían relacionados con los usos terapéuticos, particularmente los polisacáridos.

Los resultados alcanzados son los primeros para *Hydrocotyle bonariensis* y para el género.

#### **5.5.6. Análisis de la constitución de los polisacáridos del dializado (ld) por cromatografía gaseosa**

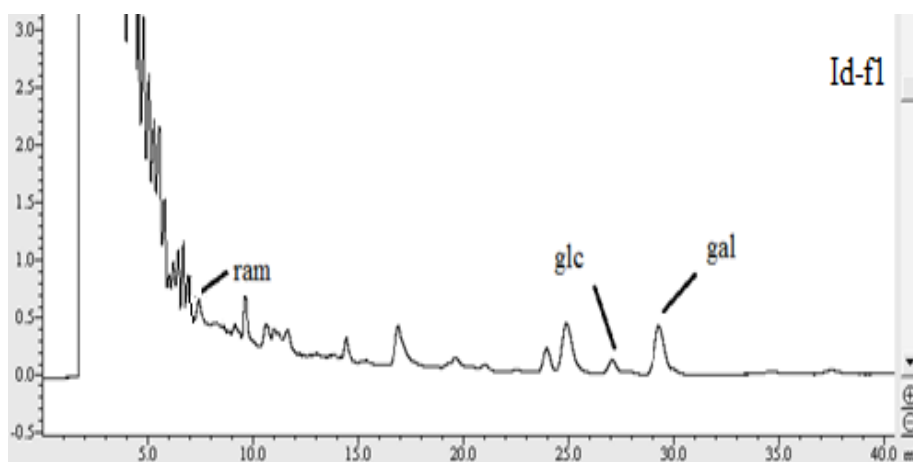
Teniendo en cuenta los resultados descriptos en la sección anterior, las principales fracciones eluidas y reagrupadas, fueron hidrolizadas y derivatizadas como aldononitrilos peracetilados, para su análisis mediante cromatografía gaseosa empleando nitrógeno como fase móvil. Los detalles



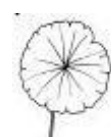
experimentales se describieron en la sección correspondiente del capítulo 4 de esta tesis.

En las tres fracciones, se corroboraron los resultados que habían sido obtenidos mediante cromatografía planar en papel en cuanto a los monosacáridos constituyentes (**Tabla 5.8**). Además, en la fracción de 0,2 M se detectaron restos de arabinosa y manosa en muy baja proporción (< 2 %), glucosa y xilosa; y en la de 0,7 M, glucosa; ambas no se habían resuelto en el papel. En cuanto a los ácidos urónicos, cabe mencionar que en la metodología de derivatización utilizada, no pueden ser determinados.

De todos, el perfil más interesante, que se presenta en la **Figura 5.22**, fue el de la fracción mayoritaria correspondiente a 0,7 M (**Id-f1**). Los resultados de la determinación de la composición porcentual se expresaron en áreas % y en moles % (**Tabla 5.10**).



**Figura 5.22.** Perfil de cromatografía gaseosa de **Id-f1** (subfracción eluida con 0,7 M de NaCl en una columna Sephadex DEAE A-50 / Sephadex G100), obtenida a partir del dializado de la infusión de las partes aéreas de *H. bonariensis*.





**Tabla 5.10.** Resultados de la determinación por cromatografía gaseosa, de los monosacáridos constituyentes de la subfracción eluida con 0,7 M de NaCl en una columna Sephadex DEAE A-50 / Sephadex G100), a partir del dializado de la infusión de las partes aéreas de *H. bonariensis*.

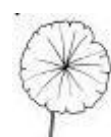
Monosacárido	t <sub>R</sub>	t <sub>Rr</sub> a ram	Área de la señal	Área (%)	Moles (%)
ramnosa	7,194	1,000	26179	28,0	<b>31,3</b>
glucosa	27,042	3,759	3526,3	3,7	<b>3,6</b>
galactosa	29,211	4,060	63958	68,3	<b>65,1</b>

Como se observa en el perfil, la galactosa fue claramente el monosacárido más importante. La muestra contenía también ramnosa y restos de glucosa.

Otros polisacáridos obtenidos de plantas medicinales, incluyendo especies de Araliaceae, y a los que se les ha atribuido actividades biológicas relacionadas con los usos que también posee *H. bonariensis*, han evidenciado galactosa y ramnosa como principales constituyentes (Hsich y col., 2001; Schepetkin y col., 2005; Lui y col., 2012; Dartora y col., 2013).

En cuanto a la proporción de cada monosacárido, como se puede ver en la **Tabla 5.10**, la galactosa con respecto a la ramnosa guarda una relación de 2:1. Por otra parte mediante cromatografía planar se determinó también la presencia de ácido galacturónico en el dializado que dio origen a esta fracción de 0,7 M (**Tabla 5.8**). De este análisis surge entonces que la fracción contendría galactoramnano y galacturonano, parcialmente sulfatados.

Estos resultados son los primeros que describen estudios de hidratos de carbono y en particular de polisacáridos, en *Hydrocotyle bonariensis*; cabe destacar además que los metabolitos caracterizados guardan relación directa con usos tradicionales de la especie.



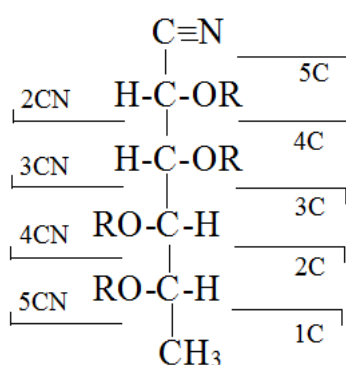
### 5.5.7. Análisis de hidratos de carbono por cromatografía gaseosa – espectrometría de masas (CGL-MS)

A fin de confirmar la identidad de los monosacáridos constituyentes, se efectuó también un estudio mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

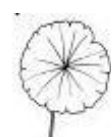
Para ello se trabajó con el extracto original, infusión (**I Hb**) y con la primera fracción mayoritaria del dializado (**F1 Hb**) obtenida mediante cromatografía de intercambio aniónico y filtración por geles, eluida con NaCl 0,2 M.

También en este caso se prepararon los aldononitrilos peracetilados a partir de las muestras previamente hidrolizadas. La identidad de todos los monosacáridos fue corroborada a partir de su espectro de masas.

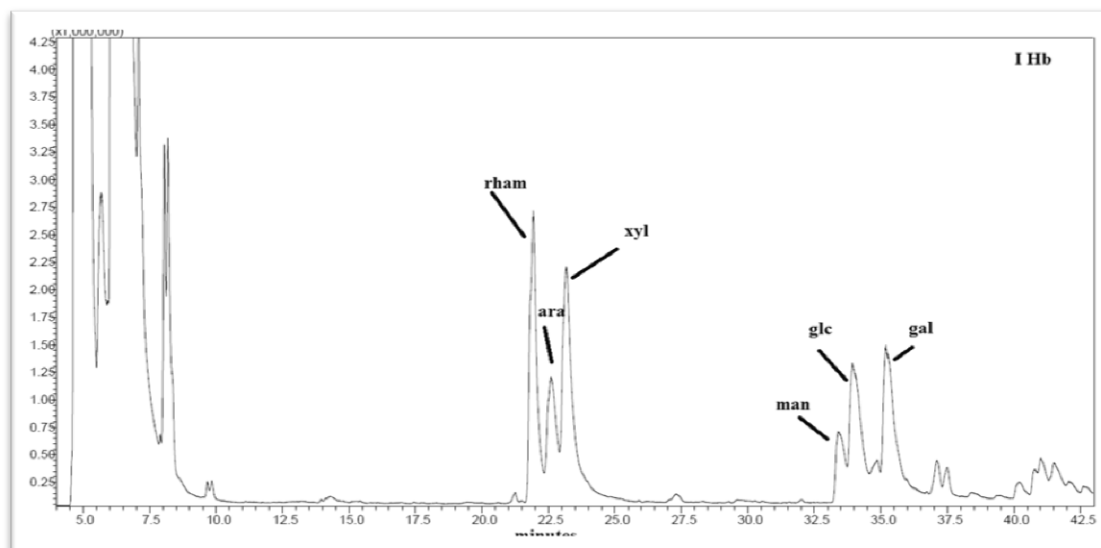
La **Figura 5.23** presenta un esquema de la nomenclatura utilizada para las distintas series de iones producidos a partir del nitrilo peracetilado de un desoxiazúcar, en este caso de la L-ramnosa (adaptación de lo indicado por Stortz, 1984). En ella se destaca la forma de nomenclatura que utiliza un número que se corresponde con la cantidad de átomos de carbono de la cadena principal y las letras CN o C, dependiendo si se trata del fragmento del extremo nitrílico o no nitrílico de la molécula.



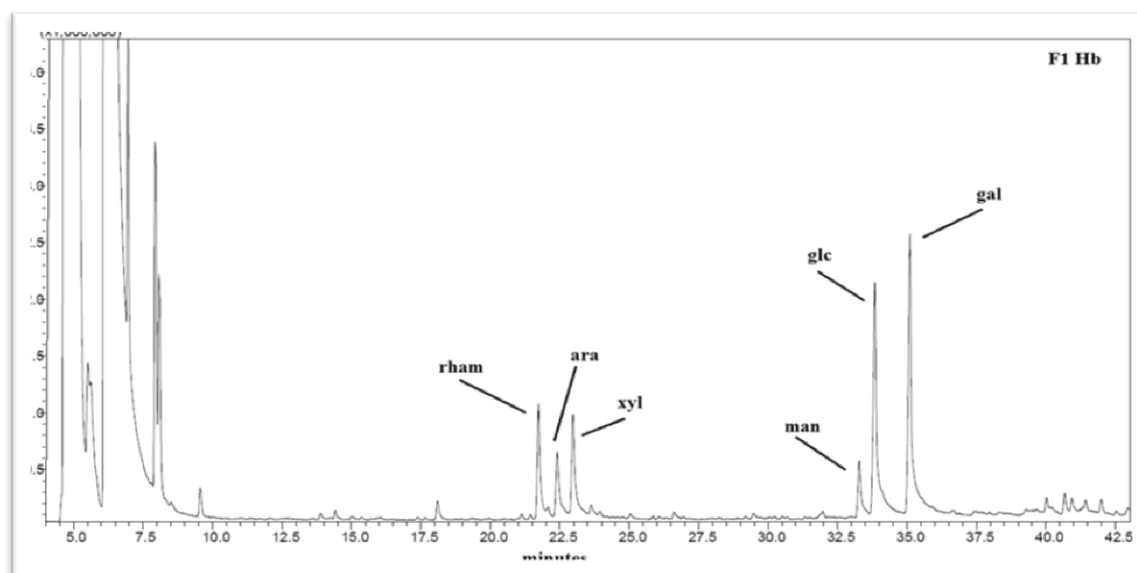
**Figura 5.23.** Nomenclatura utilizada para los fragmentos obtenidos a partir de un aldononitrilo peracetilado, en este caso para el derivado de la L-ramnosa. (Adaptación de Stortz, 1984).



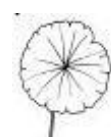
Las Figuras 5.24 y 5.25 muestran los cromatogramas obtenidos para I Hb y F1 Hb, respectivamente.



**Figura 5.24.** Perfil de CG-MS de I Hb, correspondiente a la infusión, obtenida de las partes aéreas de *H. bonariensis*.



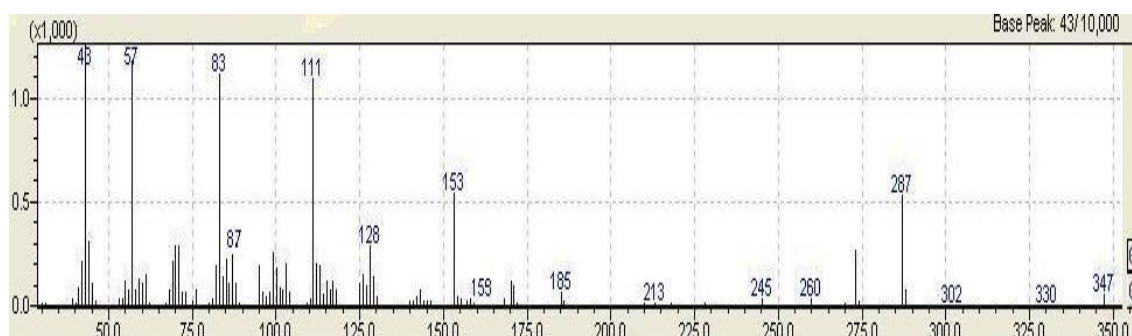
**Figura 5.25.** Perfil de CG-MS de F1 Hb (subfracción eluida con 0,2 M de NaCl en una columna Sephadex DEAE A-50 / Sephadex G100), obtenida a partir del dializado de la infusión de las partes aéreas de *H. bonariensis*.



Como se observa en el cromatograma de I Hb (Figura 5.24), la composición de monosacáridos resultó compleja; a ello debe sumarse los ácidos urónicos evidenciados antes mediante cromatografía planar (Tabla 5.8).

En cuanto a la proporción, la ramnosa fue el principal constituyente de la infusión, seguido de xilosa y de galactosa.

La Figura 5.26 presenta el espectro de masa correspondiente a la ramnosa. En él se observan las señales  $m/e$  correspondientes, en donde merecen ser destacadas la del acetilo (43), la de 2C (87), las de 3C (159, 117) y la de 5CN (213).



**Figura 5.26.** Espectro de masa correspondiente al aldonitrilo peracetilado de la ramnosa (tetra-*O*-acetil-6-desoxihexonitrilo).

En cuanto a la fracción mayoritaria del dializado eluida con NaCl 0,2 M, la galactosa y la glucosa fueron los monosacáridos más importantes, seguidos de ramnosa y xilosa, con restos de arabinosa y manosa. Estos resultados condicen con la presencia de polisacáridos neutros, y permiten sugerir la presencia de al menos dos tipos de compuestos, ramnogalactanos (que también se había propuesto a partir de los primeros estudios acá descritos en secciones anteriores) y de xiloglucogalactanos conteniendo restos de arabinosa y de manosa.

Los resultados del estudio de hidratos de carbono constituyen los primeros datos presentados para las partes aéreas de *Hydrocotyle bonariensis*. Resulta destacable además la relación directa entre la constitución de los polisacáridos propuestos y los usos tradicionales descritos para la especie.

Por ello, consideramos que, a partir de esta tesis, se genera una interesante proyección del estudio de estos compuestos a fin de determinar la estructura completa de los principales polisacáridos y su relación con las propiedades terapéuticas. Además, podrá constituirse en un punto de partida para la investigación de estos metabolitos en otras especies medicinales teniendo en cuenta que existen aún escasos estudios de este grupo químico en plantas.

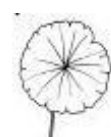
### **5.5.8. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el análisis de las fracciones del extracto acuoso**

Por otra parte, como se describió en las primeras secciones del presente capítulo, en el extracto de metanol y en el de acetato de etilo se habían identificado fenoles, fundamentalmente flavonoides y ácidos fenólicos. Teniendo en cuenta que la infusión contenía también este grupo químico además de hidratos de carbono, se analizó el dializado de la infusión (**Id**) y las aguas de diálisis (**lwd**) mediante HPLC en fase reversa empleando un detector de arreglo de diodos, como se describió en el capítulo de materiales y métodos de esta tesis.

Los tiempos de retención reales fueron corregidos según la siguiente ecuación:

$$t_{Rc} = (t_{Rr} - t_i) + [(0,fx) \times 60/100]$$

donde  $t_{Rc}$  corresponde al tiempo de retención corregido;  $t_{Rr}$ , es el tiempo de retención real que grafica el equipo;  $t_i$  es el tiempo de inyección; 0,  $fx$  corresponde a la fracción de minutos que indica el informe del cromatograma,



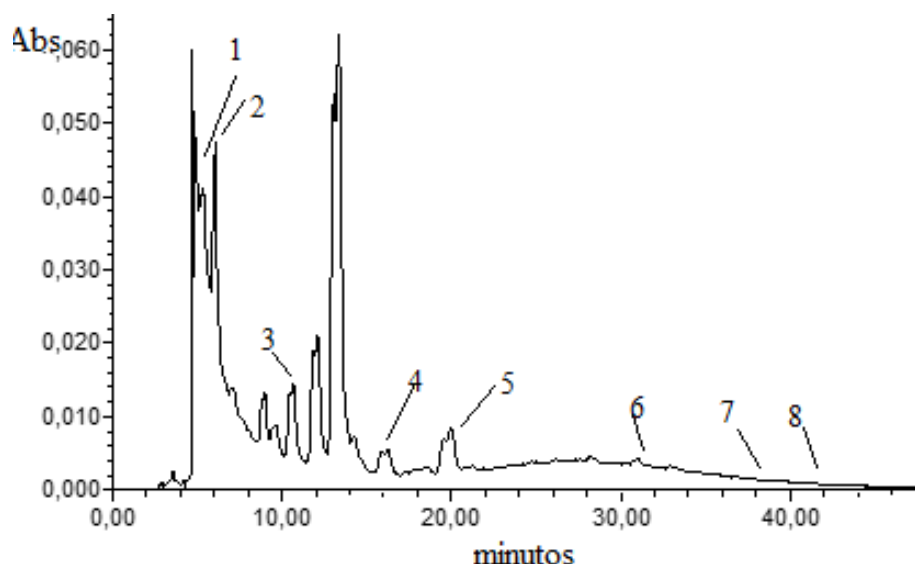
el cual se transforma a segundos. Los  $t_{Rc}$  se expresan en minutos seguidos de los segundos.

