



Naturalis

Repositorio Institucional

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Estudio de la capacidad antimutagénica del extracto acuoso de *Baccharis articulata* [Lam.] Persson

Rodríguez, María de las Nieves

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Gianuzzi, Leda

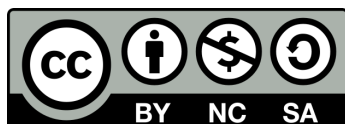
Co-dirección: Larramendy, Marcelo L.

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

2014

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20140812001354>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

**Estudio de la capacidad antimutagénica del
extracto acuoso de *Baccharis articulata*
(Lam.) Persson**

Lic. María de las Nieves Rodríguez

Trabajo para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales

Directores de Tesis: Dres. Leda Giannuzzi y Marcelo L. Larramendy

2013

A mis hijas Paula y Nieves

A mis nietos Santiago, Clara, Pilar, Camilo y el pequeño Ulises

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis Dres. Leda Giannuzzi y Marcelo L. Larramendy, por ser la guía para la realización de esta Tesis Doctoral

A Dra. Noemi Zaritzky y el Dr. Rodolfo Mascheroni, por haberme permitido realizar mi Tesis Doctoral en el CIDCA

A las Dra. Noemi Zaritzky, por su apoyo crítico y enriquecedor. Y a su comprensión en los momentos difíciles de mi vida.

A la Dra. Cristina Añon, por sus consejos en los momentos en que los necesité

A la Dra. Etile Spegazzini, por haber clasificado el material utilizado en mi Tesis Doctoral

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, mi casa de estudios

A mis compañeros del CIDCA, a cada uno de ellos por ayudarme de diferente manera, pero imprescindibles para concretar esta meta

A la Dra. Maria Mercedes Lojo, por compartir sus conocimientos, así como haber trabajado juntas en la Cátedra de Genética Microbiana

Al Dr. Mario Reta por ayudarme con las determinaciones en el HPLC

Al Dr. Ariel Vicente por su guía en las determinaciones de la actividad antioxidante

A Sebastian Real diseñador gráfico que me ayudó desinteresadamente para hacer mis separadores

A mis amigas, Luci Brandi, Alicia Murray, Norita Martinez, Fernanda Coll Cárdenas, Susana Ilhero, Mercedes Lojo y Lucrecia Ametrano por estar siempre

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 10 |
| SUMMARY | 14 |
| LISTADO DE PUBLICACIONES CIENTÍFICAS | 17 |
| ABREVIATURAS..... | 18 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 23 |
| 1.1. El hombre y la alimentación | 24 |
| 1.2. El hombre y las plantas medicinales..... | 27 |
| 1.2.1. Elementos medicinales de las plantas | 32 |
| 1.3. Químio-protección..... | 33 |
| 1.4. Fenoles y antioxidantes | 35 |
| 1.5. Hierba medicinal: <i>Baccharis articulata</i> (Lam.) Persoon “Carqueja” | 38 |
| 1.6. Clasificación y estructura general de <i>B. articulata</i> | 39 |
| 1.7. Componentes químicos y propiedades generales de <i>B. articulata</i> (Lam.) Persoon | 42 |
| 1.8. Actividad toxicológica de las especies conocidas como “carquejas” | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 1.9. Estudios mutagénicos y antimutagénicos del género <i>Baccharis</i> | 46 |
| 1.10. Mutagénesis..... | 48 |
| 1.11. Mecanismos de reparación | 51 |
| 1.12. Ensayo de Ames..... | 55 |
| 1.12.1. <i>Salmonella</i> ensayo microsomal: un “ensayo de reversión” | 55 |
| 1.12.2. Lineamientos generales del Ensayo de Ames | 56 |
| 1.13. Secuencias “blanco” de ADN de las cepas de <i>S. typhimurium</i> | 61 |
| 1.14. Antimutagénesis | 62 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 67 |
| 2.1. Hipótesis | 68 |
| 2.2. Objetivo General..... | 68 |
| 2.3. Objetivos Específicos | 68 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 70 |
| 3.1. Sustancias Químicas..... | 71 |
| 3.2. Soluciones y Medios de cultivo..... | 72 |
| 3.3. Material utilizado: hierba medicinal <i>B. articulata</i> (Lam.) Persoon..... | 73 |

| | |
|---|----|
| 3.4. Método utilizado para la obtención del extracto acuoso de <i>B. articulata</i> (EAB) | 74 |
| 3.5. Determinación de los polifenoles en el EAB por cromatografía líquida de fase inversa (RF-HPLC)..... | 75 |
| 3.6. Evaluación de la actividad antioxidante del EAB | 79 |
| 3.6.1.Procedimiento desarrollado para la determinación de la actividad antioxidante del EAB | 80 |
| 3.7. Cepas bacterianas seleccionadas para la realización del Ensayo de Ames | 82 |
| 3.8. Confirmación de las características genotípicas de las cepas de <i>S. typhimurium</i> | 84 |
| 3.9. Evaluación del efecto tóxico del EAB y del ácido clorogénico frente a las cepas de <i>S. typhimurium</i> | 86 |
| 3.9.1. Evaluación del efecto tóxico del EAB mediante el ensayo de incorporación en placa | 86 |
| 3.9.2. Evaluación del efecto tóxico del EAB mediante el método de pre-incubación | 87 |
| 3.9.3. Evaluación del efecto tóxico del ácido clorogénico mediante el método de pre-incubación | 87 |
| 3.10. Ensayos de mutagenicidad del EAB y del ácido clorogénico | 88 |
| 3.10.1. Mutagenicidad del EAB | 88 |
| 3.10.2. Mutagenicidad del ácido clorogénico | 90 |

| | |
|---|-----------|
| 3.11. Evaluación de los efectos antimutagénicos del EAB y del ácido clorogénico .. | 91 |
| 3.11.1. Antimutagenicidad del EAB..... | 91 |
| 3.11.2. Antimutagenicidad del ácido clorogénico | 93 |
| 3.12. Cálculo de la capacidad antimutagénica: Índice de inhibición | 94 |
| 4. RESULTADOS | 96 |
| 4.1. Caracterización química, tóxica y mutagénica del EAB | 97 |
| 4.1.1. Determinación de polifenoles en el EAB por cromatografía líquida de fase inversa RP-HPLC | 97 |
| 4.1.2. Evaluación de la actividad antioxidante del EAB y del ácido clorogénico .. | 99 |
| 4.1.3. Evaluación de la toxicidad del EAB y del ácido clorogénico utilizando el Ensayo de Ames | 102 |
| 4.1.4. Evaluación del efecto mutagénico del EAB y del ácido clorogénico mediante el Ensayo de Ames | 105 |
| 4.2. Evaluación del efecto antimutagénico del EAB empleando el Ensayo de Ames | 107 |
| 4.2.1. Ensayo sin activación metabólica | 108 |
| 4.2.2. Ensayo con activación metabólica | 119 |
| 4.2.3. Comparación de los métodos de incorporación en placa y de pre- incubación | 130 |
| 4.3. Evaluación de la actividad antimutagénica del ácido clorogénico | 132 |

| | |
|---|------------|
| 4.4. Análisis comparativo del efecto antimutagénico ejercido por EAB y el ácido clorogénico | 134 |
| 4.4.1. Ensayo sin activación metabólica | 134 |
| 4.4.2. Ensayo con activación metabólica | 136 |
| 5. DISCUSIÓN | 138 |
| 5.1. Composición química del EAB y evaluación de la actividad antioxidante..... | 141 |
| 5.2. Evaluación del efecto tóxico y mutagénico del EAB y del ácido clorogénico ... | 147 |
| 5.3. Evaluación de la actividad antimutagénica del EAB y del ácido clorogénico frente a mutágenos de acción conocida empleando las cepas TA100 y TA98 con y sin activación metabólica | 150 |
| 5.3.1. Evaluación del efecto antimutagénico del EAB utilizando dos variantes del ensayo (incorporación en placa y pre-incubación) | 152 |
| 5.3.2. Comparación de los efectos antimutagénicos del EAB y del ácido clorogénico..... | 154 |
| 5.4. Posibles mecanismos de antimutagénesis del EAB frente a diferentes mutágenos y cepas seleccionadas..... | 155 |
| 5.4.1. 2-AF | 155 |
| 5.4.2. 2-NF | 163 |
| 5.4.3. AZS..... | 167 |
| 6. CONCLUSIONES | 170 |

| | |
|----------------------|-----|
| 7. BIBLIOGRAFIA..... | 177 |
|----------------------|-----|

RESUMEN

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue realizar la caracterización química y tóxica así como analizar la mutagenicidad y antimutagenicidad del extracto acuoso de *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon (EAB). *B. articulata*, conocida como “Carqueja”, es una hierba silvestre utilizada muy frecuentemente en la medicina folclórica popular en Argentina y Sudamérica. La infusión de carqueja es ampliamente consumida para el tratamiento de afecciones gastrointestinales por su capacidad antiespasmódica y colagoga, entre otras.

Mediante caracterización química por cromatografía líquida de fase inversa (RF-HPLC) se determinaron los compuestos fenólicos presentes en el EAB. Asimismo, se analizó la actividad antioxidante del EAB, por determinación de la concentración eficiente cincuenta (CE₅₀) mediante la técnica de DPPH* (2, 2-fenil1-picril hidracilo) y se determinaron los porcentajes de inhibición del EAB frente al radical DPPH*. El análisis químico del EAB reveló que el polifenol mayoritario fue el ácido clorogénico. El contenido de ácido clorogénico en el EAB fue 2,05±0,11 mg/ml y su actividad antioxidante presentó un valor de CE₅₀ de 101,86 µg/ml.

Los estudios de toxicidad, mutagenicidad y capacidad antimutagénica se realizaron mediante el Ensayo de Ames empleando las cepas testigo *Salmonella typhimurium* TA98 (mutante de corrimiento de marco de lectura) y TA100 (mutante de sustitución de bases). Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo por determinación de las unidades formadoras de colonias co-incubando el EAB con las cepas testigo para evaluar concentraciones no tóxicas. Los ensayos de

mutagenicidad y antimutagenicidad se realizaron con diferentes concentraciones del EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) las cuales se incubaron con diferentes concentraciones de mutágenos diagnóstico: 2-nitrofluoreno (2-NF), azida sódica (AZS), y 2-aminofluoreno (2-AF). Se implementó el método clásico de incorporación en placa y su modificación de pre-incubación. Para la evaluación de la antimutagenicidad se tomaron como parámetros los porcentajes de inhibición (%I) ejercidos por el EAB frente a la mutagenicidad inducida por los mutágenos diagnóstico (correspondiente al 100% de mutagenicidad).

Los resultados encontrados indicaron al aplicar el Ensayo de Ames, que el EAB no resultó tóxico ni mutagénico en las concentraciones ensayadas (1,0 y 10,0 mg/placa) y en las condiciones de diseño experimental propuestos.

El EAB presentó en el Ensayo de Ames aplicado un %I de 100% frente al mutágeno 2-AF al implementar el método de pre-incubación y con la cepa TA100, independiente de las concentraciones ensayadas (1,0 y 10,0 mg/placa). Los valores máximos de inhibición del EAB ejercidos en la cepa TA98 frente al 2-NF se obtuvieron con 10,0 mg/placa de EAB y el Ensayo de Ames, con el método de pre-incubación, siendo el %I de 91,0%. Frente a la AZS, la máxima inhibición se obtuvo, en el Ensayo de Ames, con el método de pre-incubación con un rango de %I de 40,0-41,0% para 1,0 y 10,0 mg/placa, respectivamente.

Asimismo, se evaluó la capacidad antioxidante, tóxica, mutagénica y antimutagénica del ácido clorogénico utilizando la misma metodología implementada para el EAB (DPPH* y el Ensayo de Ames). Los resultados mostraron que la capacidad

antioxidante del ácido clorogénico resultó ser mayor que la del EAB con una $CE_{50}=0,269 \mu\text{g/ml}$. El ácido clorogénico mostró ser no tóxico y no mutagénico en el Ensayo de Ames, en las concentraciones ensayadas (0,05 y 0,50 mg/placa). Los estudios de antimutagenicidad del ácido clorogénico mostraron que los %I máximos frente a 2-AF se obtuvieron con la cepa TA98 (%I de 75,5) y con la cepa TA100 (%I de 84,0), ensayando 0,50 mg/placa de ácido clorogénico mediante el método de pre-incubación.

En base a estos resultados, se concluyó que el EAB y el ácido clorogénico poseen capacidad antioxidante y antimutagénica en los sistemas y condiciones experimentales aplicadas.

La comparación de la capacidad antimutagénica entre el EAB y el ácido clorogénico indicó que fue necesaria una concentración cinco veces mayor de ácido clorogénico contenido en la muestra de EAB para alcanzar una actividad antimutagénica similar a la observada en el EAB.

Se concluyó que la capacidad antimutagénica del EAB ocurría a través de un mecanismo antioxidante, influenciado por la presencia del ácido clorogénico y otros compuestos presentes en el mismo.

En base a los datos obtenidos y la bibliografía existente se propone que los efectos antimutagénicos ejercidos por el EAB frente a los mutágenos ensayados respondería a un mecanismo llamado “desmutágeno”, donde la inhibición ejercida por el extracto posiblemente ocurra previamente a que los agentes mutagénicos produzcan un daño total o parcial sobre el ADN.

Futuros estudios sobre los mecanismos moleculares implicados en el efecto antimutagénico ejercido por el EAB frente a diferentes mutágenos resultan necesarios y merecen ser estudiados en profundidad para dilucidar el posible mecanismo propuesto en la presente Tesis Doctoral a partir de observaciones realizadas en cepas bacterianas aplicando el Ensayo de Ames.

SUMMARY

The purpose of this Doctoral Thesis is to characterize the chemical and toxic properties as well as to analyze the mutagenic and antimutagenic effects of the aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon (AEB). *B. articulata*, known as "Carqueja" is a wild herb used frequently in popular folk medicine in Argentina and South America. Carqueja infusion is widely consumed in the treatment of gastrointestinal conditions due to cholagogue and antispasmodic properties, among others.

Chemical characterization of the phenolic compounds present in the AEB was performed by reverse phase liquid chromatography (RF-HPLC). AEB antioxidant activity was evaluated by determining the effective concentration (EC₅₀) applying the DPPH* technique (2, 2 – difenyl 1-picrylhydrazyl) and the percentage of inhibition of DPPH radical versus AEB was determined. The results revealed that chlorogenic acid was the main and major polyphenol present in AEB reaching values of 2.05±0.11 mg/ml. The antioxidant activity of this polyphenol showed an EC₅₀ value of 101.86 mg/ml. Toxicity and mutagenicity studies as well as antimutagenic capacity were analyzed using the Ames test employing two *Salmonella typhimurium* strains: TA98 (mutant reading frame shift) and TA100 (base substitution mutant). For toxicity assays, the colony-forming unit was determined by co-incubating the strains with non-toxic AEB concentrations. Mutagenicity and antimutagenicity tests were performed employing AEB within the 1.0-10.0 mg/plate concentration-range against different concentration of diagnostic mutagens, namely, 2-nitrofluorene (2-

NF), sodium azide (AZS), and 2-aminofluorene (2-AF). Experiments were carried out by using both plate incorporation and pre-incubation variants of the Ames test. Antimutagenicity was estimated by the percentages of inhibition (%) exerted by AEB against diagnostic mutagen-induced mutagenicity (corresponding to 100.0 % of mutagenicity).

Results revealed that AEB was non-toxic as well as non-mutagenic in assayed concentrations (1.0 and 10.0 mg/plate).

Results of AEB-induced antimutagenic activity at 1.0 and 10.0 mg/plate indicated that the maximum percentage of inhibition was obtained in 2-AF-induced mutagenicity on TA100 by the pre-incubation method, reaching values of 100 %. Inhibition exerted by 10.0 mg/plate of AEB in 2-NF-exposed on TA98 strain reached maximum levels by pre-incubation method reaching values of 91.0 %. For AZS, maximum inhibition was obtained with the method of pre-incubation method showing values of 40.0 % and 41.0 %, for 1.0 and 10.0 mg/plate AEB treated cultures, respectively.

The antioxidant capacity as well as the toxic, mutagenic and antimutagenic properties of the chlorogenic acid were also evaluated using the same methodology applied for the AEB. The results showed that the antioxidant capacity of chlorogenic acid was greater than that found for the AEB with an $EC_{50}=0.269 \mu\text{g/ml}$. Furthermore, the results demonstrated that chlorogenic acid non-toxic and non-mutagenic at assayed concentrations (0.05 and 0.50 mg/plate). Antimutagenicity studies of chlorogenic acid against 2-AF-induced mutagenicity showed the highest

%I both on TA98 (75.5 %I) and TA100 (84.0 %I) strains at 0.50 mg/plate by pre-incubation method.

Based on these results we concluded that both the AEB and chlorogenic acid possess antioxidant and antimutagenic capacities.

Comparison between the antimutagenic capacity exerted by AEB and chlorogenic acid indicated that five times higher concentration of the later is required to achieve the same AEB-induced antimutagenic activity.

According to our results it could be suggested that the antimutagenic capacity of the AEB is due probably exerted by an antioxidant mechanism(s) committed to the presence of chlorogenic acid and other compound(s) present in the same extract.

Based on our observations and data previously reported, it could suggested that the inhibition exerted by the AEB against mutagen-induced damage involve a mechanism called "desmutagen" in which the inhibition most possibly occurs prior to the induction of a total or partial damage on DNA.

Further studies on the molecular mechanisms involved in the antimutagenic effect exerted by the AEB against different mutagens are required and deserve to be studied to elucidate the possible mechanism(s) proposed in this Doctoral Thesis.

LISTADO DE PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Rodríguez M. N., Giannuzzi L., Reta M. and Larramendy M. L.. The antimutagenic capacity of the aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon. Journal of Toxicology and Environmental Chemistry 2010, 93: 251-260.

Congresos asistidos

Rodríguez M. N., Gianuzzi L. Zaritzky N y Larramendy M. Evaluación del efecto mutagénico y antimutagénico del extracto acuoso de *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon (Asteraceae, Astereae) usado en medicina tradicional en Argentina. Presentado en “XXX Congreso de Genética (SAG). Tandil, Pcia. De Buenos Aires , Argentina 21-24 de septiembre 2008.

Rodríguez M. N., Giannuzzi L. Zaritzky N. y Larramendy M. Estudio de la capacidad inhibitoria del extracto acuoso (infusión) de *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon (Asteraceae, Astereae) usado en medicina tradicional en Argentina frente a mutágenos de acción conocida. ”Congreso CYTAL, .AATA (Asociación Argentina de Tecnólogos en Alimentos). Concordia, Pcia. de Entre Ríos, Argentina. 7-9 de octubre 2009.

Rodriguez M. N., Giannuzzi L., Zaritzky N. E. , Reta M. y Larramendy M. Capacidad antimutagénica y antioxidante del extracto acuoso de *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon. XIII Congreso CYTAL -AATA. Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos y 4º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. Buenos Aires, 19 al 21 de octubre de 2011.

ABREVIATURAS

Lista de abreviaturas utilizadas

ACL: ácido clorogénico

AT: Adenina Timina

Atm: atmósferas

AAIF: N-2-(Acetilamino) 7- iodo fluoreno

AAF: 2-Acetilaminofluoreno

a.C.: antes de Cristo

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

ANOVA: Análisis de varianza

APSM: Atención Primaria de Salud de la Provincia de Misiones

AZS: Azida sódica

B(α) P: Benzo (α) Pireno

C: Citosina

CA: California

CE₅₀: Concentración Eficiente 50

cm: centímetros

CMA: Codex Medicamentarius Argentino

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Co: Company

col.: colaboradores

CQA: Ácido 5-cafeilquínico

DAD: Diode Array Detector (Arreglo de diodos)

d C.: después de Cristo

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil -1-picril hidracilo

DS: Desvío estándar

EAB: Extracto Acuoso de *Baccharis articulata*

EEUU: Estados Unidos de Norte América

e.g.: exempli gratia

FACAF: Federación Argentina de Cámaras de Farmacias

G: Guanina

g: gramos

G C: Guanina Citosina

G₆P: Glucosa- 6- fosfato

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)

h: hora

ICH: International Commissions on Harmonization

IP: Incorporación en Placa

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

L.: Linneo C.

L: Litro

Lam.: Lamarck J. B.

LEMIS: Laboratorio Estatal de Especialidades Medicinales de Misiones

Less. : Lessing C. F.

LOD: Limit Of Detection (Límite de detección)

LOQ: Limit Of Quantitation (Límite de cuantificación)

LPS: lipopolisacáridos

M: Molar

mg: miligramos

min: minutos

Mm: micrómetro

mM: milimolar

mm: milímetros

ml: mililitros

mUA: mili Unidades de Absorbancia

N-OH-AAF: N-hidroxi-N-2- acetilaminofluoreno

NP: Nitropirenos

nm: Nanómetros

Nº: Número

NAT: N-acetiltransferasa

NPD: 4-Nitro-o-phenylenediamine

°C: grados centígrados

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development.

OMS: Organización Mundial de la Salud

O/N: Over night (cultivo de la noche)

PI: Pre-incubación

P/V: peso por volumen

R*: Radical libre

R²: Coeficiente de determinación

RN₃: alquil-azida

seg: Segundos

S.L.F.: Sociedad Latinoamericana de Fitomedicina

SOS: Sistema de reparación propenso al error

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances

TRAP: Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter

UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro

UNLP: Universidad Nacional de La Plata

UV-vis: Luz ultravioleta-visible

V: Voltio

V_f: Volumen final

β-NADP: beta-Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

%I: Porcentaje de inhibición

λ: Longitud de onda

+S9: Con activación metabólica

-S9: Sin activación metabólica

µg: microgramos

µg /placa: microgramos por placa

µl: microlitros

2-NF: 2-Nitrofluoreno

2-AF: 2-Aminofluoreno

3-NFA: 3-Nitrofluorantreno

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El hombre y la alimentación

Existe consenso entre los antropólogos que nuestros ancestros más antiguos tuvieron una dieta vegetariana basada en frutos, raíces, hojas, brotes y semillas, junto a la miel, larvas de insectos y huevos, derivada de sus hábitos recolectores. Con el transcurso del tiempo surge, hace aproximadamente 2 millones de años, una modificación en los hábitos alimentarios en nuestros antecesores, reconocida como la primera transición alimentaria. Probablemente basada en una actividad carroñera antes que cazadora, la ingesta cada vez mayor de proteína animal en la dieta nos condujo hacia el omnivorismo, con un aporte mayor de proteínas y ácidos grasos esenciales. Esta transición alimentaria proporcionó dos requisitos necesarios para disponer de un intestino más pequeño y el ahorrar energía para dedicarla al desarrollo del cerebro (Campillo Alvarez, 2011).

Los trabajos de Aguirre (2007) indican que hace unos trece mil años ocurrió la extinción de la megafauna (mamut, rinoceronte y tigre diente de sable, entre otros) probablemente debida al cambio climático así como a la depredación humana. Esto generó una merma en las actividades de caza mayor especializada, seguida de cambios en la alimentación reconocida como la segunda transición alimentaria. En este periodo, la dieta estaba basada fundamentalmente en animales de baja talla, pescados y mariscos. Adicionalmente, en las llanuras, se domesticaron las plantas dando origen a la agricultura. La cría de animales y el cultivo de cereales como el maíz, el arroz, el trigo, etc., fue sentando las bases de un nuevo sistema de producción y de consumo alimentario. Sin embargo, a pesar del aumento en la

cantidad de alimentos se redujo la variedad, restringiéndose la dieta a un alimento principal generalmente un cereal o un tubérculo, complementado con el producto del pastoreo. Esto trajo aparejado que, cuando faltaba el alimento principal aparecía el hambre, en cambio cuando faltaban sus complementos, la población quedaba condenada a la desnutrición crónica por falta de micronutrientes (Aguirre, 2007).

Con la llegada de la revolución industrial se generó una nueva relación entre la población y las nuevas formas de producción, distribución y consumo alimentario reconocida como tercera transición alimentaria. En los últimos 100 años las sociedades industriales comenzaron a desarrollar y aplicar nuevas tecnologías en la industria de los alimentos basados en la necesidad de aportar mayor cantidad de alimentos a una población que crecía exponencialmente. El procesamiento de los alimentos, el agregado de aditivos alimentarios así como el refinamiento en azúcares y otros hidratos de carbono han contribuido a la dieta actual. Esta presenta mayor cantidad de alimentos pero también menor variedad. A modo de ejemplo podemos mencionar la enorme reducción de variedades vegetales registradas con el devenir de los tiempos: de las 442 variedades de papas cultivadas en los Andes Centrales, actualmente en el mundo sólo se cultivan 5, y de las 28 variedades de higos se cultivan 3. Aproximadamente 30.000 especies (entre las 250.000 plantas superiores descritas) fueron seleccionadas como comestibles, siendo utilizadas 7000 de ellas; sin embargo, sólo 150 han llegado a convertirse en cultivos importantes. De estas especies 15 producen más del 90% del total de

alimentos: trigo arroz y maíz, los cuales suministran dos tercios de toda la energía alimentaria y algo más de la mitad de las proteínas de origen vegetal (Smil, 2003).

Esta dieta presenta deficiencias en cantidad y variedad de frutas, verduras, fibras, y ciertos micronutrientes como son los minerales esenciales, ciertos ácidos grasos esenciales, vitaminas y micronutrientes que nuestros ancestros consumían. Ello ha llevado a considerar a la dieta como uno de los factores que presentan mayor contribución a las enfermedades del hombre moderno.

Por otro lado, es reconocido que la dieta puede controlar favorablemente ciertas funciones biológicas en el hombre y animales y reducir el riesgo de ciertas enfermedades. En los últimos tiempos se ha introducido el concepto de alimentos funcionales, considerando como tales a aquellos que pueden producir beneficios sobre la salud, además de su tradicional función nutritiva (Ashwell, 2005).

Se encuentra bien documentado que los factores de la dieta juegan un rol crucial en la etiología del cáncer en humanos y grandes esfuerzos se realizan en el ámbito científico para identificar sustancias protectoras contenidas en los alimentos (Mersch-Sundermanna y col., 2004). Es conocido que el consumo de vegetales y frutas está relacionado inversamente respecto a la incidencia del cáncer (Steinmetz y Potter, 1996).

Cientos de compuestos protectores y anticarcinogénicos de alimentos derivados de plantas han sido detectados en las últimas décadas. Por ello, un resumen de la relación del hombre con las plantas, y en particular con las medicinales, resulta de interés desarrollar en el marco del presente trabajo de Tesis Doctoral.

1.2. El hombre y las plantas medicinales

Desde sus orígenes, la humanidad ha utilizado a las plantas como cobijo, alimento y medicina. Las plantas o hierbas medicinales son especies vegetales cuyas partes o extractos son empleados como medicamentos en el tratamiento de enfermedades. La utilización de plantas con fines curativos se remonta a la época prehistórica y su uso se extendió en todas las culturas y civilizaciones hasta la actualidad.

En sus comienzos, los conocimientos acerca de las propiedades medicinales de las plantas se fueron construyendo de la misma manera en que se iban conociendo las plantas comestibles y las venenosas, ya sea de manera azarosa, accidental o mediante la observación de la conducta de los animales. De esta manera, los primeros hombres conocieron el peligro que representaba el “acónito” (*Aconitum napelus*), el “veratro” o “elébora blanco” (*Veratrum albus*), la “nuez vómica” (*Strychnux vomica*), la “coronilla” (*Coronilla glauca*), la “dedalera” (*Digitalis purpurea*), el “estrofantus” (*Strophantus kombe*) (Hernández Rodríguez, 2001), entre otros ejemplos.

En otras ocasiones, el conocimiento se desarrolló mediante la experimentación en su propia persona. Desde los albores de la humanidad el hombre aprendió mediante prueba y error que algunas hierbas resultaban ser útiles para combatir enfermedades, siendo empleadas en rituales religiosos donde se consumían en brebajes a los que se les asignaban poderes mágicos y sobrenaturales.

Estos conocimientos se fueron profundizando y transmitiendo de generación en generación, dando lugar con el correr del tiempo a la medicina moderna.

Posteriormente, Alcmeón de Crotona (siglo VI a.C.), filósofo pitagórico dedicado a la medicina, dio inicio a una etapa definida por la certeza de que la enfermedad se originaba por una serie de fenómenos naturales susceptibles de ser modificados o revertidos, pudiéndose considerar como la génesis de la medicina moderna.

En el devenir del tiempo y a lo largo de distintas civilizaciones, la medicina y el conocimiento de las propiedades terapéuticas de las plantas se fue desarrollando de manera más estructurada y sistemática. Hipócrates (siglo V – IV a.C.), considerado el padre de la medicina, rechazó las creencias populares que señalaban como causantes de las enfermedades a los dioses, señalando que eran consecuencia de factores ambientales, de la dieta y los hábitos de vida.

Por su parte, los antiguos egipcios (siglo III a.C.), utilizaron una numerosa cantidad de productos obtenidos de los vegetales. El Papiro de Ebers (aprox. 1500 a.C.), considerado el más importante papiro médico, reporta como medicamentos al “aloe” (*Aloe vera*), la “goma de acacia” (*Moringa oleitera*), el “aceite de ricino” (*Ricinus communis* L.), la “adormidera” (*Papaver somniferum*), la “cáscara de granada” (*Punica granatum*), la “linasa” (*Linum usitatissimum*), la “escila” (*Urgina marítima*), el “apio” (*Apium graveolens*), la “hierbabuena” (*Mentha viridis*), el “anis” (*Pimpinella anisum*), el “hinojo” (*Faeniculum vulgare*), el “azafrán” (*Carthamus tinctorius*), el “beleño” (*Hyoscyamus niger*) y el “ajo” (*Allium sativum*), entre otros (Hernández Rodríguez, 2001).

En el siglo I a.C., Dioscórides, botánico y farmacólogo de la antigua Grecia y médico de los ejércitos de Nerón, escribió seis libros llamados “De Materia Médica”. En

ellos menciona plantas medicinales conocidas por los griegos. Describe 600 especies de vegetales e indica las virtudes que se les atribuían y la manera de administrarlas. Durante 15 siglos fue considerada la más importante obra de botánica y el principal manual de farmacopea durante toda la Edad Media y el Renacimiento.

Asimismo, otros escritos famosos y valiosos para la ciencia médica y terapéutica han sido el herbario chino Pan-Si-Tao, el Corpus Hippocraticum, el Canon Medico árabe, los Vedas hindúes y las farmacopeas medievales. A partir del siglo XVIII, las hierbas comenzaron a ser exploradas por la ciencia, comenzándose a extraer y aislar las sustancias químicas activas, llamadas drogas.

Hoy en día, los laboratorios farmacéuticos utilizan compuestos químicos con acción farmacológica ya sea replicados en forma sintética o extraídos de plantas, muchas de ellas reconocidas por culturas antiguas por sus efectos benéficos. La base de los fitofármacos obtenidos a partir de plantas son las drogas vegetales y los diferentes tipos de productos que de ellas se obtienen (Cañigüeral y col., 2003).

Sin embargo a efectos de evitar confusión en los conceptos, la OMS definió en 1978 a las plantas medicinales como cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica. También definió droga vegetal como la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica y los principios activos como las sustancias responsables de la acción farmacológica.

Los medicamentos conocidos como fitofármacos incluyen como material o droga vegetal a las plantas terrestres y también a las algas. Asimismo pueden definirse como fungifármacos a los producidos a partir de hongos y levaduras.

El estudio y la utilización terapéutica de fitofármacos y fungifármacos es abordado por la fitoterapia (del griego *fyton*, 'planta', 'vegetal' y *therapeia*, 'terapia'), conocida también como herbolaria (del latín *herba*, 'hierba').

Se define a la Fitoterapia como la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico (Cañigual y Vila, 2001). Su nombre lo acuñó el médico francés Henri Leclerc (1874 – 1955 d C) quien usó por vez primera el término fitoterapia en su obra *“Précis de Phytothérapie*. La Fitoterapia utiliza drogas vegetales y preparaciones de dichas drogas en la forma farmacéutica más adecuada para su administración.

Por su parte, los usos populares de las plantas medicinales continúan a través del empleo, principalmente, de infusiones y tisanas de venta libre en farmacias y herboristerías. Al respecto, la Federación Argentina de Cámaras de Farmacias (FACAF), publica más de 200 plantas medicinales con su acción terapéutica.

En nuestro país, el código oficial que describe las drogas, medicamentos y productos médicos necesarios o útiles para el ejercicio de la medicina y la farmacia corresponde a la Farmacopea Argentina o “Codex Medicamentarius Argentino” en el cual se especifica lo concerniente al origen, preparación, identificación, pureza,

valoración y demás condiciones que aseguran la uniformidad y calidad de las propiedades de los medicamentos.

En el año 2011 la ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica) en el artículo 1º, inciso a), define a los medicamentos fitoterápicos como “aquellos que contengan como principio activo drogas vegetales puras y/o mezclas definidas de éstas y/o preparados de drogas vegetales, tradicionalmente usadas con fines medicinales, y que no contengan sustancias activas químicamente definidas o sus mezclas aún cuando fuesen constituyentes aislados de plantas, salvo los casos que así se justifiquen”.

En el Anexo 7 de la Farmacopea Argentina se exponen los lineamientos de buenas prácticas dirigidos a su aplicación en los productos fitoterápicos. Estos deben estar preparados a partir de material de origen vegetal que pueden estar sujetos a contaminación o deterioro pudiendo variar su composición y características. El control de la materia prima, el almacenamiento y manufactura asume particular relevancia debida a la naturaleza compleja y variable de estos productos, al número de principios activos y a la escasa cantidad que se encuentran definidos. Por ello, debe aplicarse un adecuado sistema de aseguramiento de la calidad en la elaboración y control de calidad de los productos fitoterápicos.

Asimismo, la farmacopea vigente registra diversas recetas para la elaboración de productos fitoterápicos, aislando sus principios activos o reproduciéndolos mediante síntesis bajo diferentes formas farmacéuticas, como cápsulas, comprimidos, gotas, jarabes, tisanas, elíxires, suspensiones, cremas, ungüentos,

tinturas. La redacción de monografías que cumplan con los parámetros internacionales propuestos para la evaluación de los fitoterápicos es llevada a cabo por la Subcomisión de Medicamentos Fitoterápicos de la Farmacopea Argentina.

En ese sentido y a modo de ejemplo, el Laboratorio Estatal de Especialidades Medicinales de Misiones (LEMIS) produce en el predio del Hospital Ramón Carrillo cuatro fitomedicamentos (crema de caléndula (utilizado en la renovación celular en pieles con cicatrices, estrías o agrietas), comprimidos de cangorosa (utilizado en la gastritis y úlcera gátrica), jarabe de ambay (utilizado para tratar la tos y el catarro) y gotas de carqueja (utilizado como hepatoprotector) autorizados por la ANMAT. Actualmente se distribuyen gratuitamente en los centros de Atención Primaria de Salud de la provincia de Misiones para que los médicos los receten a los pacientes.

1.2.1. Elementos medicinales de las plantas

Las células vegetales realizan procesos metabólicos vinculados en forma directa con el crecimiento y desarrollo de las plantas y resultan comunes en todo el reino vegetal. Los productos metabólicos de estos procesos se denominan metabolitos primarios. Entre estos se encuentran las proteínas, lípidos y carbohidratos, aprovechados en la alimentación humana.

Adicionalmente existen otros procesos que conducen a la formación de los denominados metabolitos secundarios. Presentan una distribución más restringida, siendo frecuentes en una especie vegetal o grupo de especies. No presentan una función reconocida en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, diferenciación o formación de proteínas, hidratos de carbono y lípidos.

Si embargo, cumplen importantes funciones ecológicas en las plantas, constituyen las defensas vegetales y son considerados en la actualidad un producto de la evolución. Es así como muchos de ellos inhiben el desarrollo de bacterias, hongos, insectos y nematodos mejorando el crecimiento y la consistencia de la planta. También incluyen compuestos que pueden reducir la digestibilidad de la planta y la palatabilidad de los herbívoros.

El estudio de estas sustancias presenta interés por su importancia como drogas medicinales, antibióticos, insecticidas, venenos, saborizantes, aceites, ceras y otros materiales utilizados en la industria (Taiz y Zeiger, 2006).

Además, la creciente apreciación de los diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios ha llevado a revalorizar el uso popular de las plantas y hierbas medicinales como quimio-protectores para prevenir o combatir diversas enfermedades. Este concepto se desarrollará en el siguiente punto.

1.3. Quimio-protección

Numerosos estudios indican que algunos componentes presentes en plantas y alimentos pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas incluyendo el cáncer. A este tipo de componentes se les llaman “quimio-protectores”.

La quimio-protección contra el cáncer implica la utilización de productos naturales, sintéticos o biológicos que revierten, suprimen o previenen el desarrollo de tumores (Kuno y col., 2012).

En los últimos años se ha incrementado el interés sobre compuestos reconocidos como antimutágenos y promotores antitumorales. En relación a los antimutágenos,

se ha informado un fuerte efecto antimutagénico en extractos de especies de hierbas europeas (Natake y col., 1989), en plantas medicinales chinas (NiiKawa y col., 1995), en vegetales y frutas (Morita y col., 1978), en diversos tipos de té (Kojima y col., 1989) y sus componentes (Watanabe y col., 1989).

En Japón, se han realizado pruebas a gran escala con extractos de plantas, que condujeron a la identificación de numerosos compuestos protectores (Kada y col., 1984; Kada, 1984; Kada y col., 1987; Kada y Shimoj, 1987). Wattenberg y col., (1986), estandarizaron estudios sistemáticos de carcinogénesis en roedores que resultaron en el descubrimiento de los efectos protectores de los constituyentes del género *Brassica* (Familia *Brassicaceae*) y otros vegetales (Wattenberg, 1987). Estos *compuestos bioactivos* pertenecen a una variedad de diferentes grupos químicos, como los polifenoles, pigmentos alisulfilos, glucoinolatos, taninos, antocianinos, flavonoides, fitoesteroles, proteasas inhibidoras y fitoestrógenos. Muchas de estas sustancias, además de sus propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas presentan efectos beneficiosos, tales como activadoras del sistema inmune, protectoras de enfermedades cardiovasculares, entre otras (Middleton y Kandaswami, 1993). Muchos tipos de agentes antioxidantes, antiinflamatorios, antiestrógenos, y antiandrógenos han resultado promisorios en la actividad quimio-protectora (Martínez-Flórez y col., 2002; Bhattacharya, 2011). Un grupo de gran interés en este aspecto de la quimio-protección al cáncer, son los flavonoides, compuestos generalmente no tóxicos que presentan una variedad de actividades

biológicas (anti-alérgicos, anti-inflamatorios, anti-oxidantes, capturadores de radicales libres, actividad antimutagénica, entre otras) (Kelloff, 1999).

1.4. Fenoles y antioxidantes

Los monofenoles, polifenoles y taninos constituyen uno de los grupos de fitoquímicos presentes en casi todas las frutas, verduras, hierbas medicinales, así como los granos de cereales que contienen cantidades apreciables de fenoles naturales.

Los tres grupos más importantes de compuestos fenólicos presentes en la dieta son los flavonoides, los ácidos fenólicos y los polifenoles. Los flavonoides constituyen el mayor grupo de los fenoles vegetales y los ácidos fenólicos forman un grupo diverso que incluyen los derivados del ácido hidroxibenzoico y del ácido hidroxicinámico (**Tabla 1**).

Los compuestos fenólicos de las plantas presentan entre sus propiedades las de ser antioxidantes, ejercer efectos quelantes y modular la actividad de varios sistemas enzimáticos, de modo que actúan mayoritariamente en la dieta como elementos que promueven la salud ante factores químicos y físicos estresantes para el organismo (Gee y Johnson, 2001).

Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres en la membrana de las células y proteger a los diferentes órganos y sistemas.

Tabla 1. Contenido de fitoquímicos fenólicos en algunos alimentos

| Clase/subclase | Fitoquímicos | Contenido en alimentos ^a |
|-------------------------|--|---|
| FLAVONOIDES | | |
| Flavonoles | Quercetina, Kaemferol, Miricetina | Té hojas verdes (30-45 KgPS), té negro infusión (20 mg/L) |
| Flavonas | Apigenina, Luteolina | Apio (130 mg/Kg), olivas (6-29 mg/Kg) |
| Flavanoles | Catequina, Epicatequina | Pera (70-420 mg/Kg), té hojas verdes (128-226 Kg/PS) |
| Isoflavonas | Genisteina, Daidzeina | Granos de soja maduros secos (888-2407 mg/Kg), harina de soja (1036 - 1778 mg/Kg) |
| ÁCIDOS FENÓLICOS | | |
| Hidroxicinámico | Ácidos cafeico, clorogénico, ferúlico y neoclorogénico | Arándanos (1881-2112 mg/Kg), jugo de manzana (9-114 mg/L) |
| Hidroxibenzóicos | Ácido elágico y gálico | Jugo de uva negra (75 mg/L) |
| TANINOS | | |
| Condensados | Catequinas, polímeros de epicatequina | Vino tinto (2567 mg/L), vino blanco (239 mg/L), jugo de manzana (8-87 mg/L) |

^aPS = Peso seco. Fuente: King y Young, 1999

Estas sustancias se forman en el reino vegetal a partir de fenilalanina y tirosina, combinadas con unidades de acetato, son derivados benzo (β) pirenos. La estructura básica de un polifenol, es un anillo C el cual en C2 se une a un grupo fenil como sustituyente. Están formados por dos anillos aromáticos A y B, unidos por un anillo heterocíclico C (**Fig. 1**). La estructura química de los compuestos fenólicos, es la que les confiere su capacidad para actuar como captadores de radicales libres.

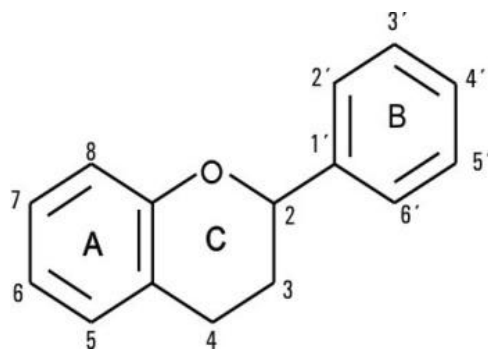


Fig. 1. Estructura básica de un polifenol

El tipo de compuesto, el grado de metoxilación y el número de grupos hidroxilo son algunos de los parámetros que determinan esta actividad antioxidante.

Un amplio rango de polifenoles vegetales, son actualmente vendidos como suplementos dietarios o como hierbas medicinales. Las plantas contienen mas de 8000 compuestos conocidos, abarcando desde simples fenoles, como el fenol en si mismo y una variedad como los taninos etc. De los 8000 polifenoles conocidos, solamente alrededor de 200 han sido testeados por sus propiedades mutagénicas (Ferguson, 2001), la mayoría en ensayos bacterianos (Nagao y col., 1981; Czebot y col., 1990).

Existe enorme interés en el conocimiento de los polifenoles presentes en las plantas en particular en aquellos no-nutritivos, que muestran efectos antioxidantes, anti-inflamatorios, anti-estrogénicos, anti-mutagénicos y anti-carcinogénicos, al menos en sistemas *in vitro* o *in vivo* (Bravo, 1998; Harbone y Williams, 2000).

En los últimos años ha cobrado especial interés el estudio de la capacidad antioxidante de polifenoles, especialmente de aquellos flavonoides, presentes en diferentes vegetales utilizados en la medicina autóctona.

Entre estas, las llamadas vulgarmente “carquejas” o “carquejillas” (Género *Baccharis*) son tradicionalmente plantas medicinales de mayor utilización, no sólo en nuestro país sino también en todos los países de donde es oriunda: Bolivia, sur de Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay y Perú. La “carqueja”, cuyo nombre científico es *Baccharis articulata*, es una de las especies consideradas de alto consumo, con una demanda anual 77-127 Kg/año (Fernández, 2005) y es objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral.

1.5. Hierba medicinal: *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon “Carqueja”

Baccharis es un amplio género perteneciente a la tribu *Astereae*, con más de 400 especies distribuidas en el continente americano. Las especies de este género se distribuyen mayormente en regiones de temperaturas cálidas y tropicales como Brasil, Argentina, Colombia, Chile y México. En los últimos años se ha incrementado la información sobre la estructura y actividad farmacológica de estas especies (Abad y Bermejo, 2007). *Baccharis* es un género de gran importancia en los productos naturales utilizados por la medicina popular, folclórica y alternativa.