El cromatograma obtenido con **Id** a 360 nm se presenta en la **Figura 5.26**; la **Figura 5.27** muestra los espectros de las sustancias mayoritarias obtenidas.

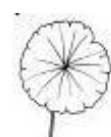
A partir de los resultados alcanzados, **Id** contenía fenoles además de los polisacáridos (compuestos mayoritarios que representaron casi el 100 % de la composición como se vio en secciones anteriores de este capítulo).

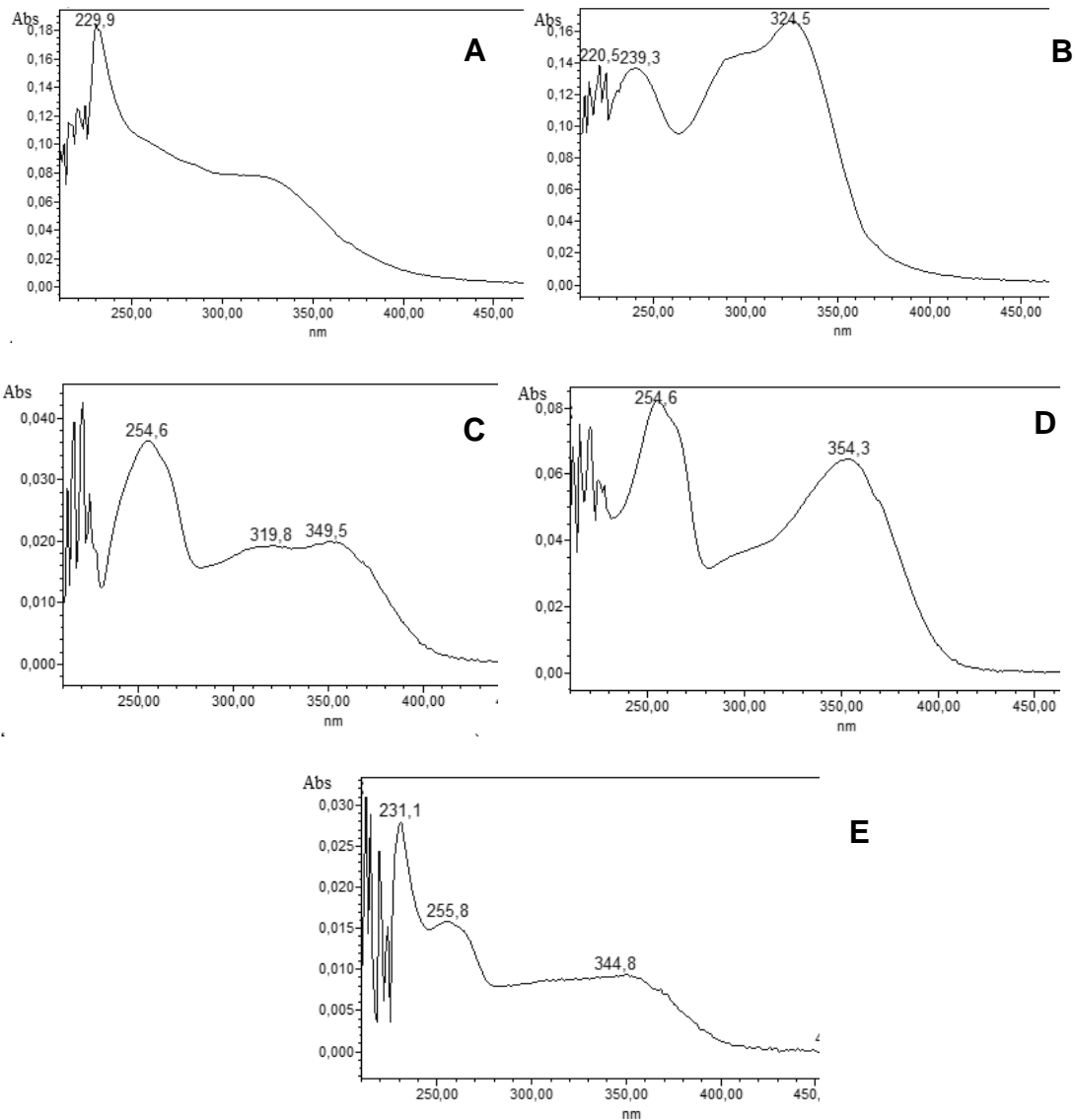
Los principales metabolitos fenólicos fueron flavonoides glicosilados, destacándose el hiperósido y la rutina; esta última fue posible identificarla a partir del espectro correspondiente y por comparación con el estándar correspondiente, resultando la señal mayoritaria a 12,15 min (**Figura 5.26**, señal no marcada). Además, se identificaron los ácidos clorogénico y cafeico.

**La Tabla 5.11** resume las principales señales obtenidas e identificadas a partir de los espectros de absorción en la fase móvil utilizada, observados a medida que iban siendo eluidos los componentes.



**Figura 5.26.** Cromatograma del dializado (**Id**) de la infusión de las partes aéreas de *H. bonariensis*, efectuado mediante RP-HPLC-DAD, a 360 nm.





**Figura 5.27.** Espectros correspondientes a las señales de  $t_{Rc}$  de 4,57 (A), 5,54 (B), 10,43 (C), 12,15 (D) y 19,43 min (E), obtenidos mediante RP-HPLC-DAD.

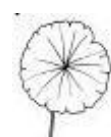
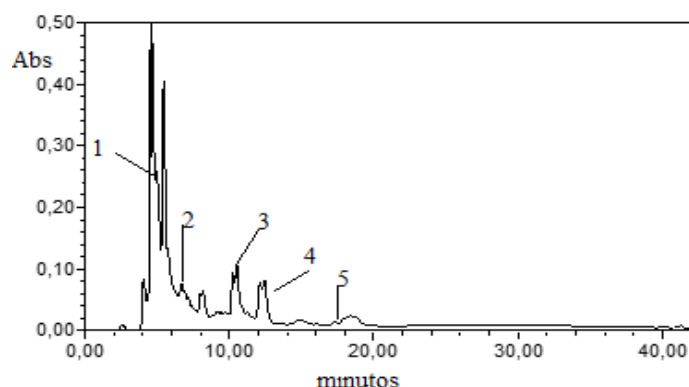
Todos los fenoles son importantes por las actividades biológicas que han sido demostradas, y parte habían sido también determinados en los extractos orgánicos como se describió en las primeras secciones del presente capítulo.



**Tabla 5.11.** Señales obtenidas a partir del análisis de **Id** (dializado de la infusión de las partes aéreas de *H. bonariensis*) mediante RP-HPLC-DAD.

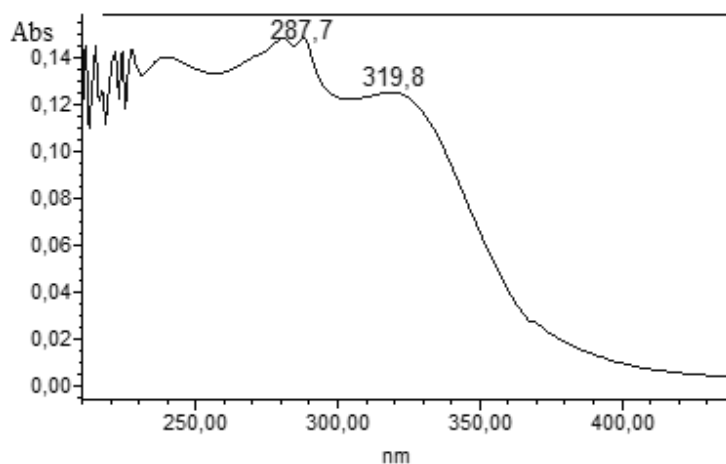
Señal N°	$t_{Rc}$ (min,sec)	Sustancia identificada en <b>Id</b>
1	4,57	ácido clorogénico
2	5,54	ácido cafeico
3	10,43	quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactósido (hiperósido)
4	15,11	quercetina-3-O- $\beta$ -D-glucósido (isoquercitrina)
5	16,53	quercetina-3-O- $\beta$ -D-ramanósido (quercitrina)
6	19,43	kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-ramnósido (afzelina)
7	30,57	quercetina
8	37,01	apigenina
9	40,37	kaempferol

La **Figura 5.28** presenta el cromatograma obtenido para **lwd**, a una absorbancia de 360 nm y la **Figura 5.29** muestra el espectro correspondiente al ácido gálico. En la **Tabla 5.12** se resumen las señales identificadas a partir de los espectros de absorción en la fase móvil de la cromatografía.





**Figura 5.28.** Cromatograma de las aguas de diálisis (**lwd**) de la infusión de las partes aéreas de *H. bonariensis*, efectuado mediante RP-HPLC-DAD, a 360 nm.



**Figura 5.29.** Espectro correspondiente a la señal de  $t_{Rc}$  de 5,18 min identificada como ácido gálico, obtenido mediante RP-HPLC-DAD.

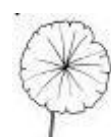
A partir del cromatograma surge una composición relativamente sencilla en relación a los metabolitos de naturaleza fenólica en las aguas de diálisis de la infusión de las partes aéreas de *H. bonariensis*.

No obstante, la proporción de cada compuesto fue más importante, destacándose los derivados glicosilados de la quercetina.

Además se identificó en esta fracción, el ácido gálico.

**Tabla 5.12.** Señales obtenidas a partir del análisis de **lwd** (aguas de diálisis de la infusión de las partes aéreas de *H. bonariensis*) mediante RP-HPLC-DAD.

Señal N°	$t_{Rc}$ (min,sec)	Sustancia identificada en lwd
1	4,49	ácido clorogénico
2	5,18	ácido gálico
3	10,40	quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactósido (hiperósido)



4	11,86	quercetina-3-O- $\beta$ -D-rutinósido (rutina)
5	16,68	quercetina-3-O- $\beta$ -D-ramanósido (quercitrina)

Los resultados alcanzados en el estudio de los compuestos de naturaleza fenólica de las partes aéreas de *H. bonariensis* guardan relación con los usos tradicionales de la especie. Los ácidos fenólicos y los flavonoides identificados en las dos fracciones de la infusión habían sido detectados también en los extractos orgánicos tal como se describió en las primeras secciones de esta tesis. En este caso, acompañan a los hidratos de carbono de tipo polisacárido en el dializado, y a aquellos de menor masa molecular (oligosacáridos y monosacáridos) en las aguas de diálisis, lo que permite sugerir una interacción de tales grupos químicos en relación a las actividades biológicas.

El hiperósido resultó uno de los derivados fenólicos más importantes, lo cual nos permite proponer a este metabolito como un marcador quimiotaxonómico para la especie.

En esta tesis se estudiaron por primera vez los constituyentes hidratos de carbono y derivados fenólicos de un extracto sencillo fraccionado por una metodología también sencilla, económica y sin mayores riesgos ambientales.



*Capítulo 6*

*Actividad Biológica*

## **6.1. Toxicidad aguda**

Teniendo en cuenta que la infusión constituye la forma tradicional de uso de la planta, se decidió iniciar el estudio de actividad biológica analizando la toxicidad de este extracto.

La administración de la infusión de *H. bonariensis* al 5 % P/V preparada según lo indicado en el Capítulo 4 de este trabajo de tesis, no produjo ningún síntoma de toxicidad en la dosis administrada, correspondiente a 5 g/kg de peso por vía oral.

Durante los quince días del período de estudio no se observó mortalidad, ni ninguna alteración macroscópica de los órganos luego de la autopsia, en el grupo de animales tratado. De acuerdo con Kennedy y col. (1986) las sustancias que presentan una toxicidad aguda en el orden de 5 g/kg administradas por vía oral, se consideran prácticamente no tóxicas, como sería el caso del extracto de *H bonariensis* administrado.

## **6.2. Actividad antiinflamatoria**

El estudio de la actividad antiinflamatoria de *H. bonariensis* se evaluó mediante la utilización de los modelos experimentales más utilizados: la inducción del edema plantar inducido por carragenina en rata (para analizar el efecto antiinflamatorio sistémico) y por el edema inducido por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en oreja de ratón (para el efecto antiinflamatorio local).

Los resultados fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza de una vía. Se utilizó el ensayo de Dunnett para determinar las diferencias entre los valores de las medias. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Todos los datos se expresaron como media  $\pm$  ESM.

Los resultados obtenidos indican que tanto la infusión como el extracto de metanol inhiben significativamente el edema de oreja en ratón, con valores entre el 30 y el 58 %, siendo el de metanol el más activo observándose una



relación dosis/efecto (**Tabla 6.2**). En contraste con los resultados obtenidos en este modelo, la administración parenteral u oral del extracto de metanol a las dosis utilizadas, no modificó significativamente la respuesta inflamatoria en el modelo de inflamación inducido por carragenina (**Tabla 6.1**).

El modelo de inflamación local en oreja de ratón inducida por el TPA, tal como se describió en la sección experimental de este trabajo de tesis, consiste en la aplicación local del TPA para provocar inflamación en una de las orejas del ratón, quedando la otra oreja sin tratamiento (control). De esta forma, a través de la diferencia de peso entre las dos orejas (tratada y control sin tratamiento), se establece el edema producido expresado en mg. En la **Figura 6.1** se grafica el edema en mg, expresado como la Media  $\pm$  ESM de n=4, bajo los diferentes tratamientos. Como droga antiinflamatoria de referencia se utilizó indometacina.

**Tabla 6.1.** Efecto antiinflamatorio del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis* (EM), determinado mediante el ensayo de edema de pata de rata inducido por carragenina

Tratamiento	Tiempo (h)			
	1	3	4	5
Control	0,62 $\pm$ 0,03	2,37 $\pm$ 0,07	2,22 $\pm$ 0,08	2,37 $\pm$ 0,15
EM 100 mg/kg i.p.	0,69 $\pm$ 0,05	2,16 $\pm$ 0,8	2,07 $\pm$ 0,1	1,89 $\pm$ 0,18
EM 300 mg/kg i.p.	0,75 $\pm$ 0,08	2,11 $\pm$ 0,32	2,07 $\pm$ 0,32	1,83 $\pm$ 0,17
EM 300 mg/kg p.o.	0,63 $\pm$ 0,10	2,04 $\pm$ 0,10	2,12 $\pm$ 0,09	1,87 $\pm$ 0,08
Indometacina (10 mg/kg)	0,47 $\pm$ 0,04	1,13 $\pm$ 0,08**	1,34 $\pm$ 0,07**	1,48 $\pm$ 0,12**

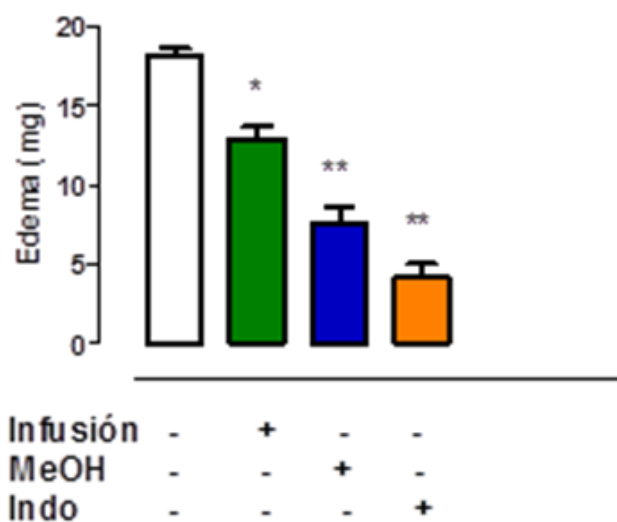
Cada grupo representa la media  $\pm$  SEM (n=6); \*\* p< 0,01 comparado con el control (Test de Dunnett).



**Tabla 6.2.** Efecto antiinflamatorio de la infusión y del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis* (EM), determinado mediante el ensayo del edema de oreja en ratón inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13 acetato (TPA).

Tratamiento	Peso de oreja (mg)	% de inhibición
Control	18,49 ± 0,89	-----
Infusión	12,88 ± 0,77**	30,34
EM (1 mg)	10,30 ± 1,51**	43,00
EM (10 mg)	7,59 ± 0,98**	58,00
Indometacina (0,5 mg)	4,2 ± 0,82**	77,28

Cada grupo representa la media ± SEM (n=6); \*\* p< 0,01 comparado con el control (Test de Dunnett).



**Figura 6.1.** Efecto de la infusión y del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis* sobre el edema inducido por TPA en oreja de ratón.

Los extractos fueron aplicados localmente (1 mg / 20 µl de acetona), Indo: indometacina (1 mg / 20 µl de acetona). Los resultados se expresan como edema (mg) y representan la Media ± ESM de 4 determinaciones. \*p<0,05;



\*\*p<0,01 Diferencias significativas de acuerdo al ensayo de ANOVA + Dunnett con respecto al control.

*H. bonariensis* tiene reportado, usos tradicionales y propiedades medicinales para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades como la tuberculosis, el alivio de los dolores de la inflamación, el reumatismo y la artritis (Masoumian y col., 2011) por lo cual se estudió la actividad antiinflamatoria en los dos modelos experimentales, citados anteriormente.

En el caso de la inflamación en pata de rata inducida por carragenina se encuentran involucrados, en su etapa inicial de la primera hora, histamina y serotonina y a las 4-5 h la respuesta está condicionada principalmente por prostaglandina E2 y leucotrieno B4, por lo que los compuestos que inhiban su síntesis o sus receptores inhibirían su efecto (Nishizuka, 1988).