La “carqueja” forma parte actualmente de numerosos productos farmacéuticos, sobre todo como planta con actividad colagoga, colerética, digestiva (de la Sota, 1977; Verdi y col., 2005), antioxidante (Abad y col., 1999; Oliveira y col., 2003), antiviral y antimicrobiana (Zanon y col., 1999; Feresin y col., 2003; Simionatto y col., 2008), antiinflamatoria (Gonzales Dávalos, 2007), antifúngica (Feresin y col., 2003; Vivot Lupi y col., 2009), antidiabética (Oliveira y col., 2005), antiartrítica (Coelho y

col., 2004), y diurética (Moreira, 1862) bajo la forma de soluciones, extractos, grageas y/o infusiones.

Las especies del género *Baccharis* más utilizadas en Argentina, Uruguay y Brasil son: *B. trimera* (Less.) D. C., *B. crispa* y *B. articulata* (Lam.) Persoon. Estas plantas se encuentran monografiadas en la Sexta Edición de la Farmacopea Nacional Argentina (1966).

B. articulata así como otras hierbas (*Equisetum giganteum* “cola de caballo”, *Lippia turbinata* “poleo”) son recolectadas en todo el territorio Argentino en su mayoría de bolsones silvestres (Lagrotteria y Affolter, 1999; Noher de Halac y col., 1986; de la Sota, 1977). *B. articulata* es considerada una planta medicinal (Boelcke, 1981).

Sinónimos: *Conyza articulata* (Lam.); *Molina articulata* (Lam.) Lessing; *Pingraea articulata* (Lam.) F.H. Hellwig.

Nombres vulgares: “carqueja” o “carquejilla”; en Paraguay es conocida también con el nombre de *jagareté ka'a* (voz en guaraní que significa “yerba del leopardo”).

B. articulata (Lam.) Persoon, es un arbusto abundante en las zonas templadas de Uruguay, Brasil, Chile, Argentina y Paraguay.

1.6. Clasificación y estructura general de *B. articulata*

Clasificación botánica de *B. articulata*

Reino: *Plantae*

División: *Fanerógama Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Subfamilia: *Asteroideae*

Tribu: *Astereae*

Género: *Baccharis*

Especie: *B. articulata*

Descripción botánica

B. articulata (Lam.) Persoon es un arbusto perenne dioico ramoso de 0,5-1,5 m de altura. Sus tallos provistos de dos alas longitudinales angostas de 0,5-3 mm de latitud. Las hojas reducidas a brácteas inconspicuas. Con capítulos sésiles, solitarios o dispuestos en glomérulos de 2-6, a su vez ordenados en un racimo simple o un racimo de espigas terminal. Capítulos pistilados con involucreo acampanado de 4-5 x 4-5 mm; filarios en 3-4 series, obtusos, los exteriores ovados y los interiores oblongos. Las flores numerosas de ápice desigualmente dentado. Capítulos estaminados con involucreo acampanado de 3-4 x 4 mm; filarios semejantes a los pistilados (**Fig 2**). Flores numerosas; estilo con ramas separadas N=9. (Boelcke, 1981; Hieronymus, 1882; Giuliano, 2000).

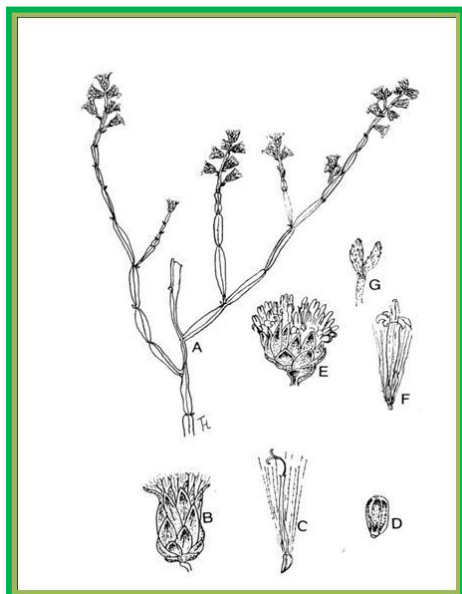


Fig.2. *B. articulata*: A: Rama florífera femenina XI; B: Capítulo femenino; C: Flor femenina X10; D: Aquenio X20; E: Capítulo masculino X5; F: Flor masculina X10; Apice del estilo X20 (Troiani, 1985)

Normalmente las plantas de carqueja crecen en forma espontánea y silvestre. Son recolectadas en campos o a orilla de los caminos. Esto podría llevar a la variación de su composición química o a la variación en su rendimiento, debido a múltiples factores, como son: el lugar de procedencia, la edafología del terreno, la época de recolección, las condiciones climáticas del año, el período vegetativo en que se recolecta, etc.; por lo que este sistema de provisión hacia los centros de procesamiento del material vegetal, se torna a veces poco confiable en calidad, rendimiento y constancia. Sin embargo sus componentes químicos base, se repiten en la mayoría de las revisiones científicas.

1.7. Componentes químicos y propiedades generales de *B. articulata* (Lam.)

Persoon

Los componentes químicos principales de *B. articulata* se presentan en la **Tabla 2**.

Los principios activos de *B. articulata* son la cinarina (un compuesto aromático responsable del sabor amargo) y el ácido clorogénico. La cinarina le confiere una actividad hipocolesterolemica. Se ha demostrado que aumenta la solubilidad del colesterol de los depósitos patológicos (ateromatosos) y junto con la cinaropicroina presenta importante acción carminativa (antiespasmódica).

Tabla 2. Constituyentes químicos de *B. articulata*

| <i>B. articulata</i> (Lam.) Persoon | |
|-------------------------------------|--|
| Parte aérea | Ácidos α y β , Oleanólicos y crisosapónicos; santonina, absintina, luteolina, quercetina, acetato de articulina, genkwanina, acacetina; cicimaritina, salvigenina, jaceidina, jaceosidina, lupeol, chondrillasterol, apigenina. |
| Flores (aceites esenciales) | Barticulidiol, bacchotricuneatina A, diéster malonato acetato, α -pineno, cis-cariofileno, γ -elemeno, β -guaiano, δ -caidineno, aroma dendreno. Aceite de plantas femeninas: β -pineno (14,7%), spatulenol (27,3%) y ϵ -nerolidol (10,1%); para plantas masculinas: spatulenol (30,3%), β -cariofileno (9,5%), biciclogermacreno (8,9%) y ϵ -nerolidol (8,1%) (Gianello y col., 2000) (Zunino y col., 2004) |
| Otros Compuestos | Terpenos (Zunino y col., 2004), flavonoides (hispidulina), sesquiterpenlactonas y diterpenoides (Bandoni y col., 1972) (Dai y col., 1993) y otros compuestos fenólicos (Oliveira y col., 2003), ácidos cafeilquínicos (Czok y col., 1971; Kiso, 1983), ácido cafeico y ácido clorogénico e isoclorogénico (Palacios y col., 1999) |

Se ha informado que estos compuestos son los responsables de aumentar 3,5 veces el volumen de la bilis secretada, confiriéndole una gran actividad colerética y colagoga (Cifuentes y col., 2010). Evitan el éxtasis vesicular y la acción de la betaglucuronidasa que desconjuga la bilirrubina directa en insoluble y por lo tanto, su precipitación. Gracias a sus flavonoides (particularmente la hispidulina) y ácidos fenólicos posee una gran acción diurética y antiedematosa sin pérdida de iones potasio. Aumenta la excreción de urea a nivel renal y normaliza la urogénesis hepática.

Análisis fitoquímicos realizados de las partes aéreas del género *Baccharis*, han llevado al aislamiento de flavonoides, sesquiterpenos y diterpenoides (Bandoni y col., 1972; Dai y col., 1993), además de la presencia en extractos hidroalcohólicos de ácidos cafeoilquínicos, como ácido caféico, clorogénico (ácido 3-cafeoilquínico) e isoclorogénico (mezcla de tres ácidos dicafeoilquínicos isoméricos: 3,4; 3,5 y 4,5-dicafeoilharisquínico) (Czok y col., 1971; Kiso y col., 1983; Palacios y col., 1999).

Los estudios han demostrado que el género *Baccharis* es rico en polifenoles y considerando la diversidad de especies del género (500 spp.) (Verdi y col., 2005), es considerado una fuente de hierbas medicinales y aromáticas con componentes bioactivos, (Juliani y col., 2007).

Sin embargo, toda planta que quiere ser incorporada en el mercado en forma de drogas o como insumo industrial o agrícola, debe evaluarse desde el punto de vista de su acción tóxica o genotóxica para prevenir efectos adversos en la salud humana o animal.

Existe un conjunto de ensayos genotóxicos que tienen por objeto obtener información acerca de la actividad tóxica de un compuesto y evaluar el probable riesgo mutagénico y/o cancerígeno con un aceptable grado de confianza.

El documento denominado Genotoxicidad elaborado por la Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano en julio de 1997 (OMS) establece una batería estándar o de ensayos de genotoxicidad. Este Comité de Armonización sugiere la realización de no menos de tres ensayos, uno *in vitro* que detecta mutaciones génicas en bacterias, otro *in vitro* que detecte alteraciones cromosómicas en células de mamíferos y otro *in vivo* que detecte daño cromosómico en células hematopoyéticas en roedores.

Por otra parte, otros estudios como son los vinculados a la actividad tóxica así como los efectos adversos en el hombre y animales de laboratorio resultan importantes en la evaluación de las plantas medicinales. En particular, los referidos a *B. articulata* resultan relevantes para evaluar en profundidad sus propiedades medicinales.

1.8. Actividad toxicológica de las especies conocidas como “carquejas”

Desde el punto de vista toxicológico, las tres especies de *Baccharis* conocidas como “carqueja” han sido estudiadas por varios autores.

Los primeros estudios fueron los ensayos de toxicidad aguda realizados por Rocha (1943) utilizando *B. articulata* (Lam.). La administración oral de 3 g/kg de la infusión liofilizada en ratones no provocó signos de toxicidad, muerte, ni alteraciones

macroscópicas en los órganos estudiados. Posteriormente, los estudios de Alonso (1998) mostraron la ausencia de efectos adversos y/o tóxicos en humanos luego de varios días de administrar infusiones de *B. crispa* Sprengel. Adicionalmente, Gorzalczany y col. (1999) informaron que *Baccharis* no producía cambios de comportamiento ni modificaciones en la conducta de los animales de laboratorio estudiados.

Por otra parte, los ensayos realizados en roedores con *B. trimera* (Less.) no revelaron efectos tóxicos (Gamberini y col., 1991; Lapa y col., 1992). Investigadores de la Universidad de San Pablo (Brasil) llevaron a cabo un estudio a doble ciego de toxicidad oral (aguda y crónica) en ratas, administrando infusiones en base a 2 gramos de planta en 40 ml. Los resultados observados al finalizar las pruebas no mostraron señales de toxicidad ni cambios en los perfiles hematológicos de los animales estudiados (Pedrazzi y col., 1997).

Lo anterior indica que las especies del género *Baccharis* no presentan efectos tóxicos y adversos en ensayos de toxicidad en animales. Sin embargo, es de gran importancia realizar estudios de mutagenicidad que contribuyan a la evaluación completa tendiente a la utilización de la planta en forma segura y eficaz.

En los últimos años, el número de estudios sobre las propiedades fitoterapéuticas de diversas plantas se ha incrementado notablemente. Estos incluyen estudios sobre las actividades mutagénicas y anti-mutagénicas y su correlación con la presencia de ciertas sustancias encontradas en la composición fitoquímica de las plantas, tales como grupos de flavonoides (Czeczot y col., 1990; Edenharder y Tang,

1997; Beudot y col., 1998; Fernandez de Sá Ferreira y Ferraõ Vargas, 1999), taninos (Kada y col., 1985; Horn y Ferraõ Vargas, 2003) y alcaloides (Campesato y col., 1997).

Los compuestos fitoquímicos tales como los flavonoides y taninos (presentes en el género *Baccharis*) han sido descritos en la literatura como los causantes de actividades tanto mutagénicas como antimutagénicas. Esta aparente contradicción en las respuestas involucra complejas acciones biológicas que pueden ser dependientes de las dosis, del compuesto empleado, de la estructura y afinidad química y su posible potencial para actuar como inductores o inhibidores de enzimas o sus metabolitos involucrados en la desactivación de mutágenos.

1.9. Estudios mutagénicos y antimutagénicos del género *Baccharis*

Los estudios de mutagenicidad con esta planta son escasos. Fachinetto y Tedesco (2009) evaluaron el potencial efecto citotóxico de infusiones acuosas de *B. trimera* y *B. articulata* (15 mg/ml y 75 mg/ml) sobre el ciclo celular de *Allium cepa*. Los resultados indicaron que los extractos de estas especies mostraron efecto antiproliferativo y mutagénico en las concentraciones estudiadas, no observando diferencias de estos efectos en las etapas de desarrollo de la planta. Estos autores concluyeron que es posible verificar la presencia de actividad antiproliferativa y mutagénica en las especies estudiadas, lo que indica que su uso por la población requiere más atención. Sin embargo, recomiendan profundizar los estudios con el objeto de evaluar con mayor precisión los riesgos potenciales de mutágenos presentes en los extractos acuosos de *B. trimera* y *B. articulata*.

Los ensayos genéticos, realizados con la cepa *S. typhimurium* con prueba de microsoma, permiten una rápida detección de compuestos mutagénicos/antimutagenos y probablemente, de sustancias cancerígenas, a un menor costo (Mortelmans y Zeiger, 2000). En este sentido, Borgo y col., (2004) demostraron los efectos mutagénicos de extractos acuosos de *B. articulata* (Lam.) Persoon mediante el Ensayo de Ames en las cepas TA98, TA100 y TA102. Esta actividad se observó en un rango de concentraciones de 250 a 500 mg/placa del extracto de *B. articulata* con el método de incorporación en placa. Sin embargo, en presencia de actividad metabólica del hígado de mamíferos fue detectada, una importante disminución del efecto mutagénico, persistiendo sólo la respuesta mutagénica en la cepa TA98. Los autores concluyen que otros estudios resultan ser necesarios para confirmar esta propiedad y sus consecuencias en la salud humana.

Por otra parte, existen estudios de antimutagenicidad realizados a partir de las partes aéreas de especies del género *Baccharis* (Nakasugi y Komai, 1998). Estos autores encontraron que el extracto metanólico de la especie *B. trimera* (Less.) reduce fuertemente la mutagenicidad del 3-amino-1-metil-5H-pirido [4,3-b]-indol, en *S. typhimurium* TA98 en presencia de la fracción microsomal de hígado de rata. Los antimutágenos fueron purificados por cromatografía líquida de alta presión y la actividad antimutagénica de estos compuestos fue detectada mediante el Ensayo de Ames. Se identificaron cuatro sustancias activas en el extracto metanólico como 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona (genkwanin), 5,4'-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritin), 5,7,4'-trihidroxi-6 -metoxiflavona (hispidulin), y 5,7,4' -

trihidroxi flavona (apigenina). Estas flavonas son importantes sustancias activas en la carqueja.

Lo anteriormente expuesto resalta la necesidad de realizar nuevos estudios referidos a la actividad mutagénica y antimutagénica de esta planta así como evaluar los posibles compuestos involucrados en las actividades detectadas.

Debido a la complejidad de estos mecanismos resulta de interés incorporar en el presente trabajo de Tesis Doctoral, una revisión de los conceptos de mutagénesis y antimutagénesis.

1.10. Mutagénesis

La mutagénesis es el proceso por el cual se produce un cambio heredable que afecta al material genético. Puede producirse espontáneamente o ser inducida por agentes físicos o químicos (como la temperatura, sustancias químicas, luz ultravioleta o radiaciones ionizantes) y puede ocurrir en células somáticas o germinales. Es también importante destacar que determinados tipos de mutaciones pueden resultar de la interacción de agentes con dianas distintas del ADN, como por ejemplo el huso mitótico.

Para convertirse en un cambio hereditario la modificación debe dar lugar a un cambio en la información genética y ser transmitida a futuras generaciones de células u organismos. Una vez que una célula ha sufrido un daño primario en el ADN puede responder de distintas maneras:

a) La célula puede reparar el daño y restaurar la molécula de ADN a su estado original, en cuyo caso no existe mutación.

b) La célula puede morir, por ejemplo si la lesión en el ADN impide su replicación. En este caso la posibilidad de que la mutación ocurra queda eliminada.

c) La célula puede ser capaz de reparar el daño al ADN, pero no a su estado original o cometer errores en la replicación del ADN dañado. Estos procesos pueden dar lugar a alteraciones estables en la secuencia de nucleótidos que pueden ser transmitidos a las células hijas como mutaciones.

Las consecuencias derivadas de la aparición de mutaciones dependen de si las células afectadas son germinales o somáticas.

La reversión es una de las propiedades de las mutaciones. Si la secuencia ha sido cambiada a una secuencia diferente, en algunos casos ese cambio puede volver a la secuencia original a través de una mutación subsecuente. Los organismos que revierten una mutación, son llamados revertantes. Los rangos de reversión representan, de esta manera, el grado en que la secuencia de ADN está mutada y regresa a su tipo salvaje. Son cambios en la secuencia de nucleótidos en uno o unos pocos segmentos codificadores de un gen. Pueden ocurrir por sustitución de pares de bases (sustitución de una base por otra) o por la adición o delección de una o más bases alterando la secuencia de bases y por lo tanto cambiando el marco de lectura.

Mutaciones puntuales o génicas

Se describirán con detalle las mutaciones dado que serán herramientas de aplicación en el presente trabajo de Tesis Doctoral. La **Tabla 3** muestra diversos tipos de mutaciones génicas reconocidas.

Mutación de corrimiento de marco de lectura

El mayor porcentaje de las mutaciones espontáneas son las mutaciones de corrimiento de marco de lectura. Esta mutación ocurre cuando un par de bases o algunos pares de bases son removidos o adicionados al ADN, causando un corrimiento en la traducción de los genes restantes. Esto ocurre porque el código genético consta de un triplete de bases, y cualquier adición o sustracción que no sea múltiplo de 3, causará un corrimiento en el marco de lectura. Las mutaciones de corrimiento casi siempre inactivan la proteína, porque cada aminoácido de la proteína donde se produce la mutación estará equivocado.

Las mutaciones de corrimiento de marco de lectura, tienen la propiedad de revertir, si un par de bases está ausente, entonces una base puede ser insertada para restaurar y corregir la lectura correcta y viceversa. Más frecuentemente las mutaciones de corrimiento cuando no revierten, son suprimidas por la adición o sustracción de un par de bases cercanas al sitio original de la mutación, que restaura la lectura correcta (corrimiento de lectura por supresión).

Los mutágenos con estas propiedades son llamados de corrimiento de marco de lectura a causa de una lectura errada de ARN mensajero sintetizado de la cadena molde alterada del ADN.

Mutación de Intercambio de pares de bases

Diferentes mutaciones tendrán diferentes consecuencias en la función de una proteína. El intercambio de un par de bases puede ser el resultado de un error en la replicación, recombinación o durante la reparación. Las sustituciones ocurren cuando una base es remplazada por otra (transiciones y transversiones). Las

mutaciones de intercambio de bases, pueden también revertir. Si un par de bases ha sido cambiado por un par diferente, puede la misma volver a su estado normal a través de una mutación subsecuente.

1.11. Mecanismos de reparación

La continuidad de las especies de una generación a otra es un atributo de una de sus características biológicas más importantes, su plasticidad. Si el ADN no fuera estable y su replicación tan fidedigna, no existiría evolución biológica. Los errores que suceden durante la replicación, no son sólo atributo del ADN. Muchos factores ambientales pueden dañar esta molécula. Los daños químicos pueden ser muy deletéreos para la célula si su ADN no está capacitado para replicar por encima del daño, y así no podrá multiplicarse. En el caso de ser capaz de replicarse por encima del daño, causará mutaciones, muchas de las cuales serán deletéreas y otras letales (Snyder y Champness, 2007).

La célula tiene mecanismos de reparación para el daño que ocurre sobre el material genético. No todos los mecanismos de reparación en la célula son específicos y algunos sistemas reparan diferentes tipos de daño.

Existen dos sistemas de reparación involucrados directamente en las características genotípicas de las cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas para la detección de mutagénesis. Algunas de estas cepas son deficientes en el sistema de reparación por escisión (*uvrB*⁻) y poseen el sistema de reparación con error SOS (responsable de la mutagénesis) exacerbado, ya que se encuentra en doble dosis, en el genóforo bacteriano así como en los plásmidos *pKM101* y *pAQ1* (plásmidos multicopia).

Tabla 3. Tipos de mutaciones génicas

| | | |
|---|----------------|---|
| Sustitución de bases | En el ADN | Resultados en el ADN |
| | Transiciones | Pu→Pu o Pi→Pi |
| | Transversiones | Pu→Pi o Pi→Pu |
| Desaminación de bases o quitar un grupo amino | | Citosina es particularmente susceptible Citosina→Uracilo |
| Oxidación de las bases | | Formas reactivas del oxígeno, tales como peróxido y radicales libres reaccionan con las bases y las alteran |
| Inserciones o deleciones de nucleótidos | | Produce mutaciones de corrimiento de marco de lectura |
| Duplicaciones | | Es la repetición de un segmento de ADN del interior de un gen |
| Depurinización | | Se produce la rotura del enlace glucosídico entre la base nitrogenada y el azúcar, formando sitios apurínicos |
| Inversiones | | Un segmento de ADN del interior de un gen se invierte |
| Transposiciones | | Un segmento de un gen cambia de posición para estar en otro lugar distinto del mismo gen o en otro lugar del genoma |

Fuente: Snyder y Champness, 2007

Sistema de reparación por escisión de nucleótidos

Debido a que el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos, es una línea de defensa muy importante ante determinados tipos de agentes que producen daño al ADN, incluyendo la irradiación UV, las mutaciones en estos genes determinan que las células sean mucho más sensibles a éstos agentes. Los mutantes

defectivos en este sistema de reparación mueren a bajas dosis de irradiación con mayor frecuencia que el tipo salvaje (**Tabla 4**) (Snyder y Champness, 2007).

El análisis genómico comparativo ha encontrado que estos genes son ortólogos en todas las especies de eubacterias, así como algunos miembros de Archaea. Los productos de los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*, sólo están involucrados en el sistema de reparación por escisión, mientras que otros incluyendo los genes *polA* y *uvrD*, son requeridos por otros sistemas de reparación.