El edema de oreja inducido por TPA es un modelo de inflamación local o tópica que permite evaluar sustancias con actividad antiinflamatoria y también agentes antipsoriasis. El TPA induce la respuesta inflamatoria mediante la activación de la proteínquinasa C y la consecuente estimulación de la fosfolipasa A2, hidrólisis del ácido araquidónico y biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos; Murokawa y col. (2006) han demostrado que el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) también participa en el desarrollo de dicha respuesta flogógena. También, se ha demostrado que el TPA induce la expresión de citoquinas: interleuquina-1  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , quimiostatina, factor estimulante de granulocitos/ macrófagos, interleuquina 6, en queratinocitos (Wilmer, 1994). Se sabe que los queratinocitos epidérmicos participan en reacciones inmunológicas e inflamatorias a través de la producción de citoquinas. Entre éstas, el TNF- $\alpha$  ha demostrado tener un rol crucial en desórdenes inmunológicos y de inflamación en piel y el incremento de sus niveles se correlaciona con la severidad de la enfermedad en pacientes con psoriasis (Bonifati, 1994) mientras que el bloqueo de su función se traduce en una mejora de la misma (Papp, 2004).



### **6.3. Participación de derivados fenólicos en la actividad antiinflamatoria y antioxidante**

El estudio fitoquímico del extracto de metanol de la parte aérea de *H. bonariensis* evidenció un amplio perfil polifenólico. Rutina (quercetina-3-O-ramnoglucósido), quercitrina (quercetina-3-Orhamnosida), isoquercitrina (quercetina-3-O-glucósido) y otro derivado de quercetina, se identificó el hiperósido (quercetina-3-O-galactósido). La identidad de los compuestos aislados se confirmó mediante comparación con estándares y datos concordantes con la literatura (Harborne, 1994).

Uno de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto de metanol resultó ser el hiperósido (flavonoide), del cual existen antecedentes de actividad antiinflamatoria (Matulevich-Peláez, 2017). Se demostró también, la actividad antiinflamatoria del hiperósido mediante la supresión de la activación del factor de necrosis tumoral en macrófagos peritoneales de ratón (Su-Jin Kim, 2011).

El modelo de inflamación con TPA, involucra o depende de la liberación y metabolismo del ácido araquidónico, así como la interacción de dicho agente flogístico con la proteinquinasa C30, como se mencionó anteriormente. Por lo tanto, el efecto inhibitorio de los extractos evaluados sugiere la presencia de compuestos activos que bloquean alguna de estas rutas inflamatorias, inhibiendo tales mediadores.

El TPA no sólo produce inflamación, sino que es carcinogénico, induce estrés oxidativo y lipoperoxidación. Después de la aplicación de TPA se genera anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidróxilo ( $\cdot OH$ ) estas especies reactivas del oxígeno (EROS) juegan un rol muy importante en la peroxidación lipídica (Nakamura y col., 2003). El TPA induce gran respuesta inflamatoria con acumulación de leucocitos al mismo tiempo que incrementa la producción de EROS, produce edema e hiperplasia; esto se acompaña de citoquinas proinflamatorias y un aumento de la expresión de COX-2 e iNOS,





que también se relacionan con la formación de tumores de piel (DiGiovanni, 1992; Murakami y col., 2000; Slaga, 1984). Por todo esto se sugiere también que los compuestos presentes en el extracto de metanol de *H bonariensis* tendrían actividad antioxidante.

#### **6.4. Actividad antioxidante**

Teniendo en cuenta la relación entre la inducción de la inflamación con TPA, el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, se estudió el efecto antioxidante de los extractos sobre un modelo de peroxidación de yema de huevo. Por otro lado, esto permitiría demostrar en forma preliminar que la actividad antiinflamatoria podría ser consecuencia de la actividad antioxidante.

##### **6.4.1. Actividad inhibitoria de la peroxidación de fosfolípidos del huevo**

La metodología empleada se basa en provocar la peroxidación de fosfolípidos de la yema de huevo lo que produce aumento de malondialdehído (que se mide espectrofotométricamente) y evaluar la actividad antioxidante como la disminución en la producción de malondialdehído, que se observa como una disminución de la absorbancia.

La actividad antioxidante se expresa como % de inhibición según la expresión:

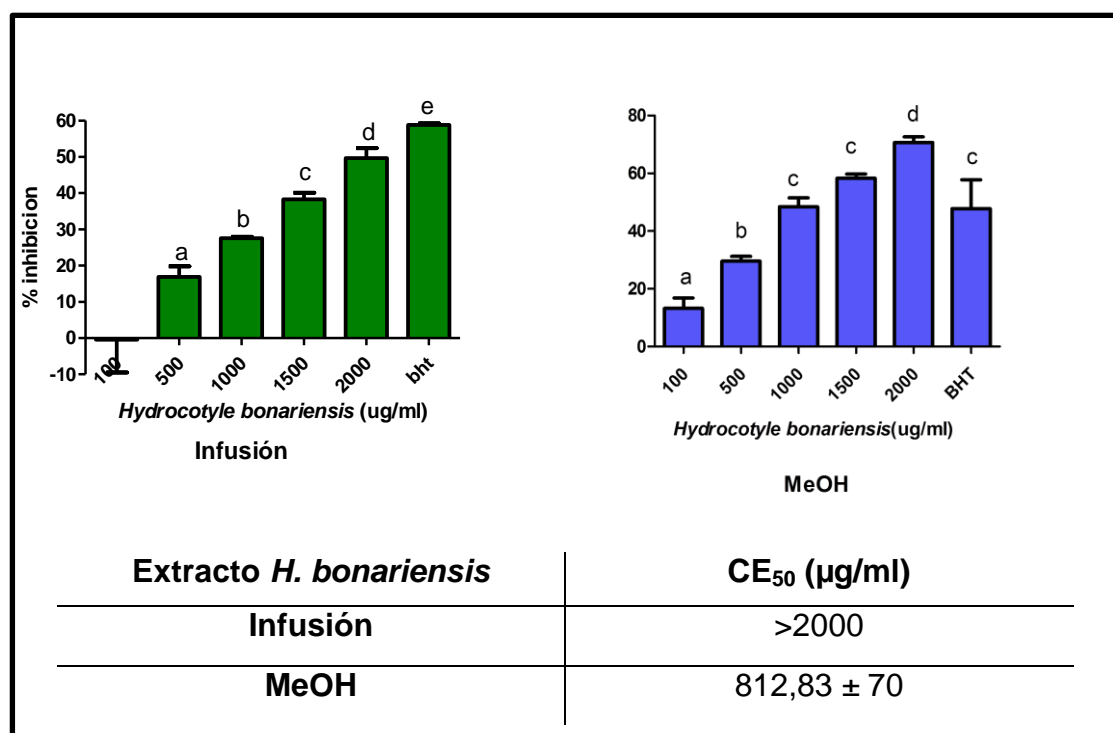
$$\frac{(\text{abs control} - \text{abs muestra})}{\text{abs muestra}} \times 100$$

El control sólo contiene yema de huevo.

Como se observa en la **Figura 6.2** los extractos produjeron disminución en la absorbancia de malondialdehído indicando actividad antioxidante. Ambos extractos demostraron inhibición de la peroxidación guardando una relación



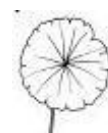
concentración-efecto. Sin embargo, el extracto de metanol fue más potente, con una  $CE_{50}$  de  $812,83 \pm 70 \mu\text{g/ml}$ .



**Figura 6.2.** Efecto de la infusión y del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*, sobre la peroxidación de fosfolípidos de yema de huevo. Los extractos fueron ensayados en diferentes concentraciones. BHT (butilhidroxitolueno) antioxidante de referencia. Los resultados se expresan como % de inhibición y representan la Media  $\pm$  ESM de dos determinaciones realizadas por triplicado. a,b,c indican que son significativamente diferentes de acuerdo a ANOVA + Newmann Keuls. Tabla inserta: concentración efectiva media ( $CE_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$ ), valores calculados a partir de los datos del gráfico.

La peroxidación lipídica es un marcador crucial del estrés oxidativo y está asociado con la promoción del cáncer (Gerber y col., 1997; Saintot y col., 1996).

De los resultados que obtuvimos en este trabajo de tesis, es posible sugerir que los derivados fenólicos están involucrados en la actividad antioxidante y por lo tanto en la actividad antiinflamatoria. Tal como se vio en el capítulo



anterior de resultados de esta tesis, el metanol extrajo una mayor cantidad de estos metabolitos por lo que la actividad fue importante en este extracto, permitiendo corroborar su participación en esta respuesta.

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en frutas y vegetales y están involucrados en la inhibición de la producción de radicales libres endógenos y de la progresión de patologías degenerativas mediadas por oxiradicales en humanos (Mattei y col, 2001). Es bien sabido que la actividad antioxidante de los polifenoles es su efecto más importante en los sistemas biológicos (Karakaya, 2004). Por otro lado, diferentes estudios realizados *in vitro* han demostrado una alta correlación entre el contenido de compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante de diferentes extractos (Abu-Amsha y col, 1996; Gulcin, 2006). Se ha visto que los polifenoles presentan actividad antioxidante principalmente secundaria (Peng Wong y col, 2006).

Según Gutteridge y Mitchel (Gutteridge y Mitchell, 1999), una acción primaria se relaciona con la prevención en la formación de radicales libres, mientras una acción secundaria se refiere a la capacidad de eliminar o neutralizar EROS o especies reactivas del nitrógeno (ERNS) ya formados.

Los antioxidantes de prevención impiden la formación de los radicales libres mediante la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o de la quelación de los metales que participan de las cadenas redox por sus características oxido/reductoras. Mientras los eliminadores/neutralizantes de radicales libres (scavenger) inhiben el inicio de la cadena redox y rompen su propagación (Polo de Santos, 2016).

En este trabajo se realizó la evaluación de la capacidad preventiva de formación de EROS y especies reactivas del nitrógeno (ERNS) a través de la determinación de la capacidad reductora de metales y de la actividad similar SOD. Por otro lado, la evaluación de la actividad eliminadora se realizó a través de la capacidad de eliminación del radical DPPH y a través de la neutralización de peróxidos involucrados en la lipoperoxidación y en la oxidación de proteínas.



#### **6.4.2. Actividad sobre la proliferación celular**

Como mencionáramos antes, las especies reactivas del oxígeno (EROS) correspondientes a átomos o moléculas con electrones desapareados (anión superóxido, radical hidroxilo y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), son producidos a nivel endógeno por el metabolismo aeróbico en la respiración celular (en las mitocondrias) y en los procesos inflamatorios, y a nivel exógeno (radiación solar, contaminación ambiental, entre otros), estando involucrados en enfermedades inflamatorias crónicas como la psoriasis, diabetes, cáncer, entre otras.

Considerando que las EROS potencian la inflamación y pueden intervenir en el proceso de tumorigénesis (por ej. modulando la proliferación celular), nos propusimos también estudiar la actividad de los extractos de *H. bonariensis* sobre la proliferación de células tumorales. Cabe destacar que las EROS son capaces de interactuar con las proteínas, lípidos y ADN alterando el normal funcionamiento celular, hecho que se correlaciona con la aparición de tumores y desregulación del balance proliferación/apoptosis como ocurre en la psoriasis.

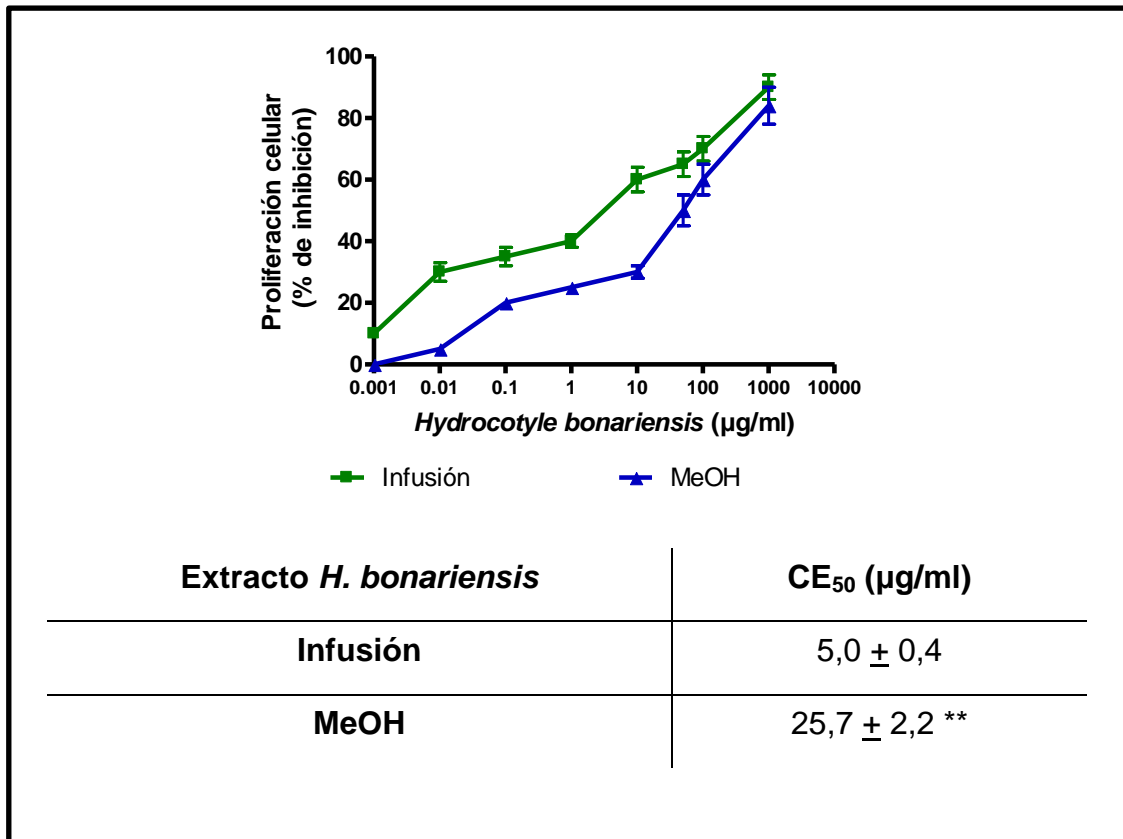
En este contexto, se estudió el efecto sobre la proliferación celular empleando una línea celular correspondiente a un linfoma murino (BW 5147). El efecto sobre la proliferación celular se evaluó a través de la técnica de captación de timidina tritiada; este nucleótido de timina se incorpora al ADN en el momento de la replicación celular por lo que una mayor incorporación es indicativo de un aumento en la proliferación celular, mientras que una disminución es indicativo de inhibición de la proliferación celular. Para esto, la timidina radiactiva incorporada a las células (previa incubación con los extractos durante 24 h), se recupera previa ruptura de las células, filtración en papel de filtro especial (cosechador de células) y medición de la radiactividad precipitada en el filtro a través de un contador de centelleo líquido. A partir de la radiactividad que se expresa en cuentas por minuto (cpm), se obtiene el % de inhibición de la proliferación:

$$\frac{\text{cpm control} - \text{cpm tratado}}{\text{cpm control}} \times 100$$



Se grafican así los resultados como inhibición de la proliferación celular en función de la concentración de los extractos expresada en  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  ESM de tres determinaciones realizadas por triplicado.

Como podemos observar en la **Figura 6.3**, ambos extractos produjeron una disminución de la proliferación en función de las concentraciones ensayadas siguiendo una relación concentración-respuesta. Sin embargo, resulta evidente a partir de los valores de  $\text{CE}_{50}$ , que el extracto acuoso resultó más potente que el de metanol.



**Figura 6.3.** Efecto de la infusión y del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*, sobre la proliferación de células de linfoma. Los resultados se expresan como proliferación (% de inhibición) y representan la Media  $\pm$  ESM de tres determinaciones realizadas por triplicado. Tabla inserta: concentración efectiva media ( $\text{CE}_{50}$ ) expresada en  $\mu\text{g/ml}$  de las muestras para la inhibición de la proliferación celular. \*\* $p < 0,01$ . Diferencias significativas de acuerdo a prueba T de Student.



Estos resultados sugieren la presencia de otros compuestos diferentes a los derivados fenólicos en el extracto acuoso que contribuirían a la actividad antiproliferativa. Podría existir un sinergismo entre compuestos fenólicos y otros compuestos polares, por ejemplo, hidratos de carbono, determinando un incremento de la actividad en dicho extracto.

Los polisacáridos de fuentes naturales son sustancias eficaces y poseen propiedades inmunológicas marcadas por la estimulación no específica del sistema inmunitario del huésped, lo que produce efectos antitumorales y antivíricos (Kennedy, 1989; Sun y col., 2010). Autores como Xiaolin Yanga y col. (2014), describen que el polisacárido de *Panax japonicus* C.A. Meyer, que pertenece a la familia Araliaceae, posee efectos notorios en la activación del sistema reticuloendotelial.