Los genes del sistema de reparación por escisión (*uvrA*, *uvrB* y *uvrD*), están casi siempre expresados en pequeñas cantidades y se expresan en grandes cantidades después de que el ADN está dañado. Este es un mecanismo de supervivencia que asegura que las proteínas de reparación sean expresadas cuando son necesarias. Debido a que este es un sistema inducible por la presencia de daño en el ADN, los genes *uvr*, llamados genes *din* ("daño inducible") incluyen *recF*, *recA*, *umuC*, y *umuD* y muchos genes *din*, *uvrA*, *uvrB*, y *uvrD*, que forman parte del regulón SOS.

La mutación *uvrB*⁻, determina el desenlace y la expresión de los genes involucrados en el sistema de reparación propenso al error (SOS), responsable de la mutagénesis. Debemos destacar que en las células bacterianas de *S. typhimurium*, ambos sistemas (reparación por escisión y SOS) se encuentran en doble copia o multicopia (genoma bacteriano y en el plásmido). Esto genera una mayor sensibilidad al desencadenamiento de la mutagénesis

Tabla 4. Genes involucrados en *UvrABC*, endonucleasas del sistema de reparación por escisión

| Gen | Función del producto del gen |
|-------------|---|
| <i>uvrA</i> | Proteína de unión con el ADN |
| <i>uvrB</i> | Forma un complejo con el ADN; ruptura en el extremo 3' de la lesión |
| <i>uvrC</i> | Se une al complejo UvrB-ADN; ruptura en el extremo 5' de la lesión |
| <i>uvrD</i> | Helicasa II: ayuda a remover el daño conteniendo oligonucleótidos |
| <i>polA</i> | Pol I: rellena sólo el hueco de la hebra simple |
| <i>lig</i> | Ligasa: sella la ruptura en la hebra simple |

Fuente: Snyder y Champness, 2007

Sistema de reparación propenso al error SOS

El daño sobre el ADN conduce a la inducción de genes cuyos productos son requeridos para la reparación del ADN. Hay una clase de genes que se inducen luego de producido un daño en el ADN, denominados genes *din*, que incluye los genes que codifican productos que forman parte del sistema de reparación por escisión de nucleótidos y el de recombinación. Los productos de otros genes *din* ayudan a la célula a sobrevivir al daño de otra forma.

Muchos genes *din* son regulados por la respuesta SOS, llamada así, porque este mecanismo rescata las células que han sufrido un daño severo en el ADN y los genes bajo este tipo de reparación son llamados genes SOS.

Las cepas de *S. typhimurium* utilizadas en el Ensayo de Ames nos permiten inferir cual sería el probable mecanismo de acción involucrado, así como que tipo de mutación fue producido por algún agente estudiado.

El ensayo de *Salmonella* (detección de mutagénesis) ha sido utilizado como guía del potencial mutagénico de una variedad de compuestos tanto de aquellos que están en la naturaleza, así como los artificialmente introducidos al ambiente. Debido a que será utilizado en el presente trabajo de Tesis, los fundamentos del método se describen a continuación.

1.12. Ensayo de Ames.

1.12.1. *Salmonella* ensayo microsomal: un “ensayo de reversión”

Las bacterias son organismos cuya genética puede ser fácilmente manipulada lo cual permitió el diseño de muchos modelos para el entendimiento de los procesos de la vida (Snyder y Champness, 2007). Por ello, es posible detectar mutágenos empleando una serie de bacterias especialmente diseñadas.

El Ensayo de Ames es utilizado ampliamente en el mundo como una evaluación primaria del potencial mutagénico de sustancias químicas y drogas en general. Para luego completar las pruebas en líneas celulares y en animales de laboratorio. Cuando un compuesto o cualquier sustancia es considerada mutagénica, existe una alta posibilidad de predicción de carcinogénesis (Zeiger y col., 1990). Sin embargo, los estudios empleando modelos animales son relativamente costosos y consumen mucho más tiempo. Muchas sustancias químicas carcinogénicas causan daño en el ADN, y son mutagénicas para los sistemas bacterianos, así como también para

humanos. Por lo tanto, los sistemas bacterianos pueden ser utilizados como pruebas iniciales para determinar si ciertos químicos podrían ser potencialmente carcinogénicos.

Los sistemas bacterianos presentan ventajas prácticas y teóricas en la detección de mutágenos como ser: genoma pequeño (cerca de 4×10^6 pares de bases), gran número de organismos expuestos (cerca de 10^9 /placa) y la selección positiva de los organismos mutados.

Existen directivas de organismos internacionales, e.g., Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), The International Commissions on Harmonization (ICH), tendientes a la armonización del Ensayo de Ames y de esta forma asegurar la uniformidad de los procedimientos a nivel mundial.

1.12.2. Lineamientos generales del Ensayo de Ames

El Ensayo de Ames, también llamado ensayo *Salmonella*/microsomal, ensayo de reversión de la mutación (*Salmonella*/microsomal assay, (reversión mutagenic assay), fue desarrollado por el Dr. Bruce Ames y sus colaboradores (Ames y col., 1973; Snyder y Champness, 2007). Es un sencillo ensayo bacteriano utilizado en la detección de mutágenos químicos. Es un ensayo de genotoxicidad *in vitro* tendiente a cuantificar el daño ocasionado al material genético. La prueba utiliza cepas de *S. typhimurium* construidas por ingeniería genética, capaces de detectar mutaciones génicas por corrimiento de marco de lectura o por sustitución de pares de bases del ADN. Para la detección de sustancias promutagénicas, se incluye en el ensayo la fracción microsomal de hígado de rata, un sistema de activación metabólica, que

permite la evaluación de metabolitos de la muestra problema, ya que el sistema bacteriano no lo posee.

En la **Tabla 5** se resumen las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. typhimurium* empleadas en el Ensayo de Ames. Estas cepas poseen una mutación en el gen que codifica para el aminoácido histidina (*his*⁻) y como consecuencia no les permite crecer a las células en ausencia de este aminoácido (bacterias mutantes de requerimiento, auxótrofas: incapaces de crecer en medio mínimo). Nuevas mutaciones en el sitio o cercanas a estos genes mutados pueden restaurar la función de los genes y así permitir que las células crezcan como el tipo salvaje (reversión espontánea o reversión inducida).

Además de ésta mutación, se pueden adicionar otras mutaciones que incrementan la detección de mutágenos y las convierten en bacterias muy sensibles para la detección de mutagénesis. Existen cepas de *S. typhimurium* que llevan mutaciones en el gen *rfa*, genes responsables de la síntesis de lipopolisacaridos (LPS), convirtiendo la pared celular de la bacteria más permeable a compuestos de gran tamaño molecular. Además se puede incorporar una delección en el sistema de reparación por escisión *uvrB*, (*uvrB*⁻), incrementando aún más la sensibilidad para la detección del proceso de mutagénesis. El gen mutado *uvrB*⁻ elimina el sistema de reparación por escisión, de esta manera hay más lesiones en el ADN y se incrementa la sensibilidad y detección por parte del sistema SOS, reparación propensa al error. A su vez, esta mutación se extiende a un bio-gen (*bio*⁻) que no

revierte, de manera que esta bacteria requiere D-biotina para crecer. Algunas cepas llevan un Factor R, *pKM101* (plásmido resistente a la ampicilina).

El plásmido *pKM101* de *S. typhimurium* incrementa química y espontáneamente la mutagénesis aumentando el sistema de reparación con error, que se encuentra normalmente en este organismo (Mc Cann y col., 1975; Walker y Dobson, 1979).

La resistencia al antibiótico ampicilina sirve como marcador para detectar la presencia del plásmido.

El plásmido, además, lleva los genes *mucAB* homólogos de los genes *umuAD*, del genóforo bacteriano asociados a la respuesta de reparación con error SOS.

La cepa TA102, además del plásmido *pKM101*, tiene un plásmido multicopia *pAQ1* y una inserción de la mutación *hisG428*, amplificando así los sitios “blanco” que incrementan la capacidad de la cepa de detectar agentes de intercambio por entrecruzamiento en el ADN (Mortelmans y Stocker, 1997).

El número de colonias de las cepas testigo de *S. typhimurium* con capacidad independiente de la histidina son determinadas en experimentos de mutagénesis y se expresan como número de revertantes espontáneas por placa. Las colonias revertantes son visibles claramente, con un fondo uniforme con bacterias auxótrofas. Cada cepa testigo revierte espontáneamente con una frecuencia que es característica para cada cepa (**Tabla 5**). Las células bacterianas cuando son inducidas por diferentes agentes (e.g., químicos, radiaciones, fármacos, aceites, alimentos, aire), pueden indicar la presencia de un efecto mutagénico, cuando aumenta el número de revertantes por encima de la reversión espontánea.

El ensayo se realiza con controles positivos utilizando mutágenos de acción conocida. Se considera que una sustancia es mutagénica cuando duplica el número de la reversión espontánea correspondiente a las cepas testigo seleccionada para la prueba (Maron y Ames, 1983).

Tabla 5. Genotipos y fenotipos de las cepas *S. typhimurium*

| Cepa | Mutación | Mutación ^a $\Delta uvrB$ -bio | ^b LPS defectuoso | ^c Plásmido | ^d Reversión Espontánea |
|--------|-----------------|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| TA1535 | <i>hisG46</i> | <i>uvrB</i> ⁻ | <i>rfa</i> | Sin plásmido | 5-20 |
| TA100 | | <i>uvrB</i> ⁻ | <i>rfa</i> | <i>pKM101</i> | 120-200 |
| TA1538 | <i>hisD3052</i> | <i>uvrB</i> ⁻ | <i>rfa</i> | Sin plásmido | 5-20 |
| TA98 | | <i>uvrB</i> ⁻ | <i>rfa</i> | <i>pKM101</i> | 30-50 |
| TA1537 | <i>hisC3076</i> | <i>uvrB</i> ⁻ | <i>rfa</i> | Sin plásmido | 5-20 |
| TA97 | <i>hisD6610</i> | <i>uvrB</i> ⁻ | <i>rfa</i> | <i>pKM101</i> | 100-200 |
| TA97a | <i>hisG428</i> | <i>uvrB</i> ⁻ | <i>rfa</i> | <i>pKM101</i> | 90-180 |
| TA104 | | <i>uvrB</i> ⁻ | <i>rfa</i> | Sin plásmido | 300-400 |
| TA102 | | <i>uvrB</i> ⁺ | <i>rfa</i> | <i>pKM101</i> , <i>pAQ1</i> | 240-320 |

^a $\Delta uvrB$ Una delección a través del gen *uvrB*-bio, en todas las cepas excepto en la cepa

TA102, ^bLPS: mutación de la barrera de lipopolisacáridos de la membrana celular bacteriana, ^cPlásmido: *pKM101*, *pAQ1*, ^dreversión espontánea/placa

Activación metabólica (fracción microsomal S9)

Numerosos productos químicos necesitan ser modificados *in vivo* para que alguno(s) de sus derivados tenga(n) actividad mutagénica. Esta es la principal limitación de cualquier sistema bacteriano de detección de mutágenos, ya que el sistema bacteriano no reproduce la metabolización llevada a cabo por un organismo eucariota superior, que puede activar o desactivar, una sustancia determinada. Se

conoce el hecho que carcinógenos *in vivo* como la aflatoxina B1 o el benzo (α) pireno, sólo arrojan resultados positivos en el ensayo de mutagenicidad de *S. typhimurium* cuando son activados por la fracción microsomal S9, activación que simula la acción metabolizadora de un hígado de mamíferos, ya que el sistema bacteriano carece de estas enzimas. La fracción microsomal S9 es un homogeneizado, generalmente, de hígado o riñón de rata y estas enzimas microsómicas contenidas en la fracción pos-microsomal S9 (conjunto de vesículas, túbulos y gránulos relacionados con el retículo endoplasmático granular y el aparato de Golgi) cuya actividad es dependiente de NADPH, NADP y glucosa -6-fosfato (Mortelmans y Zeiger, 2000).

De Flora (1978) reporta evidencias *in vitro* indicando que algunos compuestos que son mutagénicos *per se* en *S. typhimurium* pueden parcialmente o totalmente ser desactivados en presencia del homogeneizado de hígado. Este concepto, es de fundamental importancia y deberá ser tenido en cuenta en el análisis de los resultados para evitar falsos negativos. Algunos carcinogénicos químicos, como son las aminas aromáticas o hidrocarburos aromáticos policíclicos son biológicamente inactivos, sin embargo, se activan por metabolización a su forma activa (pro-mutágenos). En humanos el sistema oxidativo citocromo P450 está presente fundamentalmente en células de hígado, pulmón y riñón y es capaz de metabolizar a un número grande de sustancias químicas a su forma electrofílica, volviéndolos reactivos al ADN.

Algunos de los metabolitos intermedios son potentes mutágenos en el ensayo de Ames. Debido a que el sistema bacteriano no posee la capacidad metabólica del mamífero, es que el ensayo utiliza un sistema exógeno de activación metabólica (fracción microsomal S9), de manera que es agregado junto con los químicos a ensayar y la bacteria (Mortelmans y Zeiger, 2000; Maron y Ames, 1983). Por este motivo es extremadamente indispensable realizar todos los ensayos, con y sin activación metabólica.

1.13. Secuencias “blanco” de ADN de las cepas de *S. typhimurium*

La mutación *hisG46*, marcador en la cepa TA1535 y TA100 testigo *S. typhimurium*, resulta de la sustitución de leucina (GAG/CTC) por prolina (GGG/CCC). Esta mutación es revertida al estado salvaje por mutágenos que causan sustitución de pares de base, mutaciones principalmente de los pares GC. La mutación *hisD3052* llevadas por las cepas TA1535 y TA98 es una mutación -1 de corrimiento de marco lectura, que afecta la lectura en cercanías de la secuencia repetida C-G-C-G C-G-C-G. La reversión de la mutación *hisD3052* al tipo salvaje es inducida por varios mutágenos como el 2-Nitrofluoreno (mutágeno de corrimientos de marco de lectura) y varios compuestos nitrosos aromáticos derivados de amino-carcinógenos. La cepa TA1537, que lleva la mutación *hisD3076* tiene una mutación +1 corrimiento de marco de lectura próximo al sitio de secuencias repetidas -C-C-C- y revierten al estado salvaje por mutaciones de corrimiento de marco de lectura, que no es fácilmente detectado por el marcador *hisD3052*, como es la 9-aminoacridina (Ames y col., 1973). La mutación *hisD6610* en la cepa TA97 también lleva una mutación

(citosina) de tipo +1 corrimiento de marco de lectura resultando en un corrimiento de 6 citosina (–C-C-C-C-C-C–). Esta cepa parece ser más sensible para algunos mutágenos que aquellos que reversion la cepa TA1535 y TA98 (Levin y col., 1982). Los sitios “blanco” del ADN, para la descripción anterior, sólo contiene el par de bases GC. En contraste, existen las cepas TA102 y TA104 que fueron desarrolladas para contener pares de base AT en el sitio mutado *hisG428* (Mortelman y Zeiger, 2000). La mutación se encuentra en el plásmido multi-copia *pAQ1* en la cepa TA102 y en el cromosoma bacteriano en la cepa TA104. El plásmido le confiere resistencia a la tetraciclina, con el fin de ser un marcador de la presencia del plásmido. La mutación *hisG428* es una mutación “ocre”, TAA en el gen *hisG*, que puede ser revertido por seis cambios de pares de base posibles, transiciones y transversiones. Estas mutaciones también reversion por mutágenos que causan daño oxidativo. En la cepa TA102, el sistema de reparación detecta agentes como la bleomicina y la mitomicina que producen entrecruzamiento (Levin y col., 1982; Sanabruch y Walker, 1980; Walker y Dobson, 1979).

1.14. Antimutagénesis

Antimutagénesis es el evento que conduce a contrarrestar o eliminar los daños mutagénicos provocados por componentes de diversos orígenes presentes en el ambiente, que constituyen un factor de riesgo para el material genético y los pueden conducir finalmente a un proceso neoplásico (Kada, 1984).

El término “Antimutagénesis” fue utilizado inicialmente por Novik y Szilard en el año 1951 cuando descubrieron que la presencia de nucleótidos normales de purina en

un medio de crecimiento reducía significativamente la frecuencia de mutaciones de resistencia a fagos en la población bacteriana (Novick y Szilard, 1951, 1952).

Kada en el año 1984 postuló que la antimutagénesis es el proceso mediante el cual se reduce la frecuencia de mutaciones espontáneas o inducidas. Tomando en cuenta este concepto, la acción antimutagénica de un compuesto queda definida como la característica o acción de esta sustancia para disminuir o evitar el daño al ADN celular (Kada, 1984).

Los antimutágenos pueden ser agrupados en dos grandes categorías: a) los agentes bloqueadores, que impiden que los carcinógenos alcancen o reaccionen con los sitios diana y b) los agentes supresores, que previenen la evolución de los procesos neoplásicos (Wattenberg, 1981).

De Flora en 1997, planteó que los agentes bloqueadores son inhibidores de la iniciación de la tumorigénesis, mientras que los agentes supresores pueden ser identificados como inhibidores de la promoción/ progresión de dicho proceso.

En el año 1987, Kada y sus colaboradores clasificaron a los antimutágenos en dos categorías a) desmutágenos y b) bio-antimutágenos (**Fig. 3 y 4**), clasificación usada actualmente (Kada y col., 1987).

El término desmutágeno se refiere a aquellos agentes que actúan en forma directa con el mutágeno, modificándolo, ya sea en su estructura química o bioquímica, trayendo consigo reacciones de metabolización dentro del organismo antes que el mismo alcance la molécula blanco (**Fig. 3**). Otros desmutágenos inhiben la acción del sistema enzimático P450 involucrado en la activación de mutágenos.

Los bio-antimutágenos (**Fig. 4**) incrementan la fidelidad en la replicación, promueven la reparación del daño sobre el ADN y están involucrados en la estimulación de la reparación libre de errores y en la inhibición del sistema de reparación con error SOS (Wall y col., 1988). Son agentes biológicamente activos que interfieren con las funciones celulares que determinan los procesos de mutagénesis o reparación del ADN, esto lleva a una disminución de la frecuencia de las mutaciones tanto inducidas como espontáneas.

El empleo de los métodos microbianos hacen posible distinguir antimutágenos (agentes que trabajan *in vitro* sobre los mutágenos).

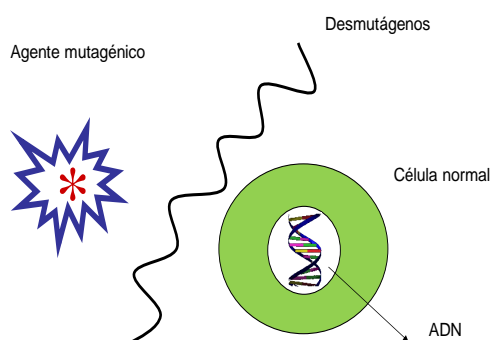


Fig. 2. Esquema representativo de la posible acción protectora de los desmutágenos

En los mamíferos, es bastante dificultoso saber si un agente ha suprimido la mutagénesis, modificando un mutágeno antes de interactuar con el ADN celular o interfiriendo con algún aspecto del metabolismo celular.

Para evaluar la actividad antimutagénica, el Ensayo de Ames nos permite cuantificar el efecto quimio-protector de diferentes sustancias cuyos compuestos son capaces de impedir o bloquear la mutagénesis.

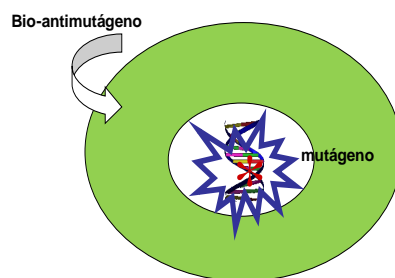


Fig. 3. Esquema representativo de la posible de acción de los bio-antimutágenos sobre el ADN.

La evaluación se hace mediante la presencia de testigos o controles positivos, promutágenos o mutágenos de acción conocida.

Esto hace que el sistema bacteriano capaz de revertir la mutación del gen histidina (*his⁻*), inducido por un mutágeno o promutágeno, quede bloqueado por algún mecanismo en la célula.

La mayoría de los estudios vinculados a las propiedades antimutagénicas, quimio-preventivas y anti-carcinogénicas, así como estudios epidemiológicos realizados en humanos, han sido focalizados en los téis negro y verde (Yamada y Tomita, 1994).

Han sido ampliamente estudiadas las propiedades anti-cancerígenas de los téis, así como la potencialidad de los polifenoles en los téis negro y verde y su capacidad en la inhibición de tumores (Hirose y col., 1993).

Escasa es la información bibliográfica internacional referida al efecto antimutagénico de *B. articulata*, planta objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral. Como se mencionó anteriormente, el efecto antimutagénico del extracto metanólico de *B. trimera* (Less.) ha sido informado empleando el Ensayo de Ames .

Los autores concluyen que a pesar de no haber determinado cual de las cuatro flavonas aisladas en el extracto metanólico resultaron ser desmutágenos o bioantimutágenos, se sospecha que son desmutagenos debido a que una de ellas, luteolina, fue informada como fuerte desmutágeno frente al mutágeno Trp-P-2 y no bioantimutágeno (Nakasugi y Komai, 1998) .

Por todo lo expuesto, resulta relevante estudiar el efecto antimutagenico y esbozar posibles mecanismos de acción antimutagénica de *B. articulata* empleando el Ensayo de Ames.

Se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

El extracto acuoso de *B. articulata* (Lam.) Persoon, planta medicinal popular (Boelcke, 1981) empleada en Argentina predominantemente como infusión, presenta actividad antimutagénica y esta capacidad está relacionada con sus propiedades antioxidantes.

2.2. Objetivo General

Evaluar la actividad antimutagénica del extracto acuoso de *B. articulata* (Lam.) Persoon mediante el Ensayo de Ames y analizar los componentes del extracto acuoso con actividad antioxidante.

2.3. Objetivos Específicos

Estudiar la composición de polifenoles presentes en el extracto acuoso de *B. articulata* (Lam.) Persoon por cromatografía líquida de fase inversa RP-HPLC.

Evaluar la actividad antioxidante del extracto acuoso de *B. articulata* (Lam.) Persoon y de uno de sus compuestos mayoritarios (ácido clorogénico) mediante el ensayo de inhibición del radical DPPH*.