#### **6.4.3. Determinación del efecto sobre la viabilidad celular**

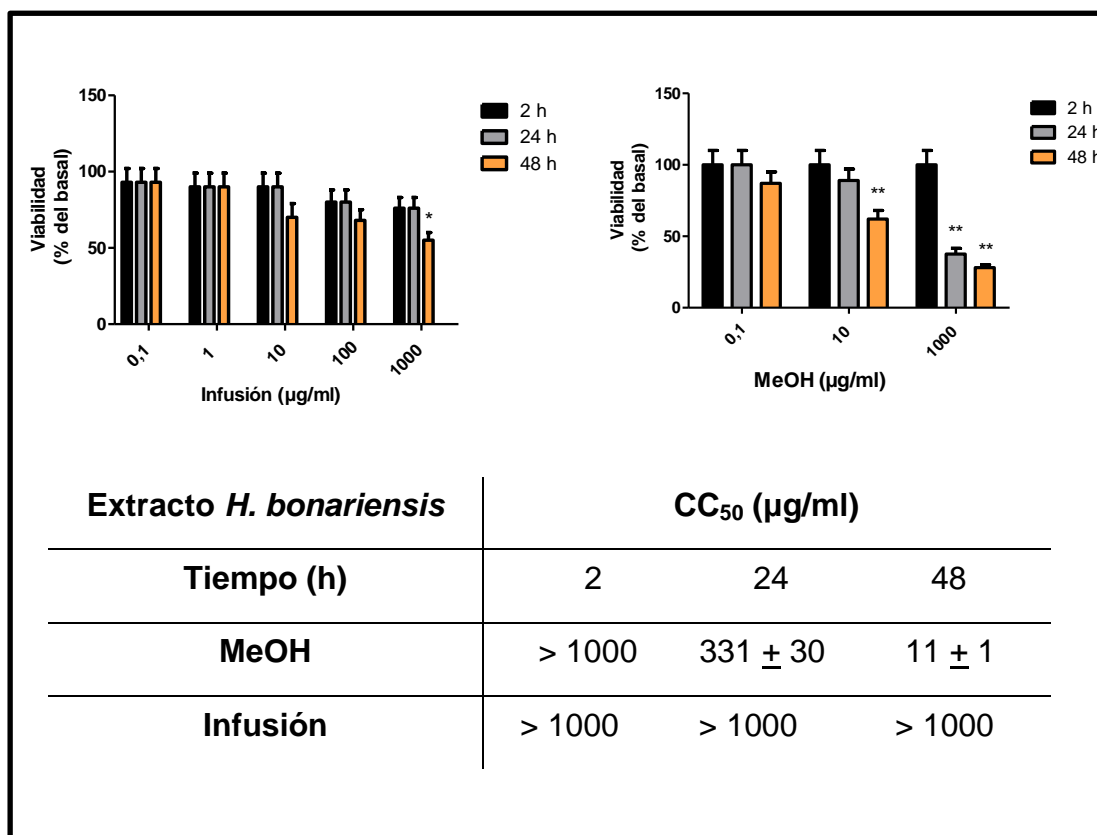
Se evaluó también la inocuidad de los extractos a través del efecto sobre la viabilidad de células normales, consistentes en linfocitos obtenidos a partir de ganglios linfáticos de ratones normales.

Para ello se utilizó la técnica de tinción con azul tripán, que consiste en colorear a las células con un colorante vital (que colorea de azul a células muertas); esto permite diferenciar en el microscopio de contraste de fases, linfocitos vivos de muertos y determinar así células vivas, células muertas y viables [(células vivas / totales) x 100]. Permite además calcular citotoxicidad (100 - % células viables).

A partir de los valores obtenidos, se calculó la  $CC_{50}$  (concentración citotóxica media) por el método de Alexander (trigonométrico).

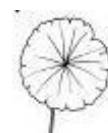
Podemos observar en la **Figura 6.4** que la infusión presentó menor toxicidad ya que su  $CC_{50}$  fue mayor de 1000  $\mu\text{g/ml}$  en todos los tiempos ensayados (2, 24 y 48 h). La viabilidad se expresó como % del basal (considerado 100 % viable).





**Figura 6.4.** Efecto de la infusión y del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*, sobre la viabilidad de linfocitos normales. Las células fueron incubadas en diferentes tiempos. Los resultados se expresan como viabilidad (% del basal) y representan la Media  $\pm$  ESM de tres determinaciones realizadas por triplicado. Tabla inserta: concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) expresada en µg/ml. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  Diferencias significativas de acuerdo a ANOVA + Dunnett con respecto al control.

Según los resultados observados en estos primeros ensayos, el efecto **antiinflamatorio** de la infusión parecería deberse fundamentalmente a la presencia de **compuestos de naturaleza fenólica** y el efecto **antiproliferativo** estaría estrechamente relacionado con la presencia de otros compuestos, entre los que se podría citar a los hidratos de carbono (anteriormente caracterizados tal como se describió en el capítulo precedente de resultados de este trabajo de tesis).



Esto condice también con lo descrito por otros investigadores quienes arribaron a resultados similares con estudios realizados con otras especies de la familia Araliaceae, como de describió anteriormente, con *P. japonicus* C.A. Meyer (Xiaolin Yanga, 2014); otra especie del género *Hydrocotyle*, como la *H. asiatica*, rica en ácidos terpenos bioactivos como ácidos asiáticos, ácido madecásico y sus respectivos glucósidos, asiaticósido y madecasósido ha reportado que posee efectos antiulceroso, antiinflamatorio, inmunomodulador, antitumoral, antiproliferativo, antibacteriano, antioxidante y antígenotóxico (Mutua, 2013).

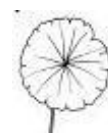
En base a estos considerandos, decidimos profundizar el estudio de las actividades biológicas de la infusión dado que en este extracto fue posible obtener los hidratos de carbono en mayor proporción, tal como se describió en el capítulo de resultados de análisis químico de esta tesis.

### **6.5. Actividad antiinflamatoria: participación de los hidratos de carbono**

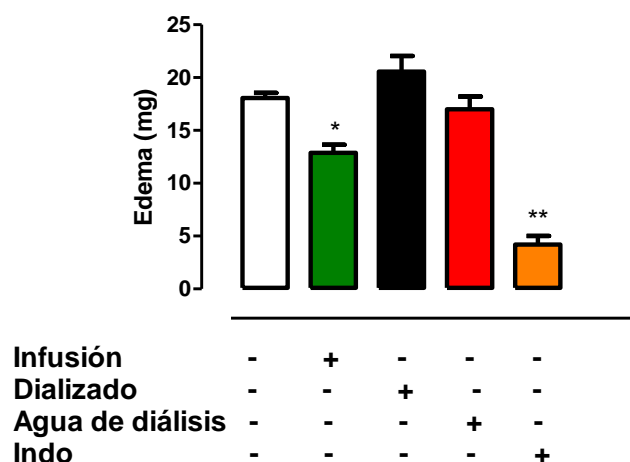
A fin de estudiar la participación de los hidratos de carbono en los efectos antiinflamatorios y antiproliferativos evidenciados en la especie en estudio, se trabajó con la infusión de las partes aéreas preparada según se describió en la sección experimental de esta tesis.

La infusión fue fraccionada mediante diálisis, obteniéndose como describimos anteriormente dos fracciones, las que denominamos **aguas de diálisis** (conteniendo 47 % de hidratos de carbono) y **dializado** (con prácticamente un 100 % de hidratos de carbono).

La actividad antiinflamatoria mediante el método del TPA, se evaluó como se describió anteriormente. Los resultados se presentan en la **Figura 6.5**.







**Figura 6.5.** Efecto de la infusión, del dializado y de las aguas de diálisis obtenidos de las partes aéreas de *H. bonariensis*, sobre el edema inducido por TPA en oreja de ratón. Los extractos fueron aplicados localmente (1 mg / 20  $\mu$ l de acetona), Indo: indometacina (1 mg / 20  $\mu$ l de acetona). Los resultados se expresan como edema (mg) y representan la Media  $\pm$  ESM de 4 determinaciones. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 Diferencias significativas de acuerdo a ANOVA + Dunnett con respecto al control.

De este estudio podría inferirse que la actividad antiinflamatoria de la infusión no solo depende de los hidratos de carbono, sino también de los compuestos polifenólicos.

## 6.6. Actividad antioxidante: participación de los hidratos de carbono

Como vimos anteriormente, la inflamación inducida por TPA produce estrés oxidativo con la generación de EROS, principalmente  $O_2^-$ , OH y  $H_2O_2$ . Por lo tanto, para determinar si la actividad antiinflamatoria podría deberse al efecto antioxidante y analizar la participación de los hidratos de carbono, se estudió el efecto de la infusión, de las aguas de diálisis y del dializado sobre la



eliminación de EROS, a través de diferentes metodologías relacionadas con la formación y eliminación de dichas especies.

### **6.6.1. Determinación de la actividad eliminadora del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH)**

En primer lugar, se evaluó la capacidad eliminadora del radical DPPH (que absorbe a 517 nm) (como método general antioxidante). Este radical en presencia de una sustancia reductora disminuye su absorbancia lo que constituye un indicativo de la actividad antioxidante. Como antioxidante de referencia se utilizó el ácido ascórbico.

A partir de los datos de absorbancia se calculó el % de inhibición o capacidad eliminadora del radical como:

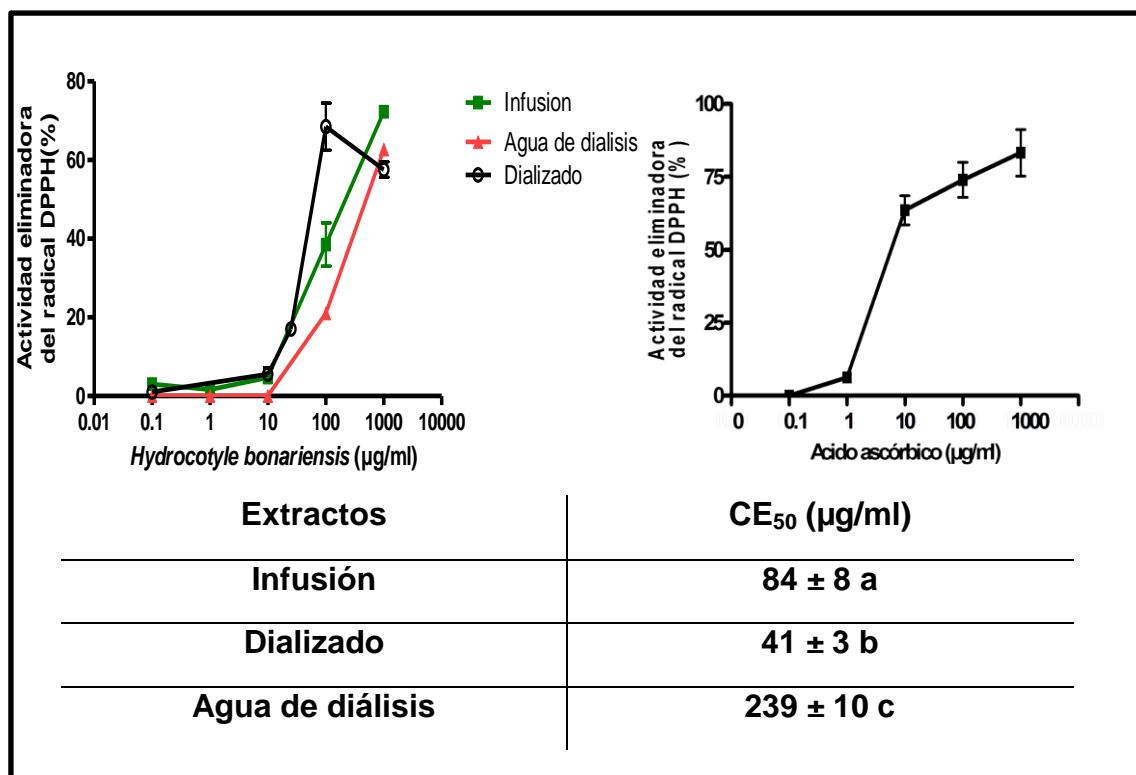
$$(\text{abs DPPH} - \text{abs muestra} / \text{abs DPPH}) \times 100$$

En la **Figura 6.6** se representa el % de inhibición en función de las concentraciones de las muestras ensayadas (infusión, aguas de diálisis y dializado). Los datos representan la media  $\pm$  ESM de tres determinaciones realizadas por triplicado.

Todos los extractos presentan actividad eliminadora del radical DPPH en relación con las concentraciones ensayadas. Sin embargo, el dializado presentó menor  $CE_{50}$ , indicativo de su mayor potencia. Como el dializado contiene el mayor porcentaje de hidratos de carbono y además la infusión pierde su potencia al transformarse en agua de diálisis, podría inferirse que los hidratos de carbono juegan un rol muy importante en la actividad eliminadora



de radicales libres, Sin embargo, no habría que dejar de lado los compuestos polifenólicos que podrían sumarse a la acción de los hidratos de carbono.



**Figura 6.6.** Actividad eliminadora del radical DPPH de la infusión, dializado y aguas de diálisis de las partes aéreas de *H. bonariensis*. Los resultados se expresan como actividad eliminadora del radical DPPH (%) y representan la Media ± ESM de tres determinaciones realizadas por duplicado. Tabla inserta: concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>). Estos valores fueron calculados a partir de los datos del gráfico. a,b,c indican que son significativamente diferentes de acuerdo a ANOVA + Newmann Keuls.

### 6.6.2. Determinación de actividad superóxido dismutasa (SOD)

Otra actividad estudiada fue la actividad símil superóxido dismutasa (SOD). La SOD es una enzima presente en todos los organismos a nivel intracelular y extracelular que juega un rol muy importante en la eliminación del radical anión superóxido al catalizar su transformación (dismutación) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (especie no radical). La técnica se basa en la formación de un adenocromo (de color rojo



que absorbe a 480 nm) en presencia de anión superóxido derivado de la oxidación del oxígeno del aire. Sin embargo, cuando se está en presencia de sustancias con actividad similar SOD se impide la formación de adenocromo, observándose una disminución en su valor de absorbancia. La adrenalina sola constituye el control de oxidación. Se calcula el delta abs/min (es cinético) y luego el **% de inhibición**:

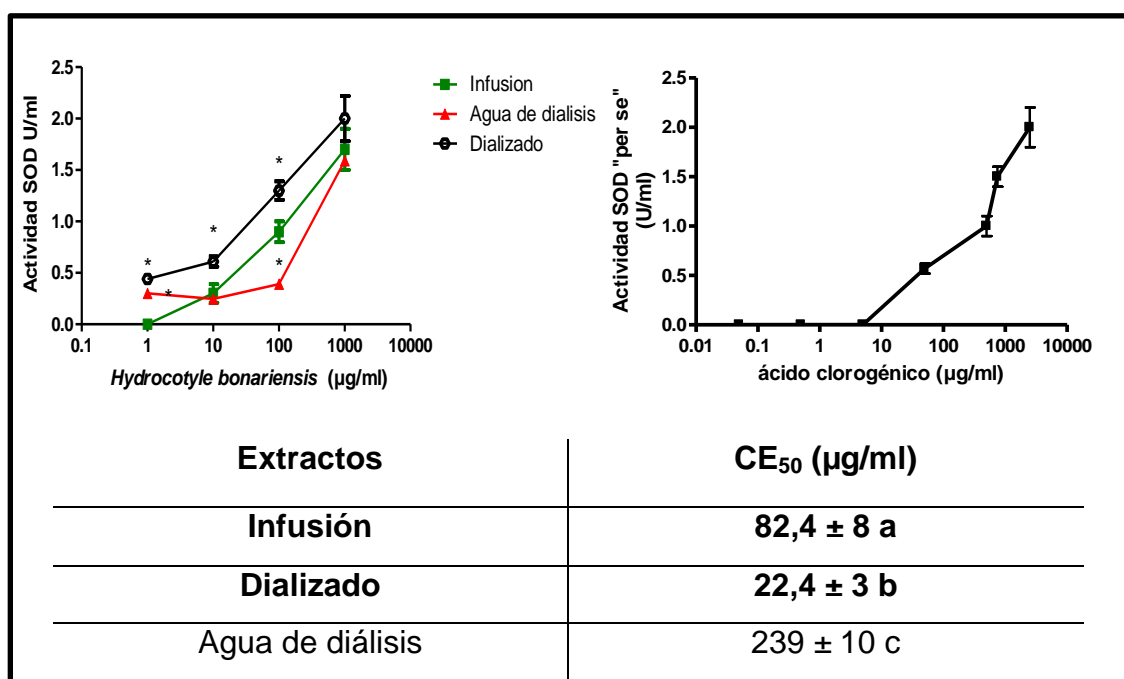
$$(\text{delta abs Control} - \text{delta abs M} / \text{delta abs Control}) \times 100$$

Luego se calcula la actividad SOD, sabiendo que el 50 % de inhibición corresponde a 1 Unidad SOD. El ácido clorogénico se tomó como control positivo de actividad similar SOD.

Al igual que el caso anterior, tal como se observa en la **Figura 6.7**, todos los extractos mostraron actividad en relación a la concentración. Sin embargo, las fracciones obtenidas por diálisis a partir de la infusión evidenciaron diferencias importantes; por un lado, las aguas de diálisis disminuyeron la potencia como lo muestra una mayor CE<sub>50</sub>. Por otro lado, el dializado constituido prácticamente solo por hidratos de carbono, ejerció la mayor actividad reductora ya que presentó la mayor potencia (menor CE<sub>50</sub>) para la eliminación del radical.

Estos resultados sugieren que los hidratos de carbono son los compuestos principales que están involucrados en la actividad SOD ejercida por la infusión.





**Figura 6.7.** Actividad SOD de la infusión, dializado y aguas de diálisis de las partes aéreas de *H. bonariensis*. Los resultados se expresan como actividad SOD (U/ml) y representan la Media ± ESM de tres determinaciones realizadas por duplicado. Tabla inserta: concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>). Estos valores fueron calculados a partir de los datos del gráfico. a,b,c indican que son significativamente diferentes de acuerdo a ANOVA + Newmann Keuls.

### 6.6.3. Determinación de la capacidad reductora

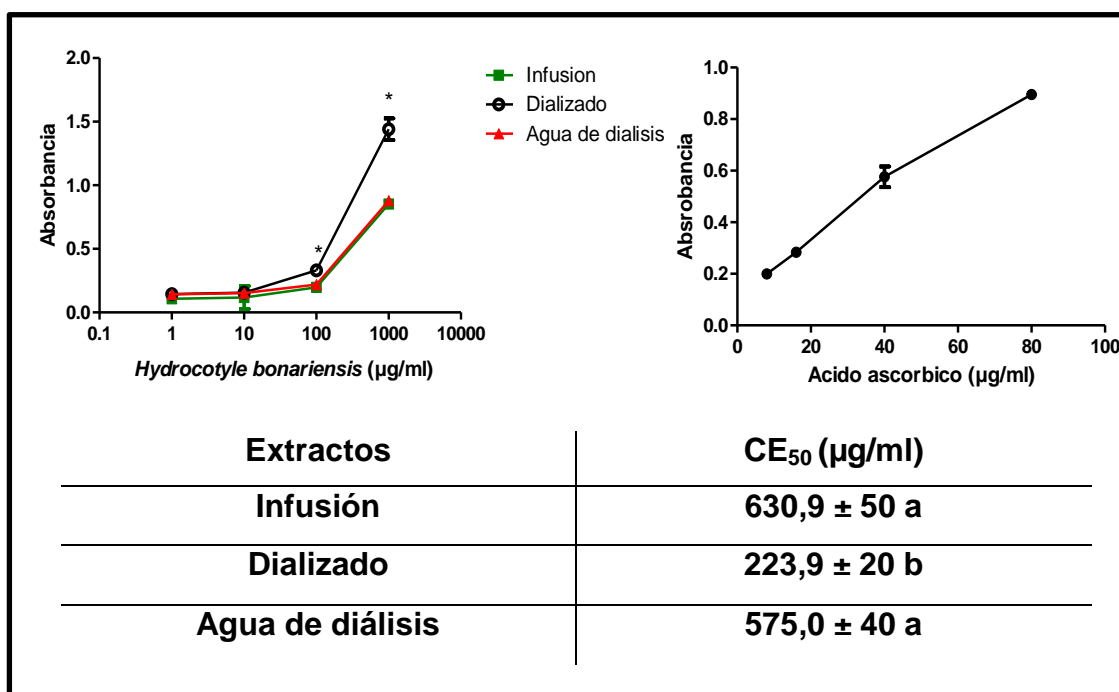
En este trabajo de tesis también analizamos la capacidad de reducir el Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. El hierro participa de una reacción de oxidación (reacción de Haber-Weiss) y en la reacción de Fenton en la que se forma el radical anión hidroxilo (especie sumamente tóxica para los tejidos) a partir de radical anión superóxido. Por otro lado, las reacciones que producen las EROS sobre proteínas, lípidos y ADN están catalizadas por metales tanto en la iniciación, como en la propagación y terminación.

Esta técnica permite evaluar la capacidad donadora de electrones o receptora de hidrógeno, de las moléculas en reacciones de óxido reducción. Consiste en determinar la capacidad de las muestras de reducir el Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>



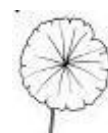
(hexacianoférrico a hexacianoferrato) que al reaccionar con cloruro férrico forma un complejo que absorbe a 700 nm. A mayor complejo formado, mayor capacidad reductora.

En nuestro estudio, de acuerdo con los resultados obtenidos que se presentan en la **Figura 6.8**, la infusión presentó una actividad moderada. Sin embargo, el dializado, fracción enriquecida en hidratos de carbono evidenció notablemente una mayor potencia. Estos resultados sugieren que los hidratos de carbono son los compuestos responsables de la actividad reductora presente en la infusión y que otros compuestos de la infusión podrían antagonizar o reducir su efecto.



**Figura 6.8.** Actividad reductora de la infusión, dializado y aguas de diálisis de las partes aéreas de *H. bonariensis*. Los resultados se expresan como absorbancia y representan la Media ± ESM de tres determinaciones realizadas por duplicado. Tabla inserta: concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>). Estos valores fueron calculados a partir de los datos del gráfico. a,b,c indican que son significativamente diferentes de acuerdo a ANOVA + Newmann Keuls.

La actividad antiinflamatoria de la infusión podría ser consecuencia de la interacción con el metabolismo del ácido araquidónico (ruta metabólica



evaluada por la técnica utilizada) y con la actividad antioxidante. Los polifenoles estarían involucrados principalmente en la actividad antiinflamatoria, mientras los polisacáridos jugarían un rol importante en la actividad antioxidante, en donde la inhibición de la peroxidación lipídica se relacionaría además con la capacidad antiinflamatoria. De todos modos, ambos grupos de metabolitos actuarían sinérgicamente ejerciendo ambos efectos

La actividad antioxidante de los azúcares ha sido demostrada, por ejemplo, se vio que la hemicelulosa y la pectina presentan actividad eliminadora del radical DPPH y actúan como reductores del hierro. Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos hasta el momento, en los que se demuestra que los azúcares contenidos en la infusión serían responsables de la actividad antioxidante de la misma, que podría sinergizarse con los polifenoles (Mengome, 2014).

## **6.7. Actividad antiproliferativa**

Con respecto a la actividad antiproliferativa, se puede observar claramente en la **Figura 6.9** que la infusión genera una mayor respuesta dependiente de la concentración, la cual disminuye en sus fracciones, fundamentalmente en las aguas de diálisis; mientras que en el dializado a mayores dosis resulta moderada.

Estos resultados permiten sugerir que evidentemente existe una participación sinérgica de los hidratos de carbono con otros metabolitos, fundamentalmente derivados fenólicos. Al separarse ambos grupos químicos, disminuye notoriamente la actividad, sobre todo en las aguas de diálisis. En cambio, la moderada actividad que aún se manifiesta en el dializado a dosis mayores, permite inferir que existe una participación activa de los hidratos de carbono.

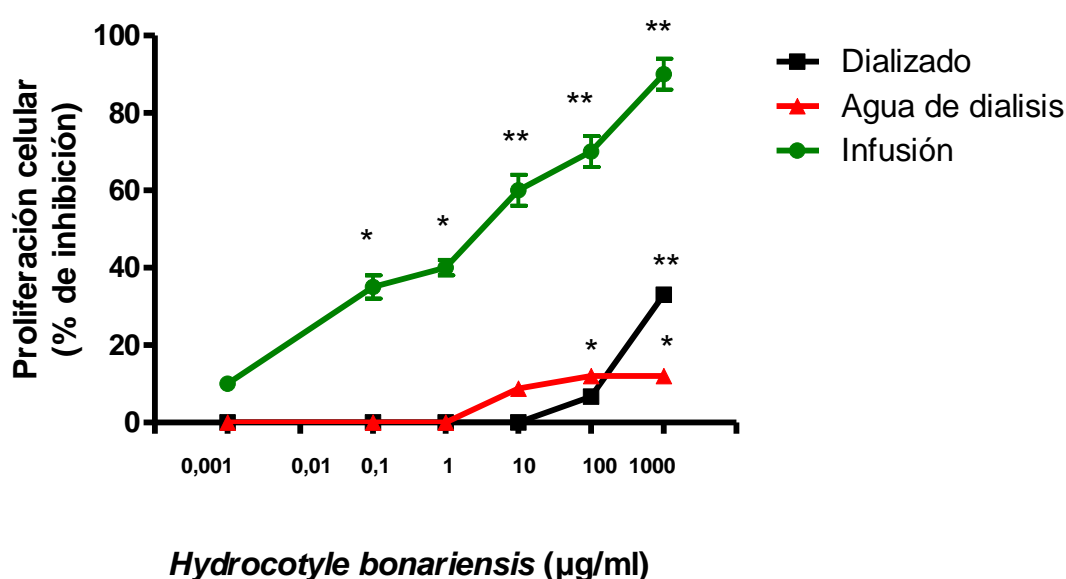
En una aproximación para establecer el mecanismo de acción de la actividad antiproliferativa determinada, decidimos también evaluar si el efecto de inhibición de la proliferación de las células tumorales se debía a una acción



citotóxica o citostática, a través del estudio sobre la viabilidad de las células tumorales.

En la **Figura 6.10** podemos observar que la infusión de *H. bonariensis* produjo efecto citostático a bajas concentraciones (en las que disminuye la proliferación celular pero la viabilidad se mantuvo sin modificar) y efecto citotóxico en concentraciones altas (disminuye la proliferación celular y la viabilidad).

Por otro lado, el dializado presentó efecto citotóxico a concentraciones altas.

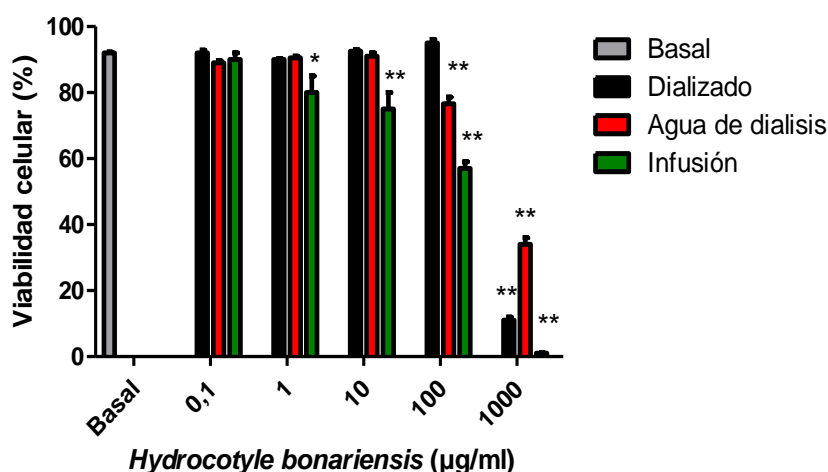


**Figura 6.9.** Efecto de la infusión, aguas de diálisis y dializado de las partes aéreas de *H. bonariensis*, sobre la proliferación de células de linfoma. Los resultados se expresan como proliferación (% de inhibición) y representan la Media  $\pm$  ESM de tres determinaciones realizadas por triplicado.

Los resultados alcanzados permiten sugerir que los hidratos de carbono están involucrados en la citotoxicidad demostrada por la infusión, aunque para evidenciar el efecto fue necesaria una concentración alta. Se debe considerar también que la masa molecular de los polisacáridos del dializado es importante, por lo que evidentemente la estructura y el tamaño de las moléculas juegan un rol importante en los efectos producidos.







**Figura 6.10.** Efecto de la infusión, aguas de diálisis y dializado de las partes aéreas de *H. bonariensis*, sobre la viabilidad de linfocitos normales. Las células fueron incubadas en diferentes tiempos. Los resultados se expresan como viabilidad (% del basal) y representan la Media  $\pm$  ESM de tres determinaciones realizadas por triplicado.

## 6.8. Efecto sobre células del sistema inmune

Teniendo en cuenta la participación de los hidratos de carbono en la actividad antiinflamatoria, en la actividad antioxidante y en la modulación de la proliferación de células de linfoma, se propuso estudiar la actividad del dializado (con prácticamente un 100 % de hidratos de carbono) en macrófagos murinos y en linfocitos de ganglios linfáticos de animales normales, con el fin de evaluar la actividad inmunomoduladora en relación con la actividad antiinflamatoria. Para esto la infusión, sometida a diálisis, se evaluó junto al agua de diálisis y dializado.

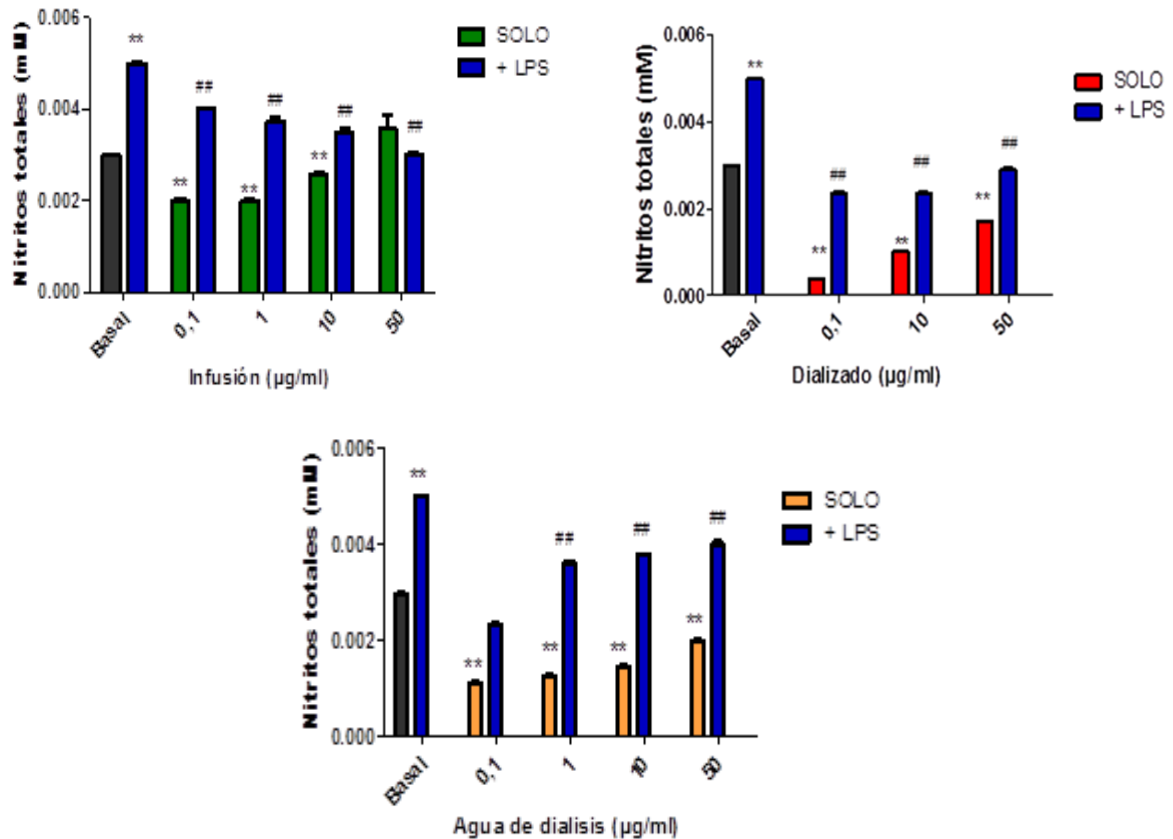
### Macrófagos

Se evaluó el efecto de la infusión, agua de diálisis y dializado sobre la producción de óxido nítrico (NO) como indicador de estado inflamatorio y activación celular en presencia y ausencia de LPS.



Para medir NO se utilizó la técnica de Griess que consiste en la detección de los nitritos por la reacción con el reactivo de Griess, formándose un azo derivado de color rosado que absorbe a 540 nm, a mayor absorbancia, mayor producción de nitritos totales.

Podemos observar según la **Figura 6.11**, que tanto la infusión como el agua de diálisis y el dializado disminuyen la producción basal de NO en relación a la concentración. Estos resultados indican que los tratamientos se comportan como inmunosupresores, disminuyendo la activación basal. Por otro lado, también disminuyen el aumento de NO producido por el LPS indicando un efecto inmunosupresor antiinflamatorio.

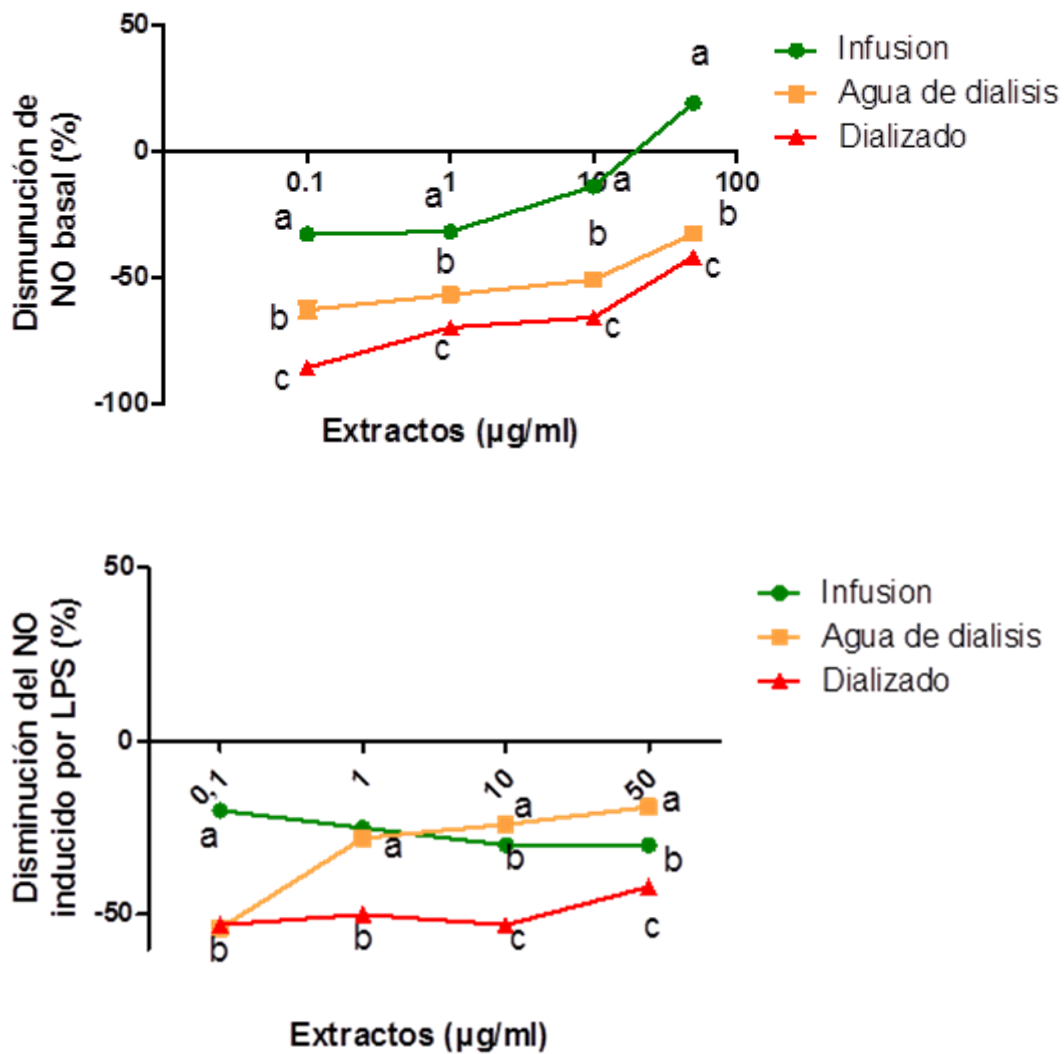


**Figura 6.11.** Efecto de la infusión, aguas de diálisis y dializado de las partes aéreas de *H. bonariensis*, sobre la producción de NO como indicador de estado inflamatorio y activación celular en presencia y ausencia de LPS.