Evaluar el efecto tóxico del extracto acuoso de *B. articulata* (Lam.) Persoon y del ácido clorogénico, utilizando dos variantes del Ensayo de Ames (incorporación en placa y pre incubación) frente a las cepas de *S. typhimurium* TA100 y TA98 con y sin agregado de fracción microsomal.

Evaluar el efecto mutagénico inducido por el extracto acuoso de *B. articulata* (Lam.) Persoon y por el ácido clorogénico utilizando dos variantes del ensayo de mutagénesis de *S. typhimurium* (incorporación en placa y pre incubación) frente a las cepas TA100 y TA98 con y sin agregado de fracción microsomal.

Evaluar el efecto antimutagénico del extracto acuoso de *B. articulata* (Lam.) Persoon utilizando dos variantes del Ensayo de Ames (incorporación en placa y pre-incubación) y del ácido clorogénico (método de pre-incubación), frente a las cepas TA100 y TA98 con y sin activación metabólica empleando mutágenos de acción conocida.

Comparar los efectos antimutagénicos del extracto acuoso de *B. articulata* (Lam.) Persoon y del ácido clorogénico.

Proponer posibles mecanismos de acción antimutagénica de *B. articulata* (Lam.) Persoon.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sustancias Químicas

Los reactivos y drogas utilizadas en los ensayos generales fueron: 2-nitrofluoreno (2-NF, CAS Nº 607-57-8), 2-aminofluoreno (2AF, CAS Nº 153-78-6), azida sódica (AZS, CAS Nº 26628-22-8), dimetil sulfoxido (DMSO, CAS Nº 67-68-5), 2, 2-Difenil-2-picril hidrazilo (DPPH, CAS Nº 1898-66-4), quercetina (CAS Nº 117-39-9.100), rutina (CAS Nº 7621-88-7), ácido clorogénico (CAS Nº 327-97-9.100), kaempferol (CAS Nº 520-18-3) y ácido cafeíco (CAS Nº 331-39-5) adquiridos de Biochemicals (California). Metanol (CAS Nº 67-56-1) y ácido fórmico (CAS Nº 64-18-6¹) fueron adquiridos de la firma Mallinckrodt (Paris, KY, EEUU).

Los reactivos para el desarrollo del Ensayo de Ames fueron: Nutrient Broth Oxoid Nº2 (NB Nº2, CM0067), adquirido en la empresa Hamshire, (Inglaterra).

Agar bacteriológico tipo A (CAS Nº 9002-18-0), proveniente de Merck KGaA, (Darmstadt, Alemania). Ampicilina (CAS Nº 69-53-4), tetraciclina (60-54-8) D-biotina (CAS Nº 58-85-5), L- histidina-HCl (CAS Nº 71-00-1) y cristal violeta (CAS Nº 548-62-9) fueron provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). D- Glucosa (CAS Nº 50-99-7), cloruro de sodio (CAS Nº 7647-14-51¹), sulfato de magnesio heptahidratado (CAS Nº 10034-99-8) y ácido cítrico (CAS Nº 77-92-91) fueron provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Fosfato de potasio dibásico anhidro (CAS Nº 7758-11-4) y fosfato de amonio sódico tetrahidratado (CAS Nº 7783-13-3) fueron adquiridos en la empresa Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Cloruro de magnesio (CAS Nº 7791-18-6), cloruro de potasio (CAS Nº 7447-40-7), glucosa-6-fosfato (CAS Nº 56-73-5), β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (CAS Nº 24292-60-2), fosfato de

sodio dihidrogenado (CAS N°10049-21-5) y fosfato de sodio dibasico (CAS N° 7632-05-5), fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU).

La fracción microsomal S9 fue adquirida a la empresa Moltox Molecular Toxicology Inc. (Booen, NC, EEUU).

3.2. Soluciones y Medios de cultivo

Solución L-histidina HCl - D-biotina (0,5 mM – 0,5 mM)

Solución Vogel Bonner (50X): solución acuosa de sulfato de magnesio heptahidratado 10 g/L, ácido cítrico 100 g/L, fosfato de potasio dibásico anhidro 500 g/L, fosfato de amonio sódico tetrahidratado 175 g/L

Buffer fosfato 0,2 M

Solución fisiológica: Cloruro de sodio 7 g/L

Solución de L-histidina HCl 2 g/L

Solución de D-biotina 0,5 mM

Solución de ampicilina 0,02 N

Solución de tetraciclina 0,02 N

Los medios de cultivo fueron:

Caldo Nutritivo: Nutrient Broth N° 2 25 g/L

Medio Mínimo: D-glucosa 20 g/L, agar bacteriológico Tipo A 15 g/L, Vogel Bonner (50X) 20 ml/L

Medio permisivo: D-glucosa 20 g/L, agar bacteriológico tipo A 15 g/L, Vogel Bonner (50X) 20 ml/L, solución de L-histidina HCl 2×10^{-2} g/L, solución de D-biotina $7,32 \times 10^{-4}$ g/L y solución de ampicilina $2,5 \times 10^{-2}$ g/L

Agar blando: agar bacteriológico tipo A 6 g/L, cloruro de sodio 5 g/L

Preparación de mezcla S9 para los ensayos con activación metabólica

Para los ensayos con activación metabólica se preparó una solución mezcla de: solución salina de cloruro de magnesio - cloruro de potasio (1,63 g/L - 2,46 g/L), glucosa-6-fosfato 1,41 g/L, adenina dinucleótido fosfato 3,06 g/L, buffer fosfato 0,1 M (pH=7). A esta solución se le incorporaron 40 ml/L del extracto microsómico de hígado de rata (S9).

3.3. Material utilizado: hierba medicinal *B. articulata* (Lam.) Persoon

El material utilizado consistió en hojas y troncos secos de *B. articulata* (Lam.) Persoon. Las muestras comerciales [1000 g (**Fig. 5**)] fueron adquiridas en una farmacia homeopática de la ciudad de la Plata (Prov. Buenos Aires, Argentina). Este material provenía de Villa Dolores, Prov. Córdoba, Argentina, siendo la empresa distribuidora “Herbores” (Capital Federal, Pcia. Buenos Aires, Argentina)

El material fue identificado por la Dra. Etilé Spegazzini del Laboratorio de Fármaco Botánica de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata (UNLP). Espécimen depositado (Nº 1107, 0906) en el herbario del Museo de Farmacognosia “Carlos Spegazzini”, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Buenos Aires , Argentina.



Fig. 4. Bolsas con hojas y troncos secos de *B. articulata* (1000 g)

3.4. Método utilizado para la obtención del extracto acuoso de *B. articulata* (EAB)

Para la preparación del EAB se procedió a pesar 30 g del material (hojas y troncos secos) y se llevó a volumen con 100 ml de agua destilada estéril caliente (85°C), simulando una infusión teiforme. La infusión se mezcló y trituró para homogeneizarlo con una procesadora hogareña a temperatura ambiente. La mezcla preparada se tamizó con un colador grueso y luego se filtró con papel (Φ 90 mm, Whatman, Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)). El filtrado se centrifugó tres veces a 9000xg (4°C, 30 min) utilizando una centrifuga Avanti™ J-25, (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). El sobrenadante se colocó en bandejas de plástico formando una película de 1 a 2 mm de espesor y se colocó a - 80°C, con la finalidad de preparar el material a ser liofilizado.

Para la liofilización se utilizó un equipo Heto FD4 (Argentina), bajo las siguientes condiciones de liofilización: $-50 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, con bomba rotativa a paleta R26; caudal 5,7m/h; presión de vacío 2×10^{-3} atm (marca Vacuubrand, Alemania). El material liofilizado se fraccionó en tubos de ensayo preservándolo a -20°C hasta su uso.

La preparación de las soluciones de trabajo se realizaron utilizando 2 g del material liofilizado el que fue resuspendido en 10 ml de agua destilada estéril a 85°C. Esta suspensión se fraccionó en alícuotas homogeneizadas de 1 ml, las que se preservaron a -20°C hasta su empleo experimental. Previamente a la realización de los ensayos, el material se filtró a través de membranas osmóticas de Φ 0,45 μ m y 25 mm de diámetro.

3.5. Determinación de los polifenoles en el EAB por cromatografía líquida de fase inversa (RF-HPLC)

El análisis del contenido de polifenoles en el EAB se realizó aplicando el método de cromatografía líquida de fase inversa (RF-HPLC). Para ello, se empleó un cromatógrafo líquido Hewlett Packard 1100 (CA, USA) equipado con bomba binaria, inyector automático, degasificador de vacío y detector de arreglo de diodos (DAD) conectado a la estación de trabajo (PC equipada mediante programa computacional adquirente de datos), empleando una columna (250 x 4,6 mm², diámetro interno) conteniendo partículas de Zorbax 300 SB-C18 de 5 Mm y conectada a una columna guarda.

Se empleó un gradiente de elución escalonado a un caudal de 0,9 ml/min. La fase móvil contenida en el reservorio "A" consistió de una mezcla de agua ultrapura (Milli-Q, Millipore Co., Bedford, MA, USA), metanol y ácido fórmico (79,7:20,0:0,3) y en el reservorio "B" una mezcla de metanol y ácido fórmico (99,7:0,3). El gradiente empleado se describe en la **Tabla 6**. Finalmente la composición de la fase móvil

retornó a 0% B en 5 min y se mantuvo 10 min adicionales para equilibrar la columna antes de la próxima inyección.

Se utilizaron los siguientes polifenoles: ácido clorogénico, rutina, kaempferol, ácido cafeico y quercetina como estándares para la identificación de los compuestos presentes en el extracto. Las soluciones fueron filtradas antes de la inyección a la columna cromatográfica empleando membranas de nylon de Φ 0,22 μ .

En la **Tabla 7** se reproducen las concentraciones de los estándares usados y su tiempo de retención. Sobre la base de las longitudes de onda de los máximos de las bandas de absorción UV-vis se seleccionaron para el análisis de los cromatogramas dos longitudes de onda: 330 nm para los compuestos menos retenidos o más hidrofílicos (ácido clorogénico y ácido cafeico) y 360 nm para los más hidrofóbicos o más retenidos (rutina, quercetina y kaempferol).

Tabla 6. Gradiente de elución empleado en la corrida cromatográfica

| Tiempo (min) | %A | %B |
|--------------|-----|----|
| 15 | 100 | 0 |
| 15 | 90 | 10 |
| 10 | 70 | 30 |
| 10 | 40 | 60 |
| 2 | 20 | 80 |

Fase Móvil: (A) Agua, metanol y ácido fórmico (79,7:20,0:0,3) y (B) metanol y ácido fórmico (99,7:0,3)

Tabla 7. Concentraciones y tiempos de retención de los estándares utilizados en la determinación de polifenoles por cromatografía líquida de fase inversa

| Compuesto | Concentración (mg/ml) | Tiempo de retención (min) |
|-------------------|-----------------------|---------------------------|
| Quercetina | 0,103 | 44,52 |
| Rutina | 0,105 | 36,48 |
| Ácido clorogénico | 0,101 | 11,92 |
| Kaempferol | 0,108 | 44,47 |
| Ácido cafeico | 0,107 | 12,88 |

La muestra de EAB (30 μ l) fue inyectada en el equipo de RF-HPLC por triplicado. Adicionalmente, se realizaron los cromatogramas de las muestras en estudio con el método del sobreagregado de los estándares puros a los efectos de verificar la co-migración por el incremento del área del pico cromatográfico correspondiente.

La cuantificación de los compuestos detectados en el EAB se realizó a partir de las curvas de calibración de los estándares, usando el área de los picos expresada en mili Unidades de Absorbancia (mUA) obtenidas luego de la inyección de diferentes volúmenes de los estándares (**Tabla 8**).

El límite de detección (LOD) de la metodología se calculó a partir de la desviación estándar ($s_{y/x}$) y de la pendiente (b_1) de la curva de calibración empleando la siguiente fórmula propuesta por la IUPAC, que toma como parámetro el valor del desvío estándar de los compuestos residuales (ecuación 1).

Tabla 8. Curvas de calibración de los estándares realizada mediante RP-HPLC

| Compuesto | Ordenada al origen (área) | Pendiente (área mg/ml) | R ² (coeficiente de determinación) | Número de muestras |
|-------------------|---------------------------|------------------------|---|--------------------|
| Ácido clorogénico | 18,670±39 | 48369±2500 | 0,989 | 5 |
| Ácido cafeico | -169,000±94 | 85803±5629 | 0,987 | 5 |
| Rutina | -31,1880±12 | 19853±769 | 0,994 | 6 |
| Quercetina | -7,7684±63 | 40762±3999 | 0,962 | 6 |
| Kaempferol | -98,4160±40 | 48101±2433 | 0,989 | 6 |

$$LOD = 3 s_{y/x} / b_1$$

ecuación (1)

Dónde:

$s_{y/x}$ = desviación estándar de los residuos en las rectas de calibrado

El desvío estándar de los compuestos residuales se calculó a partir de la fórmula descripta en la ecuación 2.

$$S_o = \frac{s_{y/x}}{b_1} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

ecuación (2)

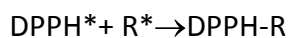
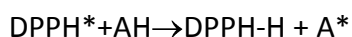
Dónde:

b_1 : Pendiente de la recta de calibrado; N: Número de patrones de calibrado; x_i : Cada una de las concentraciones de patrones calibrados, m: número de réplicas de cada

patrón de calibrado (n=3); \bar{x} : Media de las concentraciones de los patrones de calibrado.

3.6. Evaluación de la actividad antioxidante del EAB

La capacidad anti-rradical libre o antioxidante del EAB fue determinada usando el radical 2,2-difenil -1-picril hidracilo (DPPH*) como indicador de actividad. Este radical tiene un electrón desapareado y en solución metanólica es de color azul-violeta, decolorándose hacia el amarillo pálido al reaccionar con una sustancia antioxidante (**Fig. 6**). En su forma estable el radical absorbe a una longitud de onda de 515 nm. Al ser reducido por un antioxidante (AH) u otra especie radical R*, la absorbancia a esta longitud de onda desaparece por el cambio de color. De esta forma, la evolución de la reacción redox puede monitorearse por la disminución en la medida de la absorbancia a 515 nm. Las reacciones químicas Redox características del proceso de inhibición de radical DPPH* se presentan a continuación:



La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó siguiendo el protocolo de Brand-Willams y col. (1995). La técnica se basa en dejar reaccionar los compuestos con supuesta actividad antioxidante con el radical DPPH* en solución metanólica. La inhibición del radical libre se cuantifica a través de la medida de la absorbancia a 515 nm.

3.6.1. Procedimiento desarrollado para la determinación de la actividad antioxidante del EAB

La evaluación de la capacidad antioxidante del EAB se llevó a cabo empleando 2 g del material liofilizado. El mismo fue diluído con agua estéril hasta 10 ml (concentración final 200 mg/ml) y a partir de allí se preparó una dilución 1/100 que constituyó la solución de trabajo (2 mg/ml).

Como control positivo se utilizó el ácido clorogénico (0,3 mg/ml) en una dilución 1/100 (0,003 mg/ml).

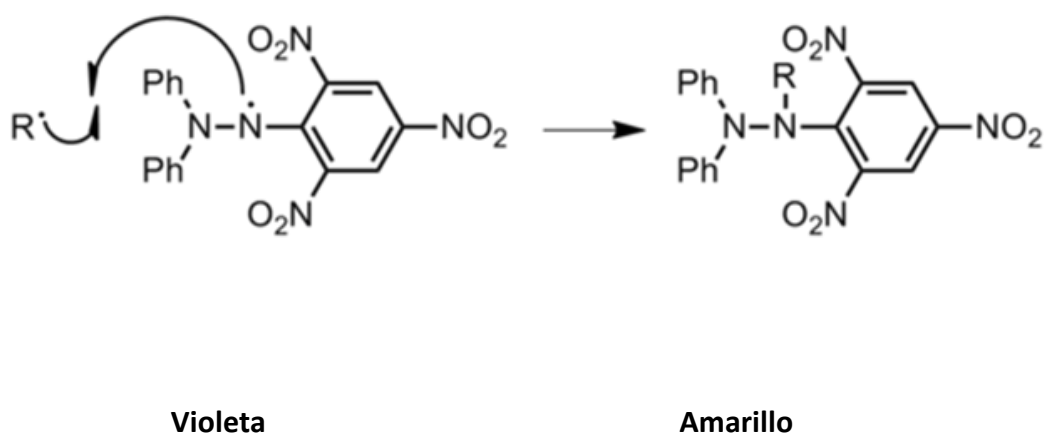


Fig. 5. Descripción de la reacción química de inhibición del radical DPPH*

Las curvas de Inhibición se prepararon utilizando diluciones de la solución de trabajo de EAB y del ácido clorogénico (1/100) en agua destilada agregando volúmenes crecientes hasta alcanzar un volumen final de 1 ml, según se describe en la **Tabla 9**.

Las reacciones de inhibición se prepararon en un volumen final de 3 ml, mezclando 2 ml de una solución 40 ppm del radical DPPH* en metanol y 1 ml de la solución de antioxidante (preparada según se describe en la **Tabla 9**). Para el blanco patrón de referencia (0% de inhibición) se utilizó 1 ml de metanol con 2 ml del DPPH*. La mezcla se incubó 90 min a efectos de permitir el desarrollo de la reacción (cambio de color púrpura al amarillo).

Tabla 9. Concentración del EAB y del ácido clorogénico en la solución antioxidante usada en las reacciones de inhibición (expresada en µg/ml)

| Volumen Incorporado¹ | 25 µl | 40 µl | 50 µl | 55 µl | 75 µL | 80 µl | 100 µl |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| Ácido clorogénico µg/ml | 0,075 | 0,120 | 0,150 | 0,165 | 0,225 | 0,240 | 0,300 |
| EAB µg/ml | 50 | 80 | 100 | 110 | 150 | - | - |

¹Corresponde a la cantidad incorporada en el volumen final de 1 ml usado como solución antioxidante

Transcurrido este período se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm en espectrofotómetro UV-VIS (Shimadzu UV mini-1240, Kyoto, Japón). Con los valores de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de inhibición o captación de radicales (%) a partir de la medida de absorbancia de la reacción de acuerdo a la fórmula propuesta por Kulisic y col. (2004), la que se reproduce en la ecuación 3.

$$\%I = \left[1 - \left(\frac{A_2 - A_3}{A_1} \right) \right] \times 100 \quad \text{ecuación (3)}$$

Dónde:

A_1 = Absorbancia del blanco patrón de referencia (0% de inhibición); A_2 = Absorbancia de la muestra; A_3 = Absorbancia del blanco de la muestra (sin DPPH*).

Sobre la base del valor de estos índices se estimaron los equivalentes de ácido clorogénico en el EAB.

La actividad antioxidante del EAB, se evaluó mediante el parámetro denominado Concentración Eficiente Cincuenta (CE_{50}) que resulta ser la concentración necesaria para alcanzar una inhibición del radical libre del 50%.

Los valores de CE_{50} para el ácido clorogénico y para el EAB se calcularon a partir de las rectas de regresión que vinculan el porcentaje de inhibición con la concentración de antioxidante incorporado a la mezcla de reacción. Sobre la base de los CE_{50} obtenidos en los dos casos, se estimaron los mg de ácido clorogénico equivalentes en el EAB. Los ensayos se realizaron por duplicado y en paralelo.

3.7. Cepas bacterianas seleccionadas para la realización del Ensayo de Ames

Para los ensayos de confirmación de los genotipos se usaron las cepas bacterianas *S. typhimurium* TA98 (cepa que detecta corrimiento de marco de lectura), TA100 y TA102 (cepas que detectan intercambio de pares de bases). La cepa TA102 fue utilizada a los efectos de verificar la presencia de la mutación $\Delta uvrB$, presente en las cepas TA98 y TA100 (mutación en el sistema de reparación por escisión), ya que esta

cepa (TA102) posee el sistema de reparación intacto (*uvrB*⁺) (acápite 3.8.). Para la evaluación de la toxicidad, mutagenicidad y antimutagenicidad se usaron las cepas bacterianas *S. typhimurium* TA98 y TA100. Las mismas fueron adquiridas en la empresa Moltox Molecular Toxicology Inc. (Booen, NC, EEUU) cuyos genotipos se describen en la **Tabla 5** (Maron y Ames, 1983).

Las cepas de *S. typhimurium* fueron remitidas por la empresa Moltox en pequeños discos liofilizados y refrigerados. Para la producción de los inóculos primarios, los discos se colocaron en 5 ml de medio de cultivo nutritivo (Nº2, Oxoid) los que se incubaron a 37°C durante 48 h a los efectos de obtener una densidad de $1-2 \times 10^9$ células/ml. Una vez obtenida esta población celular, la muestra se fraccionó en criotubos de 1 ml, tomando alícuotas de 90 µl e incorporando 910 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para la crio preservación de las muestras (Maron y Ames, 1983). El inóculo primario se conservó a -80°C.

La preparación de las placas maestras se realizó a partir del inóculo preservado de las cepas de *S. typhimurium* a -80°C. Para ello se tomó una muestra del material congelado empleando un ansa estéril y se sembró por agotamiento en superficie en placas con medio permisivo (conteniendo ampicilina), usado como presión de selección para garantizar la presencia del plásmido *pKM101* (cepas TA98 y TA100). Para la cepa 102 se utilizó medio permisivo conteniendo ampicilina y tetraciclina ($2,0 \times 10^{-3}$ g/L) utilizado como presión de selección para garantizar la presencia del plásmido *pKM101* y *pAQ1*, respectivamente. Las placas se incubaron 12-24 h a 37°C. Un vez crecidas, se tomaron 3 o 4 colonias las que se resuspendieron en 0,3 ml de

solución fisiológica y la suspensión se utilizó para realizar tres o cuatro estrías paralelas en medio permisivo con ampicilina o ampicilina y tetraciclina, dependiendo de la cepa utilizada. Estas placas se utilizaron para preparar los cultivos de trabajo, renovando las mismas cada dos meses (Maron y Ames, 1983).

3.8. Confirmación de las características genotípicas de las cepas de *S. typhimurium*.

Mutación *rfa*

La mutación *rfa* causa la pérdida parcial de la barrera de polisacáridos de la membrana bacteriana generando un fenotipo altamente rugoso para las colonias bacterianas. Esta mutación incrementa la permeabilidad de la pared celular favoreciendo la detección de mutágenos (Maron y Ames, 1983).