Para poder analizar y comparar las disminuciones producidas por cada tratamiento se calcularon los % de inhibición con respecto al basal o con respecto al LPS.

Según la **Figura 6.12** con respecto a la actividad inmunosupresora, el dializado, presenta la mayor actividad de disminución del NO basal. Sin embargo, el agua de diálisis presenta mayor actividad que la infusión.

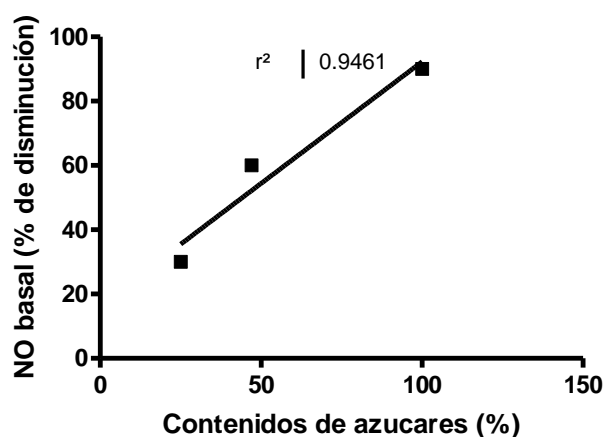


**Figura 6.12.** % inhibición con respecto al basal y con respecto al LPS, de la infusión, aguas de diálisis y dializado de las partes aéreas de *H. bonariensis*.

Los hidratos de carbono son los que actúan como inmunosupresores, sin embargo, el agua de diálisis tiene mayor efecto que la infusión, agua de diálisis (47 % de azúcares) lo que sugiere que los azúcares son los compuestos con actividad antiinflamatoria.

Con respecto a la actividad antiinflamatoria en presencia de LPS, en algunas concentraciones disminuye la actividad como se ve en el agua de diálisis. Siendo nuevamente el dializado el más activo. Para evaluar el efecto de la concentración de los hidratos de carbono en la respuesta inmunosupresora (basal) se realizó un estudio de correlación entre estos dos parámetros.

En la **Figura 6.13**, podemos observar, que a mayor concentración de azúcares mayor es la respuesta inmunosupresora guardando una correlación con un coeficiente de correlación de 0,94 ( $r:0,94$ ).



**Figura 6.13.** Correlación entre el contenido de azúcares y el efecto sobre los niveles de NO.

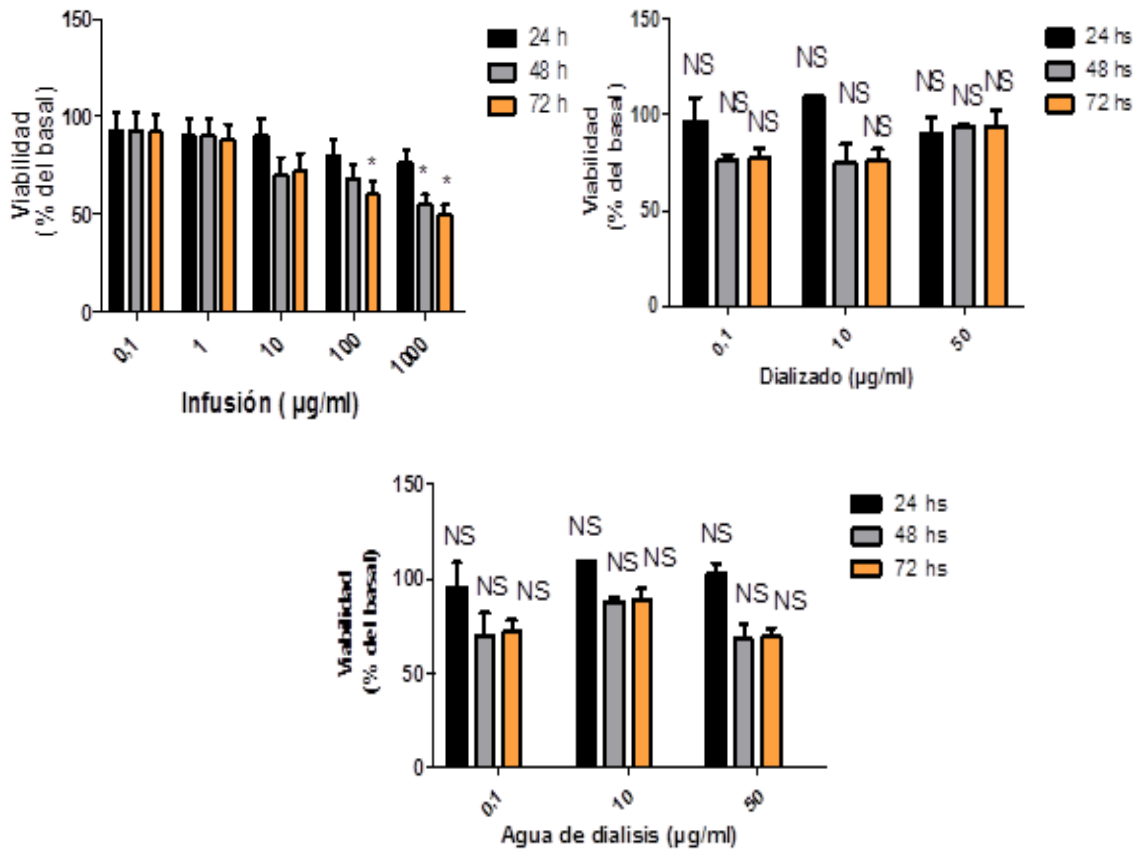
### Linfocitos murinos

Teniendo en cuenta el efecto inmunosupresor en macrófagos, seguidamente se estudió el efecto de los hidratos de carbono sobre otro tipo de células del sistema inmune como son los linfocitos derivados de ganglios linfáticos que forman parte de la inmunidad adquirida.



En primer lugar, se estudió el efecto de la infusión, agua de diálisis y dializado sobre la viabilidad y sobre la proliferación celular.

Podemos observar en la **Figura 6.14** (estudio de la viabilidad celular) que la infusión produjo disminución de la viabilidad a concentraciones mayores de 10  $\mu\text{g/ml}$  que no llegan al 50 % de inhibición a las 72 hs de cultivo celular.



**Figura 6.14.** Efecto de la infusión, agua de diálisis y dializado de las partes aéreas de *H.bonariensis*, sobre la viabilidad celular.

Por otro lado, ni el agua de diálisis ni el dializado modificaron la viabilidad celular a las concentraciones ensayadas. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo del azul tripan. A partir de estos datos se calculó la  $CC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Tabla 6.3)



**Tabla 6.3.** Concentración citotóxica (CC<sub>50</sub> en µg/ml), valores calculados a partir de los datos de la **Figura 6.14.**

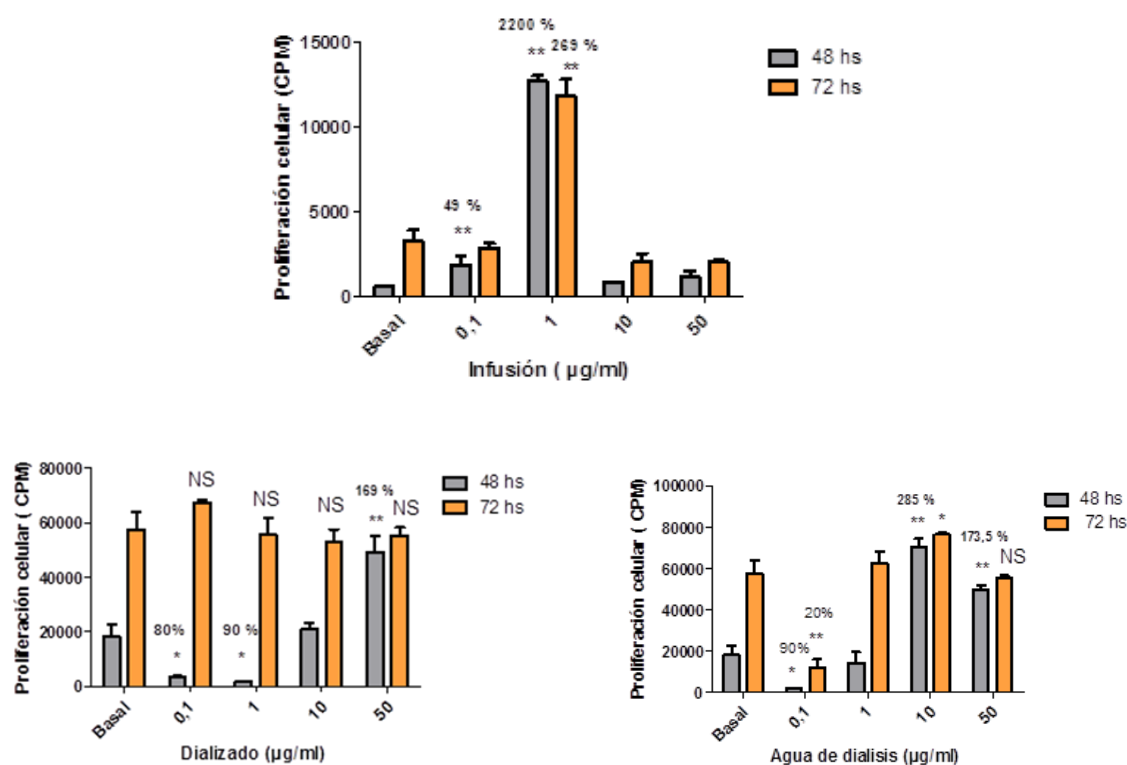
<b>Extracto <i>H. bonariensis</i></b>	<b>CC<sub>50</sub> (µg / ml)</b>			
	<b>Tiempo (h)</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>Infusión</b>		> 1000	> 1000	1000
<b>Dializado</b>		> 50	> 50	>50
<b>Agua de diálisis</b>		> 50	> 50	>50

Se continuó estudiando el efecto sobre la proliferación celular, pero en concentraciones no mayores de 50 µg/ml.

De manera que podemos observar en la **Figura 6. 15.** que la infusión aumenta la proliferación celular en concentraciones bajas, siendo 1 µg/ml la concentración que produce la máxima estimulación. El dializado (100 % azúcares) presentó respuesta bifásica: concentraciones bajas disminuyeron la proliferación, mientras concentraciones más altas estimularon la proliferación, pero en menor porcentaje que la infusión. El agua de diálisis también presentó respuesta bifásica disminuyendo la proliferación en concentraciones bajas y estimulando en concentraciones más altas. El agua de diálisis presentó menor efecto estimulador que la infusión.

El efecto de aumento de la proliferación celular se considerará como efecto inmunoestimulante, mientras que el efecto de disminución de la proliferación celular se considerará como efecto inmunosupresor. La respuesta bifásica será considerada como efecto inmunomodulador.





**Figura 6.15.** Efecto de la infusión, agua de diálisis y dializado de las partes aéreas de *H. bonariensis*, sobre la proliferación celular, pero en concentraciones no mayores de 50 µg/ml.

De esta manera, podemos observar que los azúcares demostraron actividad inmunosupresora antiinflamatoria en macrófagos a través de la inhibición en la producción de NO estimulado por LPS. También demostraron tener efecto sobre los linfocitos, a través de dos acciones: una inmunosupresora (a bajas concentraciones) y otra inmunoestimulante (a altas concentraciones). Por lo que se interpreta que los azúcares actuarían como inmunomoduladores, ejerciendo su actividad inmunosupresora o antiinflamatoria en condiciones de inflamación, que además no son citotóxicos para células normales y que podrían modular al sistema inmune bajo determinadas circunstancias. Todas estas acciones serían importantes en el manejo de patologías como la psoriasis en las que se debe frenar al sistema inmune ya sea inhibiendo la funcionalidad de los macrófagos y la proliferación de linfocitos, que a su vez



son activadores de macrófagos. La actividad de aumento en la proliferación de linfocitos, en concentraciones más altas, podría ser beneficiosa para lograr acción de defensa contra tumores y la actividad inmunosupresora para controlar enfermedades en las que participan el sistema inmune como la psoriasis. Es sabido que la psoriasis es una enfermedad celular en la que se activan los linfocitos T, que producen citoquinas, las que conducen a la activación de macrófagos que a su vez liberan más citoquinas y factores inflamatorios como el NO generando una respuesta altamente inflamatoria y de aumento en la proliferación de las células dérmicas. Por lo tanto, encontrar sustancias naturales inocuas, a partir de plantas, con capacidad de modular el sistema inmune a través de su efecto sobre macrófagos y linfocitos podría constituir una buena terapéutica o actuar como coadyuvantes de los tratamientos convencionales para disminuir efectos adversos aboliendo dos efectos, la inflamación y la hiperproliferación de las células dérmicas.





*Cuarta Parte*

*Conclusiones*

*Capítulo 7*

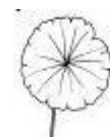
*Conclusiones*

## 7.1. Conclusiones

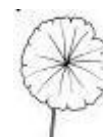
Esta investigación se realizó con el fin de contribuir al conocimiento científico de la especie medicinal argentina *Hydrocotyle bonariensis* Lam., mediante los estudios fitoquímicos y farmacológicos de las actividades para validar su uso tradicional y conocer los principios activos responsables de estas actividades.

Luego de la discusión de los resultados se puede concluir que:

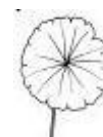
- ✓ Se utilizaron las partes aéreas de *H. bonariensis*.
- ✓ Se realizó el estudio fitoquímico del extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*. Se determinó el contenido de polifenoles totales por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, resultando un valor de 48,5 mg GAE/g de muestra, expresados como droga seca.
- ✓ Se aislaron por técnicas cromatográficas e identificaron por métodos espectrofotométricos los siguientes compuestos fenólicos: los flavonoides, y compuestos fenil propanoides. Resultaron destacables por su importancia como marcadores quimiotaxonómicos, el **ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico)**, el **metil 3,4,5-trihidroxibenzoato (galato de metilo, gallicina)**, el **ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido clorogénico)**, el **ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido isoclorogénico)**, y los flavonoides **3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona (quercetina)**, **quercetina-3-O- $\beta$ -rutinósido (rutina)**, **quercetina-3-O- $\beta$ -glucósido (isoquercitrina)**, **quercetina-3-O- $\beta$ -ramnósido (quercitrina)**, **quercetina-3-O-galactósido (hiperósido)**.
  - **Esta es la primera vez que se identifican flavonoides (derivados de la quercetina) en las partes aéreas de *H. bonariensis*.**
- ✓ Con respecto a las saponinas, en la infusión se evidenció la presencia de asiaticósido, no así en el extracto de metanol.