La presencia de la mutación *rfa* fue confirmada mediante el ensayo de sensibilidad al “cristal violeta” en placas con medio nutritivo (Ames y col., 1973). Se colocó 0,1ml de un cultivo bacteriano de la noche (overnight) en un tubo con 2,50 ml de agar blando, luego se sembró en la placa de agar nutritivo . Cuando el agar se solidificó un poco, se colocó un pequeño filtro estéril conteniendo “cristal violeta” en el centro de la placa y se incubó en estufa a 37°C durante 24 h.. Luego se procedió a la observación de las placas:

Si la cepa posee la mutación *rfa* se observa alrededor del filtro una zona clara de inhibición que indica muerte celular (**Fig. 7**).

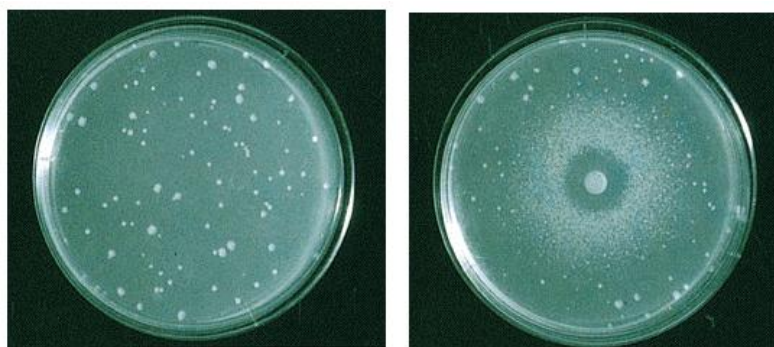


Fig. 6. Fotografía de placas con las cepas de *S. typhimurium*, donde se observa una placa con colonias normales y una placa con la zona clara formada alrededor del filtro, conteniendo “cristal violeta”.

Mutación $\Delta uvrB$

El gen *uvrB* forma parte del operón *uvr* que interviene en el mecanismo de reparación por escisión. La presencia de la mutación en las cepas fue confirmada a través de la sensibilidad a la luz ultravioleta (UV) (Ames y col., 1973).

Se realizaron estrías paralelas a partir de cultivos saturados ($1-2 \times 10^9$ células/ml) de las cepas TA98, TA100 (cepas *uvrB*⁻) y la cepa TA102 (cepa *uvrB*⁺) en agar de medio permisivo. Para la selección de la cepa testigo TA102 *uvrB*⁺ se utilizó medio permisivo conteniendo tetraciclina $2,0 \times 10^{-3}$ g/L. La placa, con las tres estrías representadas por cada cepa bacteriana (TA98, TA100, TA102) se expuso bajo lámpara germicida durante 30 seg (15 V) a una distancia de 33 cm, tapando transversalmente la mitad de la placa con papel aluminio para que sólo una parte quedara expuesta a la radiación. Luego se incubó en oscuridad a 37°C durante 24 a 48 h. Se pudo observar claramente la muerte de las colonias correspondientes a las cepas TA100 y TA98 (cepas defectuosas *uvrB*⁻) mientras que la cepa TA102 (*uvrB*⁺)

reparó el daño en el ADN bacteriano producido por las radiaciones UV, evidenciado por falta de pérdida de viabilidad.

3.9. Evaluación del efecto tóxico del EAB y del ácido clorogénico frente a las cepas de *S. typhimurium*

Se evaluó el efecto tóxico del EAB utilizando el Ensayo de Ames con las cepas TA98 y TA100 mediante dos metodologías: ensayo de incorporación en placa y pre-incubación con y sin activación metabólica.

El efecto tóxico del ácido clorogénico se evaluó empleando el método de pre-incubación con y sin activación metabólica.

3.9.1. Evaluación del efecto tóxico del EAB mediante el ensayo de incorporación en placa

Para el ensayo de la viabilidad bacteriana se prepararon diluciones seriadas partiendo de un cultivo de la noche (overnight) (16-20hs) de las cepas testigo seleccionadas (TA98 y TA100) de modo de obtener un factor de dilución de $1/10^5$.

En un tubo conteniendo 2,5 ml de agar blando fundido y mantenido a 45°C se agregaron: 0,1 ml de la dilución bacteriana, 0,5 ml de mezcla S9 o 0,5 ml de solución tampón de fosfatos 0,2 M. Seguidamente se agregaron 5,0 o 50,0 µl del EAB a efectos de arribar a una concentración final del mismo de 1,0 y 10,0 mg/placa. El control negativo se realizó reemplazando el EAB por DMSO. Las mezclas se agitaron mediante vortex y se sembró en forma directa sobre placas de agar nutritivo. Las mismas se incubaron a 37°C durante 48 h. Luego se procedió al conteo y cálculo de las unidades formadoras de colonias (UFC/ml).

3.9.2. Evaluación del efecto tóxico del EAB mediante el método de pre-incubación

Para el ensayo de viabilidad por el método de pre-incubación se prepararon diluciones seriadas de un cultivo de la noche (overnight) de las cepas testigo seleccionadas (TA98 y TA100) de modo de obtener un factor de dilución de $1/10^5$.

Seguidamente, 0,1 ml de la dilución bacteriana se mezclaron con 0,5 ml de mezcla S9 ó 0,5 ml de buffer fosfato 0,2 M. Luego se agregaron 5,0 ó 50,0 μ l del EAB a efectos de arribar a una concentración final de 1,0 y 10,0 mg/placa. La mezcla se llevó a un volumen final de 700 μ l con agua destilada estéril y se incubó durante 1 h a 37°C. Al finalizar este tiempo, la mezcla en su totalidad ($V_f=700 \mu$ l) se incorporó a 2,5 ml de agar blando fundido (45°C) y se sembró en placas conteniendo medio nutritivo, las cuales se incubaron a 37°C durante 48 h. Luego se procedió al conteo y cálculo de las unidades formadoras de colonias (UFC/ml). El control negativo se realizó reemplazando el EAB por DMSO.

La toxicidad también fue evaluada rutinariamente en cada ensayo por observación visual directa del fondo bacteriano en las placas con medio selectivo antes de que se consuman las trazas de histidina según lo recomendado (Verschaeve y Van Staden, 2008).

3.9.3. Evaluación del efecto tóxico del ácido clorogénico mediante el método de pre-incubación

Para analizar la toxicidad del ácido clorogénico frente a las cepas de *S. typhimurium* (TA98 y TA100) se utilizó el método de pre-incubación, con y sin activación metabólica.

Se preparó una solución madre (con agua destilada) de ácido clorogénico de 10 mg/ml y se sembraron 5 y 50 µl/placa, para arribar a una concentración final de 0,05 y 0,50 mg/placa. Se siguió la metodología descrita en el punto 3.9.2 remplazando el EAB por ácido clorogénico.

3.10. Ensayos de mutagenicidad del EAB y del ácido clorogénico

3.10.1. Mutagenicidad del EAB

La evaluación de la posible mutagenicidad del EAB se realizó mediante el Ensayo de Ames (Maron y Ames, 1983), utilizando las cepas TA100 y TA98, con y sin activación metabólica. Se desarrollaron dos métodos: el método de incorporación en placa y el método modificado de pre-incubación.

Ensayo de incorporación en placa

Para el desarrollo de éste método, se siguió el siguiente procedimiento: en tubos conteniendo 2,5 ml de agar blando (a 45°C), L-histidina HCL – D- biotina (0,5 mM – 0,5 mM) se adicionó 0,1 ml de un cultivo de toda la noche (overnight) de las cepas testigo seleccionadas (TA98 o TA100) y 0,5 ml de mezcla S9 (ensayos con activación metabólica) o buffer fosfato pH 7,4 (ensayos sin activación metabólica). Seguidamente se agregaron 5,0 ó 50,0 µl de EAB para lograr una concentración final de 1,0 y 10,0 mg/placa respectivamente. Esta mezcla se homogeneizó mediante vortex y se sembró en placas con medio mínimo, incubándose a 37°C durante 48 h. Luego se procedió al conteo de las colonias revertantes *his*⁺.

En todos los ensayos se realizaron los controles negativos sin el agregado de extracto (revertantes espontáneas). Como controles positivos y de acuerdo a las

condiciones del ensayo, se realizaron las curvas dosis respuesta de los mutágenos diagnóstico que se indican en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Dosis y condiciones usadas para los mutágenos empleados como controles positivos en los distintos ensayos

| Cepa | Mutágeno | Dosis $\mu\text{g/placa}$ | Activación Metabólica |
|-------|----------|---------------------------|-----------------------|
| TA98 | 2- NF | 0,25; 0,50; 1,25; 2,50 | NO |
| | 2- AF | 0,25; 0,50; 1,25; 2,50 | SI |
| TA100 | AZS | 0,50; 2,50; 5,00 | NO |
| | 2-AF | 0,25; 0,50; 1,25; 2,50 | SI |

Ensayo de pre-incubación

Para la realización del ensayo con pre-incubación se siguió el protocolo sugerido por Mortelmans y Zeiger (2000) y Yen y col. (2001) con modificaciones menores. Se preparó una mezcla de pre-incubación con 0,1 ml de un cultivo (overnight) (TA98 o TA100), 0,5 ml de mezcla S9 o buffer fosfato pH 7,4 (con y sin activación metabólica respectivamente). Seguidamente se agregó 5,0 o 50,0 μl de EAB para arribar a una concentración final de 1,0 y 10,0 mg/placa respectivamente. El volumen final se ajustó en 700 μl con agua estéril ó DMSO. Después de incubar en estufa a 37°C durante 1 h (sin agitación), el total de la mezcla de incubación ($V_f=700 \mu\text{l}$) se agregó a un tubo con 2,5 ml de agar blando, conteniendo L-histidina HCl – D-biotina (0,5 mM – 0,5 mM), se homogenizó en vortex y luego se vertió en placas conteniendo medio mínimo.

Después de incubar a 37°C durante 48 h se procedió al conteo de las colonias revertantes *his*⁺.

En las mismas condiciones se analizó la respuesta de los mutágenos diagnósticos usados como controles positivos que se indicaron en el punto anterior (ver **Tabla 10**), incluyéndose también el control negativo sin el agregado de extracto (revertantes espontáneas).

Se consideró mutagénico cuando el valor de las revertantes inducidas por el EAB, resultó el doble del valor obtenido con el control negativo (revertantes espontáneas).

Los ensayos se realizaron por duplicado y los datos fueron expresados como el valor medio \pm desviación estándar de la media correspondiente al número de colonias por triplicado.

3.10.2. Mutagenicidad del ácido clorogénico

La evaluación de la mutagenicidad del ácido clorogénico, se realizó con las cepas TA100 y TA98 empleando el método de incorporación en placa y el método de pre-incubación de forma similar a la descrita para el EAB.

Para su desarrollo se preparó una solución acuosa de 10,0 mg/ml de ácido clorogénico y se sembraron 5 y 50 μ l para arribar a una concentración final de 0,05 y 0,50 mg/placa (en placas de medio mínimo). Asimismo, se realizaron los controles negativos correspondientes a las revertantes espontáneas sin ácido clorogénico así como los controles positivos que se corresponden con los referidos en la **Tabla 10**.

Se siguió la metodología descrita (método de incorporación en placa y pre-incubación) en el punto 3.10.1 reemplazando el EAB por el ácido clorogénico.

Los ensayos se realizaron por duplicado y los datos fueron expresados como el valor medio \pm desviación estándar de la media correspondiente al número de colonias por triplicado.

3.11. Evaluación de los efectos antimutagénicos del EAB y del ácido clorogénico

3.11.1. Antimutagenicidad del EAB

La evaluación de la posible antimutagenicidad del EAB se realizó mediante el Ensayo de Ames (Maron y Ames, 1983). Se utilizaron dos métodos: el de incorporación en placa y el de pre-incubación.

Método de incorporación en placa

La evaluación de la posible capacidad antimutagénica del EAB se realizó empleando los mutágenos indicados en la **Tabla 10** a las concentraciones y en las condiciones indicadas en dicha Tabla.

Para el ensayo de incorporación en placa se siguió el siguiente protocolo: 0,1 ml de un cultivo (overnight) de *S. typhimurium* TA98 y TA100, se co-incubaron con las diferentes concentraciones de los mutágenos diagnóstico descritos en la **Tabla 10** y con 5,0 y 50,0 μ l de EAB para alcanzar una concentración de 1,0 y 10,0 mg/placa. Seguidamente se incorporaron 0,5 ml de mezcla S9 ó buffer fosfato pH=7,4 (con y sin activación metabólica). La mezcla se agregó a 2,5 ml agar blando fundido (45°C) conteniendo L-histidina HCL- D-biotina (0,5 mM – 0,5 mM). La mezcla se homogenizó mediante vortex y se sembró en placas con medio mínimo,

incubándose a 37°C durante 48h. Luego se procedió al conteo de las colonias revertantes *his*⁺.

Para cada condición se incorporaron los controles negativos (Revertantes espontáneas y revertantes espontáneas con el agregado de EAB (Control negativo de la muestra).

Los controles positivos consistieron en las curvas de dosis -respuesta de los mutágenos descriptos en la **Tabla 10** los que corresponden al 100% de mutagenicidad de cada concentración.

Método de pre-incubación

Para realizar el ensayo con el método de pre-incubación se preparó una mezcla con 0,1 ml de un cultivo de la noche (overnight) (TA98 ó TA100) co-incubado con las diferentes concentraciones de los mutágenos diagnóstico descriptos (**Tabla 10**) y con 0,5 ml de mezcla S9 o buffer fosfato pH 7.4 (con y sin activación metabólica). Seguidamente se agregaron 5,0 ó 50,0 µl de EAB para arribar a una concentración final de 1,0 y 10,0 mg/placa respectivamente. El volumen final se ajustó en 700 µl con agua estéril o DMSO y se mezcló mediante vortex. Después de incubar en estufa a 37°C durante 1 h (sin agitación), el total de la mezcla de incubación ($V_f=700$ µl) se agregó a un tubo con 2,50 ml de agar blando, conteniendo L-histidina HCl- D-biotina (0,5 mM – 0,5 mM), y se sembró en placas conteniendo medio mínimo (Maron y Ames, 1983). Los controles positivos y negativos fueron los descriptos en el método de incorporación en placa. En paralelo se realizaron las curvas de dosis-respuesta con los mutágenos en el rango de concentración presentado en la **Tabla**

10 y las cepas correspondientes a los efectos de determinar el número de revertantes por placa, como referencia del 100% de actividad mutagénica. Los ensayos se realizaron por duplicado y los datos fueron expresados como el valor medio \pm desviación estándar de la media correspondiente al número de colonias por triplicado de las placas. Un esquema general del procedimiento se presenta en la Fig. 8.

3.11.2. Antimutagenicidad del ácido clorogénico

La evaluación de la antimutagenicidad del ácido clorogénico se realizó empleando solamente el método de pre-incubación. Se seleccionó este método, debido a su mayor sensibilidad informada en estudios previos de antimutagenicidad encontrados en bibliografía internacional (Matsushima y col., 1980). A su vez se eligió la mayor concentración de los mutágenos ensayados, a efectos de comparar la actividad antimutagénica del ácido clorogénico con el equivalente del ácido clorogénico presente en el EAB (10,0 mg/placa). Se seleccionaron dos concentraciones: una concentración de ácido clorogénico (0,10 mg/placa), valor determinado por el método de HPLC (acápite 4.1.1) y otra concentración cinco veces mayor (0,50 mg/placa).

Para su desarrollo se preparó una solución acuosa de 2 mg/ml de ácido clorogénico y se sembraron 50 μ l/placa para arribar a una concentración final de 0,10 mg/placa y una solución acuosa de 10 mg/ml de ácido clorogénico para arribar a una concentración final de 0,50 mg/placa. Se siguió la metodología descrita en el punto 3.11.1 (Método de pre-incubación) reemplazando el EAB por el ácido clorogénico.

Se utilizaron los mutágenos 2-nitrofluoreno, 2-aminofluoreno y azida sódica en una única concentración de 2,5 µg/placa.

Los ensayos se realizaron por duplicado y los datos fueron expresados como el valor medio \pm desviación estándar de la media correspondiente al número de colonias por triplicado.

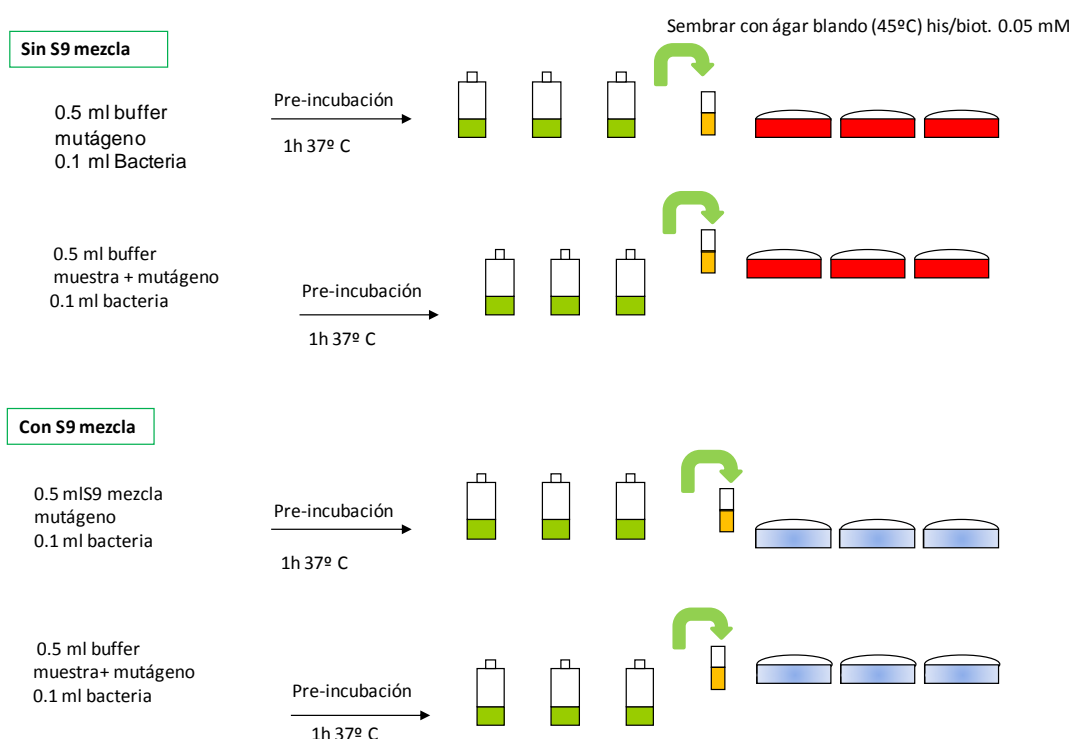


Fig. 7. Diseño experimental general del método de pre-incubación

3.12. Cálculo de la capacidad antimutagénica: Índice de inhibición

La inhibición de la actividad mutagénica inducida por los mutágenos diagnósticos en presencia de EAB y ácido clorgénico fue calculada mediante la ecuación 4, fórmula propuesta por Pedreschi y Cisneros-Zevallos (2006) y Cariño-Cortés y col. (2007).

$$\% \text{Inhibición} = 100 \times \left[1 - \left(\frac{\text{muestra} + \text{mutágeno} - \text{muestra}}{\text{mutágeno} - \text{control negativo}} \right) \right] \quad \text{ecuación (4)}$$

Dónde:

Muestra + mutágeno: corresponde a las revertantes/placa hallados en los experimentos realizados con EAB o ácido clorogénico en presencia de mutágeno.

Muestra: corresponde a las revertantes/placa hallados en los experimentos realizados empleando EAB o ácido clorogénico sin mutágeno.

Mutágeno: corresponde a las revertantes/placa con mutágeno sólo.

Control negativo: corresponde a los revertantes espontaneas.

La mutagenicidad inducida por cada mutágeno diagnóstico en ausencia de las muestras fue definida como 100%.

El error del porcentaje de inhibición (%I) de la antimutagénesis se realizó aplicando el análisis de la propagación del error según lo propuesto por Himmelblau (1970).

3.13. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante análisis de varianza ANOVA, y ensayo de "t" de Student (utilizando el programa estadístico SYSTAT 12.0), considerando como resultado positivo al doble del número de revertantes/placa en relación a las placas control. El nivel de significancia seleccionado fue de $p < 0,05$ y $p < 0,01$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización química, tóxica y mutagénica del EAB

4.1.1. Determinación de polifenoles en el EAB por cromatografía líquida de fase inversa RP-HPLC

Para la identificación de los polifenoles presentes en el EAB se utilizaron como estándares ácido clorogénico, rutina, kaempferol, ácido cafeico y quercetina. De acuerdo a las curvas de calibración realizadas, el límite de detección del método empleado para el ácido clorogénico, rutina, kaempferol, ácido cafeico y quercetina fue de 0,0024, 0,0019, 0,0026, 0,0035 y 0,0047 mg/ml, respectivamente.

En la **Fig. 9** se puede observar el cromatograma obtenido del análisis del EAB. De acuerdo con el tiempo de retención y el correspondiente espectro UV-vis de los picos observados comparado con los estándares utilizados sólo fue posible identificar uno de los picos que muestra correspondencia con el pico característico del ácido clorogénico. Ninguno de los otros picos observados coincidió con los tiempos de retención o el espectro de los estándares puros utilizados. Los picos no identificados, podrían corresponder a compuestos derivados del ácido clorogénico según fuera publicado oportunamente (Palacios y col., 1999).

Con el objeto de cuantificar al ácido clorogénico identificado en el EAB se realizó la curva de calibración de este compuesto, cuantificación que se presenta en la **Tabla 11**. A partir de la curva de calibración del ácido clorogénico, se calculó el valor de ácido clorogénico por ml de EAB, la que resultó ser de $2,05 \pm 0,11$ mg/ml de EAB. Teniendo en cuenta la concentración inicial usada (2 mg/ml), este valor indicaría

que el contenido de ácido clorogénico sería 1mg por cada 100 mg de material seco (1%).

Como se observa en la **Fig. 9**, hay diversos picos que no han sido identificados. Teniendo en cuenta el área de éstos picos, el ácido clorogénico aportaría el 25% de la absorbancia total analizada.