- **En el extracto de metanol se observaron otras saponinas, probablemente bonarienósidos. Los resultados constituyen el primer aporte como herramienta válida para el control de calidad de *H. bonariensis* en relación a las saponinas.**
- ✓ La infusión fue purificada por diálisis y se identificaron los siguientes hidratos de carbono: ramnosa, galactosa, glucosa y ácidos urónicos (~ 5%); y también se determinó un 7% de grupos sulfatos.
  - **Esta es la primera vez que se identifican estos metabolitos en las partes aéreas de *H. bonariensis*.**
- ✓ A partir de la infusión de obtuvo por diálisis, el agua de diálisis y el dializado. Se cuantificó por HPLC el contenido de azúcares totales en el dializado, obteniéndose un 100% de hidratos de carbono expresados como galactosa, ramnosa, glucosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico. Los ácidos urónicos representaron el 5%. Las aguas de diálisis en cambio contenían, además, flavonoides y otros metabolitos polares.
- ✓ La infusión evidenció la ausencia de toxicidad aguda en ratones a una dosis de 5 g/kg administradas por vía oral
  - **Este resultado demuestra un alto grado de seguridad en su uso tradicional.**
- ✓ La infusión demostró actividad antiinflamatoria en el modelo de edema de oreja de ratón inducida por TPA tanto para la infusión (30%) como para el extracto de metanol (58%) de *H. bonariensis*.
  - **Estas actividades farmacológicas se reportan por primera vez para esta especie.**



- ✓ Se determinó la actividad antioxidante y la actividad antiproliferativa en la infusión y el extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*.
- ✓ El extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis* demostró inhibir la peroxidación de los fosfolípidos del huevo indicando actividad antioxidante con una  $CE_{50}$  de 812,83  $\mu\text{g/ml}$ .
- ✓ La actividad sobre la proliferación celular en la línea celular de linfomas murinos fue de  $CE_{50}$  de 5,0  $\mu\text{g/ml}$  para la infusión y de 25,7  $\mu\text{g/ml}$  para el extracto de metanol de las partes aéreas de *H. bonariensis*.
- ✓ La viabilidad celular en células normales de linfocitos de ganglios linfáticos se demostró que la infusión presentó menor toxicidad con una  $CC_{50}$  mayor a 1000  $\mu\text{g/ml}$ .
  - **Esta es la primera vez que se informan estos resultados de las partes aéreas de *H. bonariensis***
- ✓ Tanto la infusión ( $CE_{50}$ ,84,0  $\mu\text{g/ml}$ ) como el agua de diálisis ( $CE_{50}$  239,0  $\mu\text{g/ml}$ ) y el dializado ( $CE_{50}$  de 41,0  $\mu\text{g/ml}$ ) presentaron actividad eliminadora del radical DPPH siendo el dializado el más potente.
- ✓ El dializado presentó mayor potencia para la eliminación del radical en la determinación del SOD con una  $CE_{50}$  de 22,0  $\mu\text{g/ml}$ , así como también fue el dializado el que evidenció una mayor capacidad reductora del Fe con una  $CE_{50}$  de 224,0  $\mu\text{g/ml}$ .
- ✓ Tanto la infusión como el agua de diálisis y el dializado disminuyeron la producción basal de NO en relación a la concentración en el estudio de la actividad inmunomoduladora.
  - **La infusión presenta actividad antiproliferativa en células de linfoma ejerciendo efecto citotóxico y citostático dependiendo de la concentración, sin afectar a linfocitos normales. Los azúcares juegan un rol muy importante en la actividad antiproliferativa de la infusión.**



- ✓ La infusión produjo la disminución de la viabilidad celular de los linfocitos a concentraciones mayores de 10 µg/ml y aumentó la proliferación celular en concentraciones bajas, en tanto el dializado y el agua de diálisis presentaron una respuesta bifásica.
  - **Podemos observar que los azúcares presentes en la infusión de las partes aéreas de *H. bonariensis* demostraron actividad inmunosupresora y antiinflamatoria en macrófagos a través de la inhibición en la producción de ON estimulado por LPS.**
  - **Los hidratos de carbono son los responsables de la actividad inmunomoduladora ejerciendo su actividad inmunosupresora o antiinflamatorio, que además no son citotóxicos para células normales y que podrían modular al sistema inmune.**
  - **Los hidratos de carbono guardan estrecha relación con los usos tradicionales de la especie como antiinflamatorio a nivel de la piel y antiséptico, en lo que participan también los fenoles caracterizados, principalmente hiperósido y ácido clorogénico.**



# *Bibliografía*

Abu-Amsha R., Croft K.D., Puddey I.B., Proudfoot J.M., Beilin L.J. (1996) Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: Identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clin Sci (Lond)* ;91(4):449-58.

Ahmed A.E.R., Labavitch J.M. (1977). A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *J. Food Biochem.*,1: 361-365.

Alcalde Bahamonde, S.M. (2013) Actividad farmacológica y estudio fitoquímico de *Chilotrimum diffusum* (Asteraceae). Tesis doctoral, FCNyCS, UNPSJB.

Alexander B., Browse D.J., Reading S.J., Benjamin I.S. (1999) A simple and accurate mathematical methods for calculation of the EC<sub>50</sub>. *Pharmacology and Toxicology* 41: 55-58.

Albersheim P., Nevins D.J., English P.D., Karr A. (1967) A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, 5: 340-345.

Alonso J. (2004) Tratado de Fitofármacos y Nutraceúticos. Editorial Corpus, Rosario, pp. 316-321.

Alonso M.J. (2009) *Centella asiatica*. Una planta con historia e interesantes propiedades. *Ambito Farmacéutico Fitoterapia*. Ed. Elsevier. Vol. 8 (5).

M. Andersen M., Markham K.R. (2006) Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications.

Anesini C., Genaro A., Cremaschi G., Sterin Borda L., Cazux C., Borda E. (1996) Immunomodulatory activity of *Larrea divaricata* Cav. *Fitoterapia*, 67: 329-333.

Apdti R., Szentrihdyi K., Baldzs A., Baurnann D., Harnburge M., KristóT.Sz., Szöke E., Kéry A. (2002) HPLC Analysis of the Flavonoids in Pharmaceutical Preparations from Canadian Goldenrod (*Solidago canadensis*). *Chromatographia*56, Suppl. S65-S68.

Arenas J.A.; García F. (1993) Atlas Carpológico de Apioideae, Ruizia tomo 12, Madrid. Monografías del Real jardín Botánico.

Azis H.A., Taher M., Ahmed A.S., Sulaiman W.M.A.W., Susanti D., Chowdhury S.R., Zakaria Z.A. (2017) *In vitro* and *In vivo* wound healing studies of methanolic fraction of *Centella asiatica* extract. *South African Journal of Botany* 108 (2017) 163–174. Elsevier





Baggio CH, Freitas CS, Twardowschy A, dos Santosa AC, Mayer B. (2012) *In vivo/in vitro* studies of the effects of the type II arabinogalactan isolated from *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek on the gastrointestinal tract of rats. *Z Naturforsch C* 67: 405

Barnes J., Anderson L., Phillipson D. (2005) *Plantas Medicinales*. 1<sup>o</sup> ed. Pharmaeditores, Barcelona, pp.278-280.

Becherel, P. A., Chosidow, O., LeGoff, L., Frances, C., Debre, P., Mossalayi, M. D., Arock, M. (1997) Inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression by human keratinocytes during acute urticaria. *Molecular medicine* 3: 686-694.

Blois, M. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26:1199-1200.

Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, 54: 484-489.

Bonifati, C., Carducci M., Cordiali Fei P., Trento E., Sacerdori G., Fazio M., Ameglio F. (1994) *Clin. Exp. Dermatol.* 19: 383-7.

Borges Bubols G., da Rocha Vianna D., Eifler-Lima and V.L., Garcia S.C., Lamuela-Raventos R.M., Medina-Remón A., von Poser G. (2013) The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13, 000-000

Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D., Hahn, E.G. (2000) Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine* 7 (5), 427.

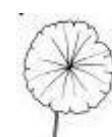
Bruneton J. (2001) *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. Segunda Edición.* Editorial Acriba, S.A. Zaragoza. España.

Brufau R.M.; Corbalán Berná J.; Brufau Redondo C.; Ramirez Andreo A. y Limiñana Gras R.M. (2010) Estilos de personalidad en pacientes con psoriasis. *Anales de psicología*, vol. 26, N° 2 (julio), 335-340.

Burits M., Bucar F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res.* 14: 323-328.

Buzzi A. (2011) Historia de la psoriasis. *Revista Latinoamericana de Psoriasis y Artritis Psoriásica*, 4: 1-3.

Cabrera A.L. (1965) *Flora de la Provincia de Buenos Aires. Parte IV. Colección Científica del INTA, Buenos.Aires.*, pp. 375-381.



Carrillo, M C., Kanai, S., Nokubo, M., Kitani, K., (1991). Derprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *LifeScience*, 48, 517-521.

Carretero Accame M.E. (2013) Plantas medicinales y derivados en dermatología (III): Centella. *Panorama Actual Med.* 37 (365)

Carlson RP, O'Neill-Davis L, Chang J, Lewis AJ. (1985) Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase and inhibitors and other pharmacological agents. *Agents and Actions*;17:197-204

Carpita, N.C., Gibeaut, D.M. (1993). *Plant J.* 3, 1.

Castelli, A; Maisterrena, CE; Kerzberg, EM; Panelo, A; Bermolen, L; Vázquez, S. (2012) Calidad de vida en fibromialgia y artritis psoriasica. *Revista Latinoamericana de Psoriasis y Artritis Psoriásica*, 5: 26-33.

Chandler G.T.; Plunkett G. M. (2004) Evolution in Apiales: nuclear and chloroplast markers together in (almost) perfect harmony. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 144 (2): 123–147.

Clark R.A., Kupper T.S. (2006) Misbehaving macrophages in the pathogenesis of psoriasis. *The Journal of Clinical Investigation* Volume 116 (8).

Constance, L. (1988) Umbelliferae. En N.M. Correa (ed.), *Flora Patagónica*, Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu. 8 (5), 310.

Córdoba O.L., Linskens S.B, Dacci E., Santomé J.A. (1997) In gel cleavage with cyanogen bromide for protein internal sequencing. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 35: 1-10.

Cremaschi G.A., Genaro A.M., Sterin Borda L. (1989) Colchicine blocks beta adrenoceptor and class I antigen-specific interactions. *Molecular immunology* 26: 601-609.

Cuesta O.R., Márquez I. H, Campo M. F. (2015) *Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides*. Universidad Técnica de Machala Ed.Utmach

Dartora N., de Souza L.M., Paivaa S.M.M., Scoparoa C.T., Iacomina M., Gorina P.J., Rattmanna Y., Sassakia G.L. (2013) Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: A potential adjuvant in sepsis treatment. *Carbohydrate Polymers* 92: 1776–1782.

Davydov M., Krikorian A.D. (2000) *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. *J Ethnopharmacol*, 72(3): 345-93.



Deepa y Nalini (2013) Phytochemical screening, total phenolic content and *in vitro* antioxidant studies of leaf, bark and flower extracts of *Schefflera* spp. (Araliaceae) Journal of Applied Pharmaceutical Science 3(11):94-98.

DiGiovani J. (1992) Multistage carcinogenesis in mouse skin. Pharmacology and Therapeutic 54, 63-128.

Dodgson K.S. (1961) Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphateesters. Biochem. J.,78: 312-319.

Dodgson K.S., Price R.G. (1962) A note on the determination of ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochem. J., 84: 106-110.

Domínguez, X.A. (1979) Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa, México.

Dubray G., Bezar G. (1982) A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 119, 325-329.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956) Colorimetric method of determination of sugars and related substances. Anal. Chem.,28: 350-356.

Fairbanks O., Steck T.L., Wallach D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochem., 10 (13): 2606-2617.

Farmacopea Argentina VII 2013.

Farmacopea Argentina VII Ed., Vol. 1, 2003.

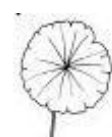
Farmacopea Nacional Argentina, 1978. VI Edición. Buenos Aires, Argentina.

Fernández T., Wagner M., Varela B., Ricco R., Hajos S., Gurni A., Alvarez E. (1998) Study of Argentine mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. Et P.) Tiegh. (Loranthaceae). Journal of Ethnopharmacology 62 (1) : 25-34.

Ferraro G., Hnatyszyn O. (1997) Farmacognosia y el estudio de las plantas medicinales.

Ferraro G., Anesini C., Ouviaña A., Retta D., Filip R., Gattuso M., Hnatyszyn O., Bandoni A. (2008) Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Extracts of *Achyrocline satureioides* Flowers from Different Zones in Argentina. Latin American Journal of Pharmacy 27 (4): 626-628.

Ferraro G.E., Martino V.S., Bandoni A.L., Nadinic J.L. (2012) Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales. 1ª ed. Buenos Aires.



- Ferreira D.M., Mota da Silva L., Gasparin D.A., Mendes B., Almeida Cabrini D., Machado Nascimento A., Iacomini M., Cipriani T.R., Soares Santos A.R., de Paula Werner M.F., Hatsuko Baggio C. (2012) Rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen: Gastroprotective and Ulcer Healing Properties in Rats. PLOS 9 (1): 1-1,1.
- Ferreira, I.C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M., Barros L. (2007) Free radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushroom from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food. Chem.,100: 1511-1516.
- Filisetti-Cozzi T.M.C.C.,Carpita N.C.(1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Anal. Biochem.,197:157-162.
- Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina): Dicotiledóneas arquiclamídeas. Geraniales a Umbelliflorales. Secretaría de Agricultura. Ganadería, Pesca y Alimentos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2005.
- Flores, M.L., 2000. Estudio de las paredes celulares del alga roja *Iridaea undulosa* Bory. Tesis doctoral, FCN, UNPSJB.
- Flores, M.L., Stortz, C.A., Cerezo, A.S., 2000. Int. J. Biol. Macromol. 27, 21.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226: 497-509.
- Folin O, Ciocalteu V. (1927) J Biol Chem.,27: 627.
- Gerber M. (1997) Olive oil, monounsaturated fatty acids and cancer. Cancer Letters.114:92-92.
- Graph a Pad in a Stat. (1998) Version 3.01, 32 bit for Win 95/NT. Registered to Pink-Brain, Acme Labs, GTA-31074-734.
- Grimalt, F., Cotterill, J. A. (2002). Dermatología y Psiquiatría. Grupo Aula Médica, 329.
- Gulcin I. (2006) Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology, 217(2-3):213-20.
- Gutteridge J., Mitchell J. (1999) Redox imbalance in the critically ill. British Medical Bulletin, Volume 55, Issue 1, Pages 49–75.
- Hames B.D. (1990) One dimensional polyacrylamide gel electrophoresis en Gel Electrophoresis of Proteins. A practical approach, 2° Ed. Cap. 1, B.D. Hames y D. Rickwood Eds. Oxford University Press, USA.



Harbone, J.B., Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoids research since 1992, *Phytochemistry* 55: (6) 481-504.

Harborne, J.B., 1994. *The Flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London, p 339.

Harizi H., Chaabane F., Ghedita K., Chekir\_Ghedita L. (2011) Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation *in vitro* by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium*. *Cellular Immunology* 267: 94-101.

Hieronymus J. (1882) *Plantae Diaphoricae*. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba, Tomo IV, pp. 323-324.

Hsieh Yves S.Y., Liao Shih-Fen, Yang Wen-Bin (2009) Biologically Active Polysaccharides in Medicinal Plants. *New Zealand Journal of Forestry Science* 39: 217-223.

Izco, J. y col. (1998) *Botánica*. Mc. Graw Hill. Buenos Aires. 1-781 pp.

Jay G.D., Culp D.J., Jahnke M.R. (1990) Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate-binding dyes. *Anal. Biochem.*, 185: 324-330.

Jayathirtha M.G., Mishra S.H. (2004) Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. *Phytomedicine* 11(4) 361-365.

Jian-Hua Xie, Ming-Liang Jin, Gordon A. Morris, Xue-Qiang Zha, Han-Qing

Chen, Yang Yi, Jing-En Li, Zhi-Jun Wang, Jie Gao, Shao-Ping Nie, Peng Shang & Ming-Yong Xie (2016) Advances on Bioactive Polysaccharides from Medicinal Plants, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:sup1, S60-S84, DOI: 10.1080/10408398.2015.1069255

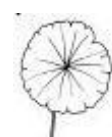
Karakaya S. (2004) Bioavailability of phenolic compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 44(6):453-64.

Kennedy, J. F. (1989) *In carbohydrates*. Oxford: Oxford University Press.

Kennedy G.L., Ferenz R.L., Burgess B.A. (1986) Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD50. *J. Appl. Toxicol.*; 6: 145-148.

Kuklinski C. (2000) *Farmacognosia*. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega, Barcelona, pp.361- 362.

Laboratorio de Sistemática de Plantas vasculares 2017. [www.thecompositaehut.com](http://www.thecompositaehut.com)



Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lahitte, H. B.; J. A. Hurrell; L. Jankowski; D. Bazzano; A. Sáenz; M. Tourn & G. Roitman (2000) Plantas trepadoras Nativas y Exóticas. Biota Rioplatense Inventario de la biota de la región del Delta del Paraná, Isla Martín García y Ribera Platense. Literature of Latin America (L.O.L.A.). Buenos Aires, Argentina. 264 p.

López, A. (1993) Flora del Bajío y de regiones Adyacentes: Araliaceae. D.F. México, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Lorenzi H, Matos FJA (2002) Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. 1st ed., Instituto Plantarum, Nova Odessa, 511 pp.

Lucena I. D., Novara L. J., Cuezco A. R. (2001) Apiaceae. Aportes Botánicos de Salta - Serie Flora, 6 (11). pp. 1-75. ISSN 0327- 506X

Lui E.M.K., Azike C.G., Guerrero-Analco J.A., Romeh A.A., Pei H., S.J.Kaldas, Arnason J.T., Charpentier P.A. (2011) Bioactive Polysaccharides of American Ginseng *Panax quinquefolius* L. in Modulation of Immune Function: Phytochemical and Pharmacological Characterization. The Complex World of Polysaccharides.

Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. (1970) The Systematic Identification of Flavonoids. Editorial Springer. Nueva York.

Manzi A.E., Ancibor E., Cerezo A.S. (1990) Cell-wall carbohydrates of the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*. *Plant Physiol.*, 92: 931–938.

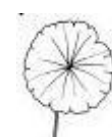
Marzocca A. (1997) Vademécum de Malezas Medicinales de la Argentina. Indígenas y Exóticas. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires., pp.225-226 .

Masoumian M., Arbakariya A., Syahida A., Maziah M. (2011) Effect of precursors on flavonoid production by *Hydrocotyle bonariensis* callus tissues. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(32), pp. 6021-6029.

Mattei R., Paz Barros M., Galvão S.M., Bechara E.J., de Araujo Carlini E.L. (2001) *Heteropteris aphrodisiaca* O. Machado: effects of extract BST 0298 on the oxidative stress of young and old rat brains. *Phytother Res*; 15(7):604-7

Matulevich-Peláez J.A, Castrillón-Cardona W.F., Chitiva-Chivita L.C. (2017) Estudio fitoquímico y evaluación de la capacidad antioxidante de hojas de *Senna reticulata* obtenidas en la región andina colombiana. *Revista Científica*, 29 (2), 149-163.

Maulidiana, Faridah Abasa,b, Alfi Khatiba,c, Khozirah Shaaria,d, Nordin H. Lajis (2014) Chemical characterization and antioxidant activity of three medicinal Apiaceae species. *Industrial Crops and Products* 55, 238–247.



Mazzini M.N., Cerezo A.S. (1979) Polysaccharides from the seed of *Gleditsia triacanthos*. Part II. The polysaccharides remaining after the extraction of the galactomannan. Analysis of the products extracted with 7M urea and 1 % ammonium oxalate solutions. Rev. Latinoam. Quím., 10: 157-160.

Mengome L.E., Voxeur A., Akue J.P., Lerouge P. (2014) Screening of antioxidant activities of polysaccharides extracts from endemic plants in Gabon. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre 3, 77-88.

Miri, R., Saadati, H., Ardi, P., Firuzi, O. (2011) Alterations in oxidative stress biomarkers associated with mild hyperlipidemia and smoking. Food Chem Toxicol.,50 (3-4), 920-926.

Moro, A.M., Charao, M., Brucker, N., Bulcao, R., Freitas, F., Guerreiro, G., Baierle, M., Nascimento, S., Waechter, F., Hirakata, V., Linden, R., Thiesen, F.V., Garcia, S.C. (2010) Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. Sci Total Environ.,408 (20), 4461-4467.

Morrison I.M. (1988) Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid. Phytochemistry, 27: 1097-1100.

Murakami A., Nakamura Y., Torika K., Tanaka T., Koshiva T., Koshimizu K., Kuwahara S., Takahashi Y., Ogawa K., Yano M., Tokuda H., Nishino H., Mimaki Y., Sashida Y., Kitanaka S., Obigashi H. (2000) Inhibitory effects of citrus nobiletin on Phorbol ester induced skin inflammation oxidative stress, and tumor promotion in mice. Cancer research 60, 5059-

Murokawa, M., Yamaoka K., Tanaka Y., Fukuda Y. (2006) J. Ethnopharmacol. 71: 1331-6.

Mutua P., Gicheru M., Makanya A.N., Kliama S.G. (2013) Anti-proliferative activities of *Centella asiatica* extracts on human respiratory epithelial cells in vitro. Int. J. Morphol., 31(4):1322-1327.

Nakamura Y., Kozuka M., Takabayashi S., Tonka K., Hayashi K., Sato T., Ohigashi H., Osawa T. (2003) Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICU mouse skin: differential roles of 5- lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. Free Radical Biology & Medicine 35, 997-1007.

Natarajan S., Paily P.P. (1973) Effect of topical *Hydrocotyle asiatica* in psoriasis. Indian J Dermatol 18: 82-85.

Nishizuka, Y. (1988) Nature 334: 661-5.



- Oakley B.R., Kirsch D.R., Morris N.R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 105: 361-363.
- Olfert E.D., Cross B.M., Mc William A.A. (1993) Canadian Council of animal care guide to the care and use of experimental animals, vol1. 2nd ed.
- Papp, K.A. (2004) *Expert Opin. Pharmacother.* 5: 2139-46.
- Paris R.R. (1981) *Collection de Précis de Pharmaciesons la Direction de M.M. Janot Matière Médicale. Tomo II, 2º ed., Masson, Paris, p.481.*
- Peng Wong S., Peng Leong L., Hoe J., Koh W. (2006) Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry Volume 99, Issue 4, Pages 775-783.*
- Plunkett G.M., Soltis D.E., Soltis P.S. (1996) Higher level relationships of Apiales (Apiaceae and Araliaceae) based on phylogenetic analysis of rbcL sequences. *American Journal of Botany*, Vol. 83, No. 4, pp. 499-515
- Plunkett G.M., Soltis D.E., Soltis P.S. (1997) Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on matK and rbcL sequence data. *American Journal of Botany* 84(4): 565–580.
- Plunkett G.M., Chandler G.T., Lowry P.P., Pinney S.M., Sprenkle T.S. (2004) Recent advances in understanding Apiales and a revised classification. *South African Journal of Botany*, 70(3): 371–381.
- Plunkett G.M., Wen J., Lowry P.P. (2004) Intrafamilial classifications and characters in Araliaceae: Insights from the phylogenetic analysis of nuclear (ITS) and plastid (trnL-trnF) sequence data. *Plant Systematics and Evolution.* 245: 1–39
- Polo de Santos M. (2016) Estudio de la actividad antioxidante de las aguas mineromedicinales (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid.
- Ratera L.E., Ratera M. (1980) Plantas de la flora Argentina empleadas en Medicina Popular. Editorial Hemisferio Sur, Buenos.Aires., p 139.
- Rath S., Trivelin L.A., Imbrunito T.R., Tomazela D.M., Jesús M.N., Marzal P.C. (2003) Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art. *Quím. Nova.* 26:550–555.
- Romero C.R., Jorge N.L, Gómez Vara, M.E. (2004) Caracterización de especies de *Ilex* mediante perfiles cromatográficos en fase gaseosa de los componentes volátiles extraídos del vapor en equilibrio con el material vegetal. Universidad Nacional del Nordeste. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.*





Saintot M., Astre C., Pujol H., Gerber M. (1996) Tumor progression and antioxidant status. *Carcinogenesis* 17, 1267-1271.

Slaga T. L. (1984) Mechanism involved in two cages carcinogenesis in mouse In. Slaga T.L. (Ed,) Mechanisms of tumor promotion. Vol. 2 CBC, pressed: Boca Raton F.L. 0- 1- 16.

Sampson J.H., Raman A.,Karlsen G., Navsaria H., Leigh I.M. (2001). *In vitro* keratinocyte antiproliferant effect of *Centella asiatica* extract and triterpenoid saponins. *Phytomedicine* 8 (3): 230-5.

Seymour F.R., Chen E.C.M., Bishop S.H.( 1979) Identification of aldoses by use of their peracetylated aldononitrile derivatives: a G.L.C.-M.S. approach. *Carbohydr.Res.*, 73: 19-45.

Schenkel E.P., Gosmann G., Petrovic P.R. (2000). Produtos de origem vegetal e o Desenvolvimento de medicamentos. En: Farmacognosia da planta ao medicamento. 2º Edición. Editora da Universidade Federal do Río Grande do sul.

Schetkin I.A., Faulkner C.L., Nelson-Overton L.K., Wiley J.A., Quinn M.T. (2005) Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. *International Immunopharmacology* 5: 1783 – 1799

Shea E.M., Carpita N.C. (1988) Separation of partially methylated alditol acetates on SP-2330 and HP-1 vitreous silica capillary columns. *J. Chromatogr.*, 445: 424-428.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.

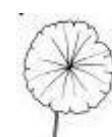
Souza V.C., Lorenzi H. Famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseadoem APG II. 2ª Edição. 326-328 pp. Ed.

Stahl E (1969). Thin- layer Chromatography. A Laboratory Handbook. Springer VerlagBerlin. Heidelberg. New York.

Stortz, C. A. (1984) Estudio de los carragenanos “solubles” del alga roja *Iridaea undulosa* Bory (Familia: Gigartinaceae). Tesis Doctoral, FCEN, UBA..

Stortz C.A., Cases M.R., Cerezo A.S. (1997) The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the red seaweed *Iridaeaundulosa*. *Carbohydr. Polym.*, 34: 61-65.

Su-Jin Kim ,Jae-Young Um,Seung-Heon Hong,andJu-Young Lee (2011). Anti-Inflammatory Activity of Hyperoside Through the Suppression of Nuclear Factor-κB



Activation in Mouse Peritoneal Macrophages The American Journal of Chinese Medicine Vol. 39, No. 01, pp. 171-181

Sudhakaran M.V. (2017) A Multifaceted Journal in the field of Natural Products and Pharmacognosy. Pharmacognosy Journal 9(4):546-558.

Sun Y. X., Liu J. C., Kennedy J. F. (2010) Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from the fruiting bodies of *Chroogomphis rutilus* (Schaeff.:Fr.) O.K. Miller by Box–Behnken statistical design. Carbohydrate Polymers, 82,209–214.

Taik-Koo Yun (2001) La Academia Coreanade las ciencias médicas. Brief Introduction of *Panax ginseng* C.A. Meyer. J KoreanMedSci; 16 (supl.): S3-5,ISSN 1011-8934,

Tabopda T.K., Mitaine-Offer A.C., Miyamoto T., Tanaka C., Mirjolet J.F., Duchamp O., Tchaleu Ngadjui B., Lacaille-Dubois M.A. (2012) Triterpenoid saponins from *Hydrocotyle bonariensis* Lam. Phytochemistry 73: 142-147.

Tempone A.G., Sartorelli P., Teixeira D., O Prado F., Calixto I ARL, Lorenzi H., Melhem M.S.C. (2008). Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 103 (5), 443.

Trease Evans (1991). Farmacognosia. 13ª Edición. Ed. Interamericana.McGraw-Hill.

Toursarkissian M. (1980) Plantas Medicinales de la Argentina. Editorial Hemisferio Sur ,Buenos.Aires., p 131.

Vanaclocha B., Cañigueral S. (2003) Fitoterapia. Vademécum de Prescripción.4º ed., Masson, Barcelona, p.182.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol.: 39(1), 44-84.

Villar A.M., Naval M.V. y Gómez-Serranillos M.P. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia.UCM. 68 Farmacia Profesional Vol. 16 N° 10 Noviembre 2003.

Waldi D., 1965. N. Spray reagents for thin layer chromatography. En: Thin layer chromatography. A Laboratory Handbook. Egon Sthal editor. Springer-Verlag Academic Press. Berlin, Heidelberg, New York: 483-502.

Wagner H., Bladt S. (1996) Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Second edition. Springer Verlag, Berlin.

Wagner H., Bladt S. (2009) Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Second edition. Springer Verlag, Berlin.

Wagner H., Wisenauer M. (2006) Fitoterapia 2º ed. Pharmabooks Editora.



Wang XS, Dong Q, Zuo JP, Fang JN. (2003) Structure and potential immunological activity of a pectin from *Centella asiatica* (L.) Urban. Carbohydrate Research. 338 (22):2393–2402.

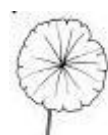
Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. (1962). Carragenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 111:554 - 547.

WHO (World Health Organization). *Ginseng radix*. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants, vol 1 y vol. 4, 1999.

Wilmer, J.L., Burleson F.G., Kayama F., Kanno J., Luister M.L. (1994) J. Invest. Dermatol. 102:915-22

Xiaolin Yanga, Rufeng Wang, Shaopeng Zhang, Wenjun Zhu, Jin Tang, Jianfang Liu, Ping Chen, Dongmei Zhanga, Wencai Yea, Yonglian Zhengca Institute (2014) Polysaccharides from *Panax japonicus* C.A. Meyer and their antioxidant activities. Carbohydrate Polymers 101: 386-391.

Zhang Z.P., Shen C., Gao F., Wei H., Ren D., Lu J. (2017) Isolation, Purification and Structural Characterization of Two Novel Water-Soluble Polysaccharides from *Anredera cordifolia*. Molecules 22: 1276.



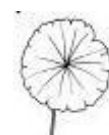
## Resumen

*Hydrocotyle bonariensis* Lam (Araliaceae) conocida como “paragüita”, “redondita de agua”, “tembladerilla” es una especie autóctona de la República Argentina que crece en la Provincia de Buenos Aires en la costa Rioplatense. Se utiliza popularmente para el tratamiento de eritemas y psoriasis. Las infusiones preparadas con las hojas, sumidades floridas y tallos se usan en medicina popular y se le adjudican propiedades diuréticas, estimulantes, emenagogas y antisépticas. Por otro lado, las hojas maceradas en alcohol se utilizan externamente en cataplasmas para curar heridas inflamadas e inflamaciones del cutis. Taxonómicamente se relaciona con *Hydrocotyle asiatica* (= *Centella asiatica*), la cual posee numerosos usos popularmente en patologías dérmicas como cicatrización de heridas y escaras, psoriasis, úlceras dérmicas y quemaduras. Dado el uso popular y la cercanía con la centella asiática, se encaró el estudio fitoquímico-farmacológico de esta especie Sudamericana.

Se utilizaron las partes aéreas de *H. bonariensis* colectadas en el Parque Pereyra Iraola de la Provincia de Buenos Aires. Se realizaron extractos de metanol, acetato de etilo e infusión. El análisis fitoquímico del extracto de metanol permitió observar un amplio perfil fenólico, de los cuales fueron aislados e identificados por métodos espectrofotométricos, los flavonoides, rutina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, hiperósido y compuestos fenil propanoides (ácido clorogénico e isoclorogénico). La infusión fue purificada por diálisis a fin de separar los polisacáridos de los polifenoles. La infusión, presentó un 25% de hidratos de carbono solubles, destacándose en su composición ramnosa, galactosa, glucosa y ácidos urónicos (~ 5%); dichos monosacáridos fueron corroborados mediante HPLC-RI. Además, se determinó un 7% de grupos sulfatos, lo cual sumado a los monosacáridos constituyentes, evidenció la presencia de oligo y/o polisacáridos en el extracto.

Al efectuar la cuantificación por HPLC de azúcares totales, el dializado resultó constituido exclusivamente por hidratos de carbono (100%), expresados como galactosa, ramnosa, glucosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico. Los ácidos urónicos representaron el 5%. Las aguas de diálisis en cambio, contenían además, flavonoides y otros metabolitos polares.

En el estudio de las actividades farmacológicas, que se reportan por primera vez para esta especie, los resultados obtenidos demuestran que:

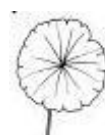


La infusión evidenció la ausencia de toxicidad aguda ensayada en ratones a una dosis de 5 g/kg administradas por vía oral, lo que demuestra un alto grado de seguridad en su uso tradicional, y se demostró actividad antiinflamatoria en el modelo de edema de oreja de ratón inducida por TPA tanto para la infusión (30%) como para el extracto de metanol (58%) de *H. bonariensis*.

Dado que la actividad antiinflamatoria guarda relación con la actividad antioxidante y la actividad antiproliferativa se estudiaron estos efectos en la infusión y el extracto de metanol. En la determinación de la actividad inhibitoria de la peroxidación de los fosfolípidos del huevo los extractos produjeron disminución en la absorbancia de malondialdehído indicando actividad antioxidante, siendo el extracto de metanol el más activo con una  $CE_{50}$  de 812,83  $\mu\text{g/ml}$ . Respecto a la actividad sobre la proliferación celular en la línea celular de linfomas murinos fue de  $CE_{50}$  de 5,0  $\mu\text{g/ml}$  para la infusión y de 25,7  $\mu\text{g/ml}$  para el extracto de metanol. En tanto en la determinación del efecto de la viabilidad celular en células normales de linfocitos de ganglios linfáticos, la infusión presentó menor toxicidad con una  $CC_{50}$  mayor a 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

El efecto antiinflamatorio de la infusión parecería deberse a compuestos de naturaleza fenólica y el efecto antiproliferativo estaría estrechamente relacionado con la presencia de los hidratos de carbono, por lo que se trabajó con el agua de diálisis y el dializado de la infusión. Tanto la infusión ( $CE_{50}$ , 84,0  $\mu\text{g/ml}$ ) como el agua de diálisis ( $CE_{50}$  239,0  $\mu\text{g/ml}$ ) y el dializado ( $CE_{50}$  de 41,0  $\mu\text{g/ml}$ ) presentaron actividad eliminadora del radical DPPH siendo el dializado el más potente. Asimismo, este dializado presentó mayor potencia para la eliminación del radical en la determinación del SOD con una  $CE_{50}$  de 22,0  $\mu\text{g/ml}$ . En el estudio de determinación de la capacidad reductora del Fe, nuevamente el dializado evidenció una mayor con una  $CE_{50}$  de 224,0  $\mu\text{g/ml}$ .

Con el fin de evaluar la actividad inmunomoduladora en relación con la actividad antiinflamatoria, se utilizaron macrófagos murinos y linfocitos de ganglios linfáticos de animales normales. Tanto la infusión como el agua de diálisis y el dializado disminuyeron la producción basal de NO en relación a la concentración. Estos resultados indican que los tratamientos se comportan como inmunosupresores. Por otro lado, la infusión produjo la disminución de la viabilidad celular de los linfocitos a concentraciones mayores de 10  $\mu\text{g/ml}$  y aumentó la proliferación celular en concentraciones bajas, en tanto el dializado y el agua de diálisis presentaron una respuesta bifásica disminuyendo la proliferación en concentraciones bajas y estimulando en concentraciones más altas. El agua de diálisis presentó menor efecto estimulador que la infusión. De esta manera podemos observar que los azúcares presentes en la infusión de *H. bonariensis* demostraron actividad inmunosupresora y antiinflamatoria en



macrófagos a través de la inhibición en la producción de ON estimulado por LPS. También son los responsables de la actividad inmunomoduladora ejerciendo su actividad inmunosupresora o antiinflamatorio, que además no son citotóxicos para células normales y que podrían modular al sistema inmune.

Este trabajo de investigación hace un aporte al conocimiento integral de la especie medicinal argentina *Hydrocotyle bonariensis* Lam. y permite validar su uso tradicional como antiinflamatoria y antiproliferativa.