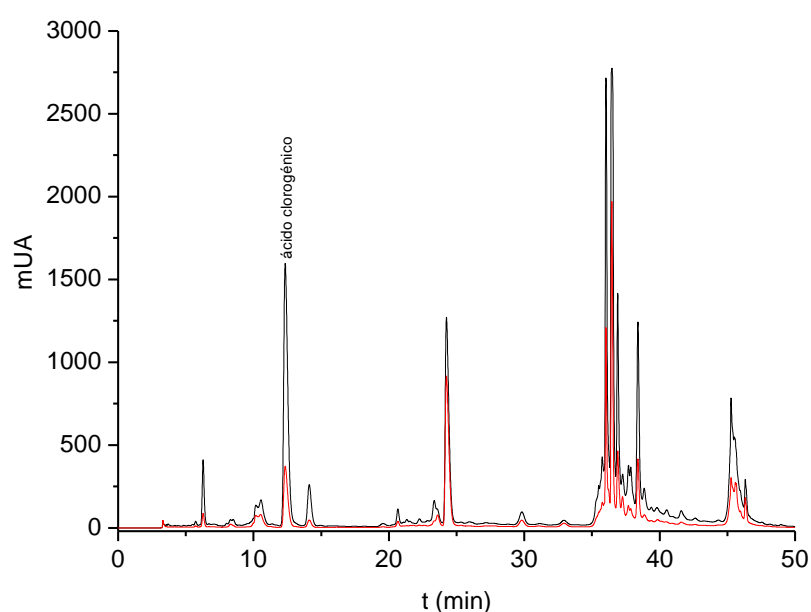


Fig.8. Cromatograma del EAB. La corrida fue realizada a 330 nm (líneas negras) y 360 nm (líneas rojas)

De acuerdo a los resultados de la curva de calibración se estimó un límite de detección (LOD) para este compuesto de 0,024 mg/ml y un límite de cuantificación (LOQ) de 0,073 mg/ml.

Otro punto importante a considerar en la caracterización del EAB fue evaluar su actividad antioxidante y considerando que el ácido clorogénico constituye el

principal polifenol presente en el EAB, también se realizaron estudios tendientes a evaluar la actividad antioxidante del compuesto.

Tabla 11. Ecuación de regresión obtenida para el ácido clorogénico

| Compuesto | Ecuación de regresión | R ² | DS | N |
|-------------------|---|----------------|-----|----|
| Ácido clorogénico | $y = (38647 \pm 1173)x - (194 \pm 149)$ | 0,995 | 231 | 11 |

R²: coeficiente de determinación, DS Desviación estándar, N: número de muestras utilizadas en la regresión

4.1.2. Evaluación de la actividad antioxidante del EAB y del ácido clorogénico

Se evaluó la actividad antioxidante del EAB y del ácido clorogénico mediante la cuantificación de la inhibición del radical DPPH* (radical 2,2-difenil -1-picril hidracilo).

El método DPPH* evalúa la capacidad antioxidante de cualquier compuesto capaz de atrapar radicales libres.

En las **Figuras 10 y 11** se muestran los porcentajes de inhibición (%) de captación de radicales libres del DPPH*, en función de la concentración de EAB y de ácido clorogénico, respectivamente.

La ecuación de regresión correspondiente al %I del radical libre DPPH* para el EAB fue $y = 0,507x - 1,6146$ con coeficiente de determinación $R^2 = 0,9906$, donde x es la concentración del EAB en µg/ml. Puede observarse que en el rango de concentración estudiada (50- 150 µg/ml) el %I se encuentra entre 24,5% y 76,1% (**Fig. 10**).

La ecuación de regresión correspondiente al %I del radical libre DPPH* para el ácido clorogénico fue $y = 220,1x - 9,3555$ con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9363$, donde x es la concentración del ácido clorogénico expresada en $\mu\text{g/ml}$.

A partir de estas rectas de regresión, entrando con %I de 50%, se puede estimar el valor de CE_{50} .

Una manera de informar el poder antioxidante en los extractos naturales es a través de la concentración eficiente (CE_{50}). Sin embargo, ésta no ha sido aún estandarizada, utilizándose frecuentemente la actividad antioxidante de compuestos puros como valor de referencia.

En nuestro ensayo, la determinación de la capacidad antioxidante tomó como patrón de referencia al ácido clorogénico. Este estudio mostró un valor de CE_{50} de 101,86 $\mu\text{g/ml}$ y de 0,269 $\mu\text{g/ml}$ para el EAB y para el ácido clorogénico, respectivamente.

El valor de la CE_{50} del ácido clorogénico frente al DPPH* resultó ser menor que la obtenida para el EAB lo que indica que se requiere una concentración menor de ácido clorogénico para lograr el 50% de la eficiencia inhibitoria.

Estos resultados indican claramente que el EAB presenta una marcada actividad antioxidante respaldada por otros estudios informados en la bibliografía internacional, empleando ésta y otras variedades del género *Baccharis*, aspecto, relevante para su caracterización desde el punto de vista de su actividad biológica.

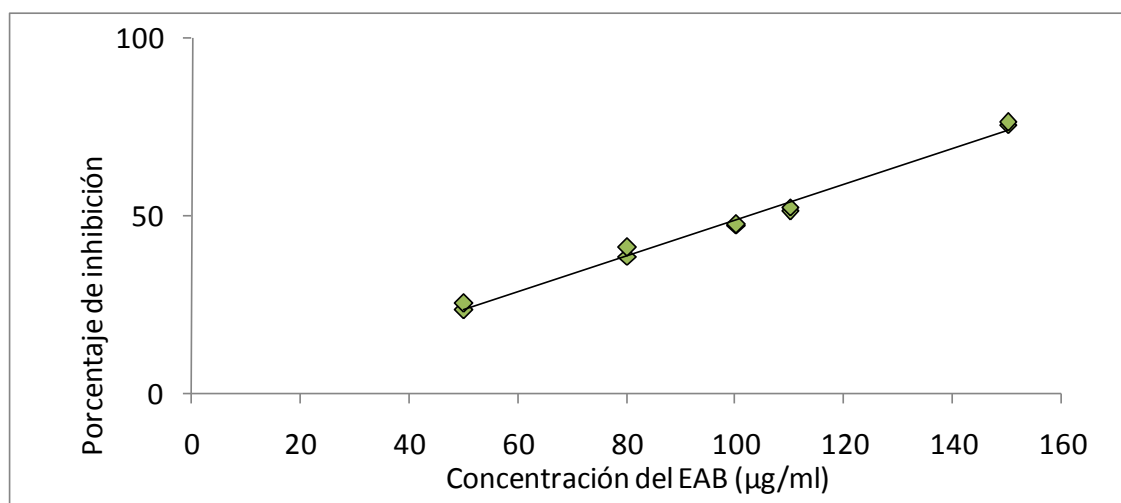


Fig. 9. Porcentajes de inhibición del radical libre DPPH* en función de la concentración del EAB.

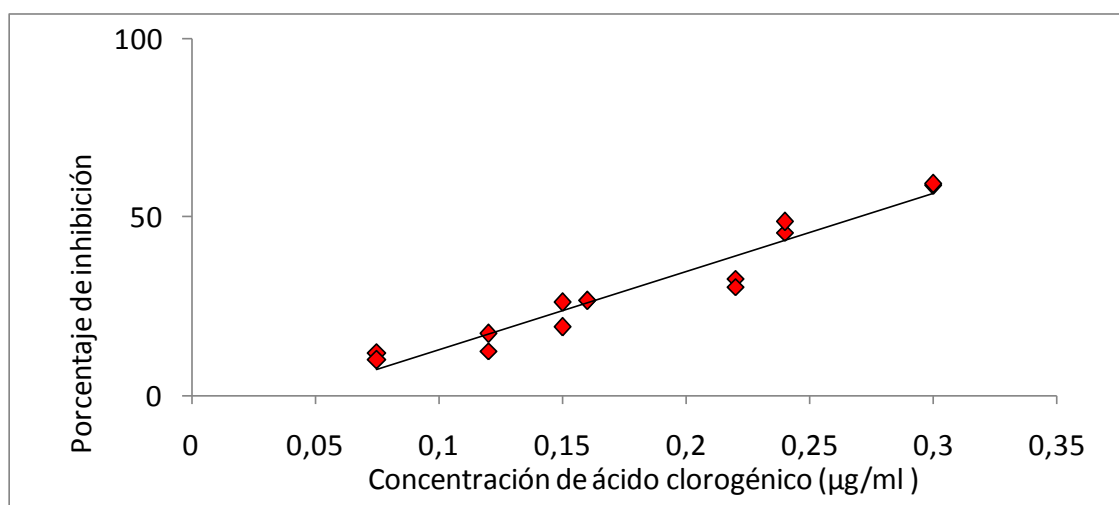


Fig. 10. Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH* en función de la concentración de ácido clorogénico

Sin embargo, otros aspectos deben ser igualmente evaluados para profundizar su caracterización. Entre éstos, la toxicidad y la mutagenicidad del EAB y del ácido

clorogénico (polifenol mayoritario del EAB) utilizando el Ensayo de Ames como modelo experimental, resultan ser relevantes en este sentido y cuyos resultados se presentan en los acápites siguientes.

4.1.3. Evaluación de la toxicidad del EAB y del ácido clorogénico utilizando el Ensayo de Ames

La viabilidad de las cepas de *S. typhimurium* en presencia del EAB, así como en presencia del ácido clorogénico resultan imprescindibles de ser evaluadas y determinadas en una etapa previa a la evaluación de la mutagenicidad y la antimutagenicidad de los mismos empleando el Ensayo de Ames. Este estudio previo tiene como finalidad seleccionar el rango de concentraciones del EAB y del ácido clorogénico que no presenten un efecto tóxico sobre las cepas blanco. Se debe tener en cuenta que si el compuesto en estudio es levemente mutagénico, pero altamente tóxico, debe encontrarse un rango de concentraciones en la cual la potencial mutagenicidad no quede enmascarado por la toxicidad de los compuestos en estudio (Maron y Ames, 1983). Del mismo modo, resulta importante evaluar la toxicidad de los mismos sobre las cepas de *S. typhimurium* debido a que la toxicidad podría confundirse o enmascarar un posible efecto antimutagénico ejercido por el EAB o el ácido clorogénico, o ambos, en los ensayos de antimutagenicidad.

En la **Tabla 12** se presentan los recuentos de colonias viables de *S. typhimurium* luego del tratamiento con el EAB utilizando el Ensayo de Ames como modelo experimental, con los métodos de incorporación en placa y pre-incubación. Para el

ácido clorogénico, específicamente, se ensayó el efecto tóxico empleando solamente el método de pre-incubación (**Tabla 13**).

Los resultados obtenidos (**Tabla 12**) indican que no se observaron diferencias significativas en la viabilidad de las cepas TA98 y TA100 luego del tratamiento con el EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) en relación a los respectivos controles ($p > 0,05$). Tampoco se observaron diferencias significativas en la viabilidad independientemente del método ensayado (incorporación en placa o pre-incubación).

El análisis de la viabilidad después del tratamiento con ácido clorogénico en el rango de concentraciones estudiadas (0,05 y 0,50 mg/placa) sobre las cepas TA98 y TA100 no mostró diferencias significativas respecto a los controles ($p > 0,05$) (**Tabla 13**).

Los resultados encontrados demuestran que tanto el EAB como el ácido clorogénico en el rango de concentraciones seleccionadas no resultaron ser tóxicos para las cepas de *S. typhimurium* TA98 y TA100.

Tabla 12. Ensayo de toxicidad del EAB para las cepas TA100 y TA98 utilizando los métodos de incorporación en placa y pre-incubación

| Método de Incorporación en placa Recuentos de colonias de <i>S. typhimurium</i> (UFC/ml x 10 ⁶) | | |
|--|-----------|------------|
| EAB (mg/placa) | Cepa TA98 | Cepa TA100 |
| 0,0 | 28±4 | 380±15 |
| 1,0 | 30±3 | 393±8 |
| 10,0 | 29±5 | 382±5 |
| Método de Pre-incubación Recuentos de colonias de <i>S. typhimurium</i> (UFC/ml x 10 ⁶) | | |
| 0,0 | 32±5 | 398±10 |
| 1,0 | 27±8 | 377±10 |
| 10,0 | 33±5 | 409±15 |

Los resultados son la media ± DS, n= 6

Tabla 13. Ensayo de toxicidad del ácido clorogénico para las cepas TA100 y TA98 utilizando el método de pre-incubación

| Método de Pre-incubación Recuentos de colonias <i>S. typhimurium</i> (UFC/ml x 10 ⁶) | | |
|---|------|--------|
| Ácido clorogénico mg/placa | TA98 | TA100 |
| 0,00 | 37±6 | 403±9 |
| 0,05 | 42±8 | 387±12 |
| 0,50 | 38±4 | 399±14 |

Los resultados son la media ± DS, n= 6 resultados

4.1.4. Evaluación del efecto mutagénico del EAB y del ácido clorogénico mediante el Ensayo de Ames

El siguiente paso fue determinar el posible efecto mutagénico del EAB y del ácido clorogénico. Para estos ensayos se utilizó un rango de concentración final de 1,0 y 10,0 mg/placa para el EAB y de 0,05 y 0,50 mg/placa para el ácido clorogénico.

Los controles positivos empleados corresponden a los presentados en la **Tabla 10** (Acápite 3.10.de Materiales y Métodos). Las **Tablas 14 y 15** presentan los resultados encontrados en los ensayos de mutagenicidad, para el EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) y el ácido clorogénico (0,05 y 0,50 mg/placa), respectivamente.

Los controles negativos (revertantes espontáneas *his*⁺) respondieron a los rangos establecidos para el Ensayo de Ames (**Tabla 5**, acápite 1.12. de Materiales y Métodos). Debe considerarse que cada laboratorio, presenta un rango propio de reversión de las colonias, el que es aceptado siempre y cuando sea repetible para cada ensayo realizado independientemente del xenobiótico empleado.

Los controles positivos se comportaron en todos los casos de acuerdo a lo esperado a los datos bibliográficos (Maron y Ames, 1983).

Los resultados obtenidos no indicaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de las revertantes espontáneas *his*⁺ (control negativo) de *S. typhimurium* y las obtenidas al incubar con 1,0 y 10,0 mg/placa del EAB para cada cepa estudiada con y sin activación metabólica ($p > 0,05$) (**Tabla 14**). También pudo observarse que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de

revertantes/placas dependientes de los métodos empleados (incorporación en placa o pre-incubación) ($p>0,05$).

En forma similar, para cada cepa estudiada, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las revertantes espontáneas *his*⁺ (control negativo) de *S. typhimurium* y las revertantes obtenidas al incubar con el ácido clorogénico con y sin activación metabólica (0,05 y 0,50 mg/placa) ($p>0,05$) (**Tabla 15**).

También se puede observar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas según el método (incorporación en placa o pre-incubación) ($p>0,05$).

Tabla 14. Evaluación de la mutagenicidad inducida por el EAB, utilizando el Ensayo de Ames, con las cepas TA98 y TA100 en los ensayos de incorporación en placa y pre-incubación.

| EAB Concentración | Incorporación en placa | | | | Pre-incubación | | | |
|---------------------------|------------------------|----------|------------|----------|----------------|---------|------------|----------|
| | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 |
| 0,0 mg/placa ^a | 21±5 | 37±5 | 183±15 | 216±58 | 24±2 | 46±8 | 219±22 | 179±12 |
| 1,0 mg/placa | 14±9 | 38±4 | 185±21 | 144±15 | 31±8 | 30±3 | 180,3±22 | 136±29 |
| 10,0 mg/placa | 19±4 | 32±6 | 185±12 | 175±18 | 28±2 | 30±3 | 208±11 | 151±31 |
| 2AF 2,5 µg/placa | | 2334±16* | | 2190±25* | | 2285±5* | | 1808±17* |
| 2NF 2,5 µg/placa | 865±104* | | | | 624±5* | | | |
| AZS 2,5 µg/placa | | | 2516±364* | | | | 2168±33* | |

+S9, con activación metabólica; -S9, sin activación metabólica; ^a, revertantes espontáneos;

*, revertantes inducidas (mutágenos) $p<0,05$.

Los resultados encontrados nos permiten concluir que en los rangos de concentraciones estudiados, tanto el EAB como el ácido clorogénico, no resultaron ser mutagénicos empleando el Ensayo de Ames.

Ello nos permitió continuar evaluando la posible capacidad antimutagénica del EAB y del ácido clorogénico frente a la mutagenicidad inducida por agentes de acción mutagénica reconocida.

Tabla 15. Evaluación de la mutagenicidad inducida por el ácido clorogénico utilizando el Ensayo de Ames con las cepas TA98 y TA100 en ensayos de incorporación en placa y pre-incubación

| Ácido clorogénico | Incorporación en placa | | | | Pre-incubación | | | |
|---------------------------|------------------------|----------|-----------|---------|----------------|----------|------------|-----------|
| | Cepa TA98 | | CepaTA100 | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 |
| 0,0 mg/placa ^a | 49±6 | 20±3 | 127±15 | 118±21 | 37±9 | 19±4 | 104±11 | 103±11 |
| 0,05 mg/placa | 47±6 | 17±3 | 137±26 | 105±10 | 40±5 | 19±5 | 106±3 | 104±10 |
| 0,50 mg/placa | 39±6 | 24±4 | 134±14 | 115±3 | 29±2 | 26,6±4 | 108±6 | 118±9 |
| 2AF 2,5 µg/placa | | 2788±94* | | 2190±5* | | 2046±50* | | 2329±440* |
| 2NF 2,5 µg/placa | 865±104* | | | | 624±5* | | | |
| AZS 2,5 µg/placa | | | 2516±364* | | | | 2168±3* | |

+S9, con activación metabólica; -S9, sin activación metabólica; ^a, revertantes espontáneas;*,revertantes inducidas (mutágenos) p<0,05.

4.2. Evaluación del efecto antimutagénico del EAB empleando el Ensayo de Ames

La evaluación de la capacidad antimutagenica del EAB se realizó empleando el Ensayo de Ames. Se utilizaron los métodos de incorporación en placa y pre-incubación con las cepas testigo *S. typhimurium* TA98 y TA100. Los mutágenos diagnósticos seleccionados fueron el 2-NF y la AZS (mutágenos de acción directa, sin empleo de activación metabólica) para las cepas TA98 y TA100, respectivamente, y el 2-AF (pro-mutágeno, con requerimiento de activación metabólica) para ambas cepas.

4.2.1. Ensayo sin activación metabólica

Cepa TA98. Mutágeno 2-NF. Método de incorporación en placa

En la **Fig. 12** se presentan los resultados obtenidos de las revertantes/placa de la cepa testigo TA98 inducidas por el mutágeno de acción directa 2-NF (rango de concentraciones 0,25-2,50 $\mu\text{g/placa}$). En la figura se incluyen las curvas dosis-respuesta correspondientes a los revertantes/placa de *S. typhimurium* cepa TA98, inducidas por el mutágeno 2-NF en presencia de EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) empleando el método directo de incorporación en placa.

En la **Tabla 16** se presenta el número de revertantes/placa (cepa TA98) inducidas por el mutágeno 2-NF en el rango de concentraciones 0,25-2,50 $\mu\text{g/placa}$ y el número de revertantes/placa obtenidas co-incubando el 2-NF con el extracto de EAB (1,0 y 10,0 mg/placa), utilizando el método de incorporación en placa. En la Tabla se incluyen los %I obtenidos por el EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) al co-incubar con el mutágeno 2-NF. El valor del %I se calculó empleando la ecuación 4 presentada en la sección Materiales y Métodos (acápito 3.12).

En la curva dosis-respuesta correspondiente al 2-NF (control diagnóstico) (**Fig. 12**) el número de revertante/placa aumenta en forma significativa a medida que se incrementa la concentración del mutágeno ($p < 0,05$). La co-incubación del mutágeno 2-NF en niveles de concentración de 0,25-2,50 $\mu\text{g/placa}$ con 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB produce un menor número de revertantes/placa que presentan diferencias significativas en comparación con el mutágeno diagnóstico ($p < 0,05$).

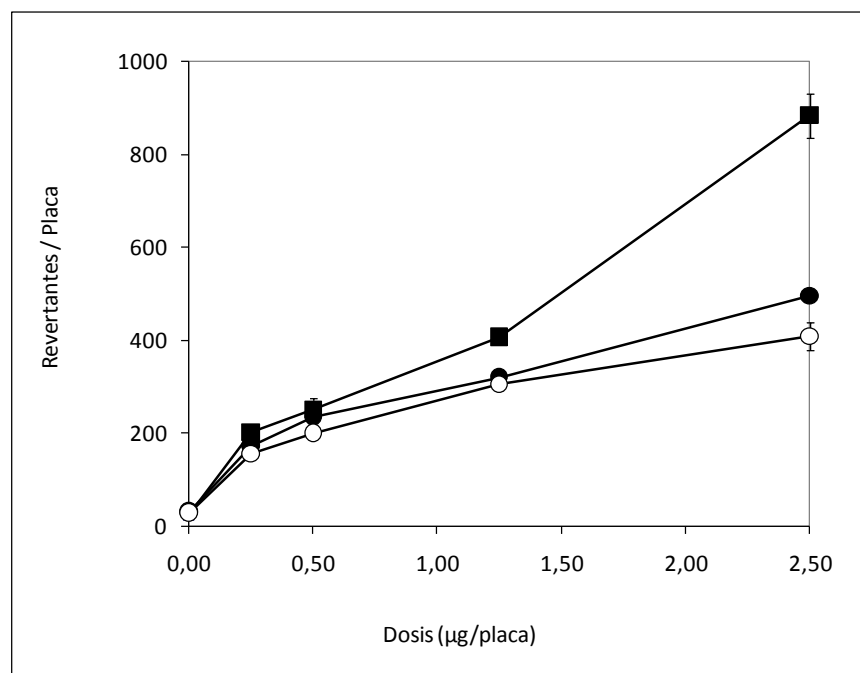


Fig. 11. Efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2-NF utilizando *S. typhimurium* cepa TA98 (método de incorporación en placa). ■, Revertantes/placa inducidas por 2-NF; ●, revertantes/placa inducidas por 2-NF en presencia de 1,0 mg/placa de EAB; ○, revertantes /placa inducidas por 2-NF en presencia de 10,0 mg/placa de EAB.

En la **Tabla 16** puede observarse que con el empleo de 1,0 mg/placa de EAB los % variaron desde $20,0 \pm 0,8$ al $46,0 \pm 4,4\%$ a medida que aumenta las concentraciones del mutágeno en el rango ensayado. Con la mayor concentración del EAB estudiada (10,0 mg/placa) los % estuvieron en el rango de $28,0 \pm 0,7$ a $56,5 \pm 4,0\%$ para las de concentraciones del mutágeno ensayado.

En esta condición (método de incorporación en placa) se pudo observar el efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el mutágeno de

acción directa 2-NF en la cepa TA98, el cual se acentuó cuando la concentración de EAB fue 10,0 mg/placa.

Tabla 16. Número de revertantes/placa de la cepa TA98 inducidas por 2-NF y revertantes/placa inducidas por 2-NF co-incubado con el EAB. %I de la mutagenicidad inducida por 2-NF en presencia de 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB (método de incorporación en placa).

| µg/placa 2-NF | Rev. / placa 2-NF | Rev. / placa 2-NF + EAB 1,0mg/placa | %I EAB 1,0mg/placa | Rev./ placa 2-NF+ EAB 10,0mg/placa | %I EAB 10,0mg/placa |
|------------------|----------------------|---|-----------------------|--|------------------------|
| 0,00 | 24±20 ^a | 31±20 | | 28±2 | |
| 0,25 | 207±10* | 172±12* | 20,0±0,8 | 155±10* | 28,0±0,7 |
| 0,50 | 280±16* | 225±10* | 23,0±2,6 | 200±10* | 24,0±2,4 |
| 1,25 | 507±30* | 320±10* | 41,0±0,4 | 304±13* | 43,0±0,4 |
| 2,50 | 885±48* | 495±30* | 46,0±4,4 | 408±30* | 56,5±4,0 |

%I, Porcentajes de inhibición del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2- NF;

^a, revertantes espontáneos. *, p<0,05

Cepa TA98. Mutágeno 2- NF. Método de pre-incubación

En la **Fig. 13** se presentan los resultados obtenidos de las revertantes/placa de la cepa testigo TA98 inducidas por el mutágeno de acción directa 2-NF (rango de concentraciones 0,25-2,50 µg/placa). En la figura se incluyen las curvas correspondientes a los revertantes/placa de la cepa TA98 inducidas por el

mutágeno 2-NF incubadas con EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) empleando el método de pre-incubación.

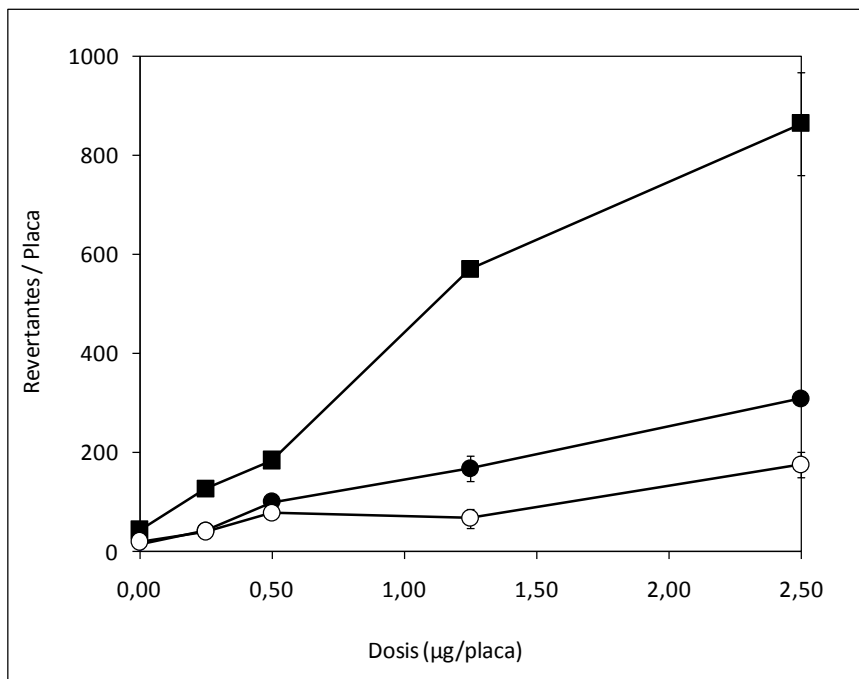


Fig. 12. Efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2-NF utilizando *S. typhimurium* cepa TA98 (método de pre-incubación). ■, revertantes/placa inducidas por 2-NF; ●, revertantes/placa inducidas por 2-NF en presencia de 1,0 mg/placa del EAB; ○, revertantes/placa inducidas por 2-NF en presencia de 10,0 mg/placa del EAB.

En la **Tabla 17** se presenta el número de revertantes/placa de la cepa TA98 inducidas por el mutágeno 2-NF en el rango de concentraciones testadas (0,25-2,50 µg/placa) y el número de revertantes/placa obtenidas al co-incubar el 2NF con el extracto de EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) utilizando el método de preincubación. En la Tabla se incluyen los %I de la mutagénesis inducida por el mutágeno 2-NF cuando se co-incuba con 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB.

De igual manera que en el ensayo de incorporación en placa, la curva dosis-respuesta del 2-NF presenta un número de revertante/placa que aumenta en forma estadísticamente significativa a medida que se incrementa la concentración de mutágeno.

La co-incubación del mutágeno 2-NF en las concentraciones mayores a 0,25 µg/placa con 1,0 y 10,0 mg/placa del EAB inducen un menor número de revertantes/placa que presentan diferencias estadísticamente significativas con el mutágeno diagnóstico ($p<0,05$).

En esta condición (método de pre-incubación) se puede observar el efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el mutágeno de acción directa 2-NF en la cepa TA98, el cual se acentúa cuando la concentración de EAB es 10,0 mg/placa.

Asimismo, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los valores de las revertantes/placa hallados, dependiendo del tratamiento con EAB (1,0 o 10,0 mg/placa) ($p<0,05$).

En la **Tabla 17** se observa que con el empleo de 1,0 mg/placa de EAB de %I variaron entre $60,0\pm1,4$ y $71,0\pm0,3\%$, en el rango de concentraciones del mutágeno ensayado.

Con la mayor concentración de EAB estudiada (10,0 mg/placa), los %I variaron entre $59,0\pm1,1$ y $91,0\pm0,4\%$, en el rango de concentraciones del mutágeno ensayado.

Tabla 17. Número de revertantes/placa de la cepa TA98 inducidas por 2-NF y revertantes/placa inducidos por 2-NF co-incubados con el EAB. %I de la mutagenicidad inducida por 2-NF en presencia de 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB (método de pre-incubación).

| µg/placa 2-NF | Rev. / placa 2-NF | Rev. / placa 2-NF + EAB 1,0mg/placa | %I EAB 1,0mg/placa | Rev. / placa 2-NF+ EAB 10,0 mg/placa | %I EAB 10,0mg/placa |
|------------------|----------------------|---|-----------------------|--|------------------------|
| 0,00 | 43±20 ^a | 14±50 | | 19±1 | |
| 0,25 | 127±13* | 42±50* | 67,0±0,9 | 41±5* | 74,0±0,8 |
| 0,50 | 184±50* | 100±13* | 60,0±1,4 | 77±3* | 59,0±1,1 |
| 1,25 | 570±10* | 167±26* | 71,0±0,3 | 67±19* | 91,0±0,4 |
| 2,50 | 865±104* | 309±12* | 64,0±0,5 | 175±26* | 81,0±0,7 |

%I: Porcentajes de inhibición del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2- NF

^arevertantes espontáneos. *, p<0,05

Los valores de los %I muestran un efecto antimutágeno en ambas concentraciones ensayadas del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2-NF pudiéndose observar que el efecto inhibitor de la mutagénesis es mayor cuando la concentración de extracto EAB es de 10,0 mg/placa.

Comparando los resultados de los %I en ambos métodos (ensayo de incorporación en placa y pre-incubación) con la cepa testigo TA98 frente a la mutagenicidad inducida por el mutágeno de acción directa 2-NF, la mayor inhibición ejercida por el EAB se obtiene empleando el método de pre-incubación (**Figs. 12-13; Tablas 17-18**).

Cepa TA100. Mutágeno AZS. Método de incorporación en placa

En la **Fig. 14** se presentan los resultados obtenidos de las revertantes/placa de la cepa TA100 inducidas por el mutágeno de acción directa AZS (rango de concentraciones de 0,50-5,00 µg/placa).

En la figura se incluyen las curvas de dosis-respuesta correspondientes a las revertantes/placa de *S. typhimurium* cepa TA100 inducidas por el mutágeno AZS en presencia de EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) empleando el método directo de incorporación en placa.

En la **Tabla 18** se presenta el número de colonias revertantes/placa de la cepa TA100 inducidas por el mutágeno AZS en el rango de concentraciones ensayadas 0,50-5,00 µg/placa y el número de revertantes inducidas por AZS co-incubado con el EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) utilizando el método de incorporación en placa.

Puede observarse en la curva dosis-respuesta correspondiente a la AZS que el número de revertantes/placa aumenta en forma significativa a medida que se incrementa la concentración del mutágeno.

La co-incubación del mutágeno AZS en niveles de concentración de 0,50 - 5,00 µg/placa con 1,0 y 10,0 mg/placa inducen un menor número de revertantes/placa que presentan diferencias estadísticamente significativas en comparación con el mutágeno diagnóstico ($p < 0,05$).

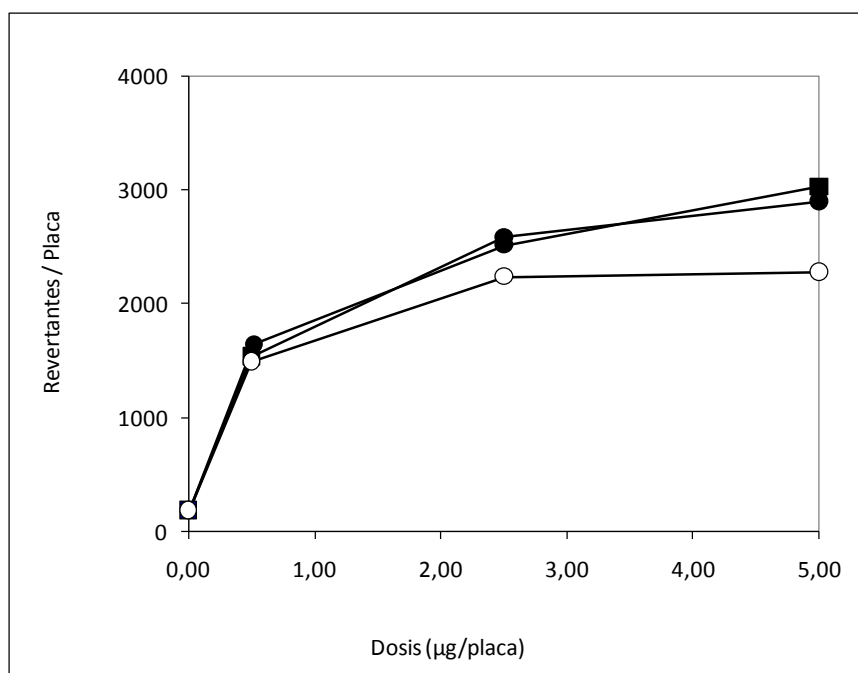


Fig. 13. Efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por AZS- utilizando *S. typhimurium* cepa TA100 (método de incorporación en placa). ■, revertantes/placa inducidas por AZS; ●, revertantes/placa inducidas por AZS en presencia de 1,0 mg/placa del EAB; ○, revertantes/placa inducidas por AZS en presencia de 10,0 mg/placa del EAB.

En la **Tabla 18** se presentan los %I de la mutagénesis inducida por AZS cuando es co-incubada con 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB. Puede observarse que con el empleo de 1,0 mg/placa de EAB los %I estuvieron entre $5,0 \pm 1,9$ y $7,4 \pm 3,1\%$, en el rango de concentraciones del mutágeno ensayado.

Con 10,0 mg/placa de EAB los %I fueron de $10,7 \pm 1,71$ a $26,0 \pm 2,1\%$ en el rango de concentraciones del mutágeno ensayado.

Tabla 18. Número de revertantes/placa de la cepa TA100 inducidas por AZS o por AZS co-incubados con el EAB. %I de la mutagenicidad inducida por la AZS en presencia de 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB (método de incorporación en placa).

| µg/placa AZS | Rev. /placa AZS | Rev. /placa AZS+ EAB 1,0mg/placa | %I EAB 1,0mg/placa | Rev. /placa AZS+ EAB 10,0mg/placa | %I EAB 10mg/placa |
|-----------------|--------------------|--|-----------------------|---|----------------------|
| 0,00 | 183±1 ^a | 185±2 | | 185±2 | |
| 0,50 | 1646±48* | 1540±12* | 7,4±3,1 | 1496±17* | 10,0±5,1 |
| 2,50 | 2516±36* | 2405±24* | 5,0±1,9 | 2240±22* | 10,7±1,7 |
| 5,00 | 3032±22* | 2900±24* | 5,0±2,4 | 2282±33* | 26,0±2,1 |

%I: Porcentajes de inhibición del EAB frente a la mutagenicidad inducida por la AZS

^arevertantes espontáneos. *, p<0,05

Cepa TA100. Mutágeno azida sódica. Método de pre-incubación

En la **Fig. 15** se presentan los resultados obtenidos de las revertantes/placa de la cepa TA100 inducidas por el mutágeno de acción directa AZS (rango de concentraciones de 0,50-5,00 µg/placa). En la figura se incluyen las curvas de dosis-respuesta correspondientes a las revertantes/placa de la cepa *S. typhimurium* TA100, inducidas por el mutágeno AZS en presencia del EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) empleando el método de pre-incubación.

En la **Tabla 19** se presenta el número de colonias revertantes/placa de la cepa TA100 inducidas por el mutágeno AZS en el rango de concentraciones testadas 0,50 – 5,00 µg/placa y las revertantes inducidas por AZS co-incubado con el EAB (concentraciones ensayadas 1,0 y 10,0 mg/placa) utilizando el método de pre-incubación.

En la Tabla se incluyen los %I de la mutagénesis inducida por el mutágeno AZS cuando se co-incubó con 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB.

Pudo observarse en la curva dosis-respuesta correspondiente a la AZS que el número de revertantes/placa aumenta en forma significativa a medida que se incrementa la concentración del mutágeno. La co-incubación del mutágeno AZS en niveles de concentración de 2,50 y 5,00 µg/placa co-incubado con 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB inducen un menor número de revertantes/placa que presentan diferencias estadísticamente significativas a las obtenidas con el mutágeno diagnóstico ($p < 0,05$).

Asimismo, puede observarse que los revertantes/placa obtenidos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) ($p > 0,05$).

En la **Tabla 19** se presentan los %I de la mutagénesis inducida por el AZS co-incubado con 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB. Pudo observarse que para 0,50 µg/placa de AZS los valores de %I fueron de 5,0 y 11,0% (1,0 y 10,0 mg/placa respectivamente). Para las concentraciones de mutágeno 2,50 y 5,00 µg/placa, la actividad antimutagénica del EAB varió entre $26,0 \pm 2,1$ y $41,0 \pm 2,0\%$ para las dos concentraciones de EAB ensayadas (1,0 y 10,0 mg/placa).

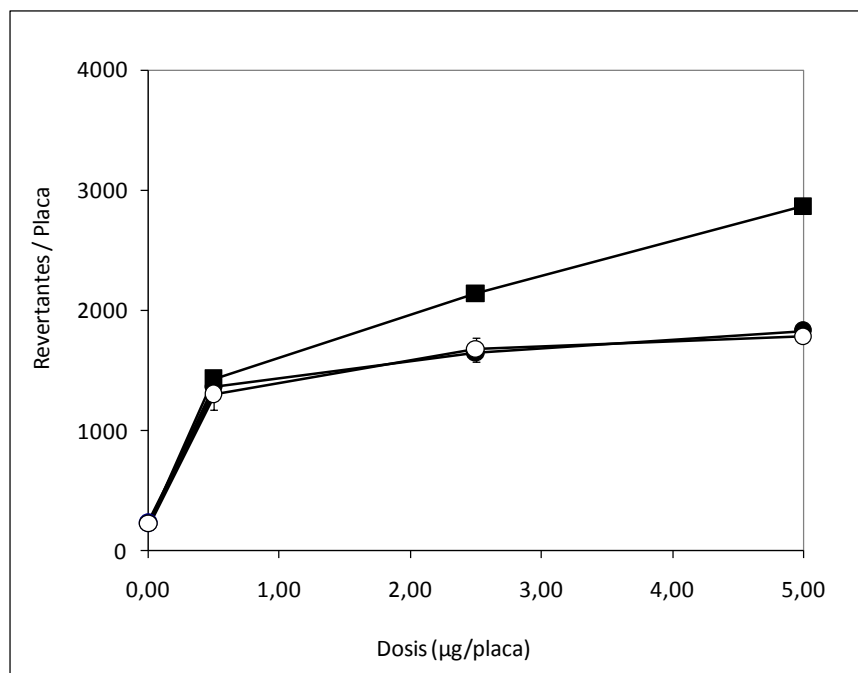


Fig. 14. Efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por AZS utilizando *S. typhimurium* cepa TA100 (método de pre-incubación). ■, revertantes/placa inducidas por AZS; ●, revertantes/placa inducidas por AZS en presencia de 1,0 mg/placa del EAB; ○, revertantes/placa inducidas por AZS en presencia de 10,0 mg/placa del EAB.

Comparando los resultados de los %I en ambos métodos (ensayo de incorporación en placa y pre-incubación) con la cepa testigo TA100 frente a la mutagenicidad ejercida por el mutágeno de acción directa AZS, se logró una mayor inhibición empleando el método de pre-incubación (Tabla 18 y Tabla 19).

Tabla 19. Número de revertantes/placa de la cepa TA100 inducidas por AZS y revertantes/placa inducidas por AZS co-incubadas con el EAB %I de la mutagenicidad inducida por la AZS en presencia de 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB (método de pre-incubación).

| µg/placa AZS | Rev. / placa AZS | Rev. / placa AZS+ EAB 1,0mg/placa | %I EAB 1,0mg/placa | Rev. / placa AZS+ EAB 10,0mg/placa | %I EAB 10,0mg/placa |
|-----------------|---------------------|---|-----------------------|--|------------------------|
| 0,00 | 219±21 ^a | 232±12 | | 228±11 | |
| 0,50 | 1431±55 * | 1360±13 * | 5,0±4,2 | 1303±130 * | 11,0±4,1 |
| 2,50 | 2140±38 * | 1643±28 * | 28±2,1 | 1676±97 * | 26,0±2,1 |
| 5,00 | 2867±49 * | 1832±8 * | 40±2,0 | 1780±40 * | 41,0±2,0 |

%I: Porcentajes de inhibición del EAB frente a la mutagenicidad inducida por AZS

^arevertantes espontáneas. *, p<0,05.

4.2.2. Ensayo con activación metabólica

Cepa TA98. Mutágeno 2- AF. Método de incorporación en placa

En la **Fig. 16** se presentan los resultados obtenidos de las revertantes/placa de la cepa TA98 inducidas por el pro-mutágeno 2-AF (rango de concentraciones 0,25-2,50 µg/placa) con el agregado de activación metabólica (mezcla S9). En la misma se incluyen las curvas correspondientes a las revertantes/placa de *S. typhimurium* cepa TA98 inducidas por 2-AF en presencia del EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) y mezcla S9.

En la **Tabla 20** se presenta el número de revertantes/placa de la cepa TA98 inducidas por el pro-mutágeno 2-AF en el rango de concentraciones ensayadas 0,25 – 2,50 µg/placa y co-incubado con el extracto de EAB (concentraciones ensayadas 1,0 y 10,0 mg/placa), en presencia de la fracción microsomal S9 y utilizando el

método de incorporación en placa. En la Tabla se incluyen los porcentajes de inhibición %I de la mutagénesis inducida por 2-AF en presencia de activación metabólica cuando se co-incuba con 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB.

Puede observarse en la curva dosis-respuesta correspondiente al pro mutágeno 2-AF en presencia de activación metabólica que el número de revertantes/placa aumenta en forma estadísticamente significativa a medida que se incrementa la concentración del mutágeno ($p < 0,05$).

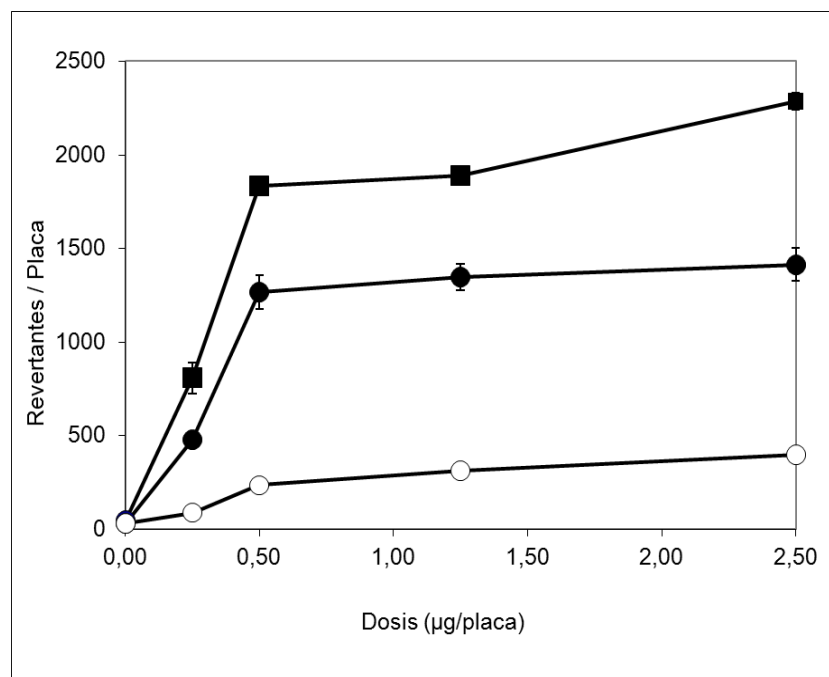


Fig. 15. Efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2-AF con activación metabólica utilizando *S. typhimurium* cepa TA98 (método de incorporación en placa). ■, revertantes/placa inducidas por 2-AF; ●, revertantes/placa inducidas por 2-AF en presencia de 1,0 mg/placa de EAB; ○, revertantes/placa inducidas por 2-AF en presencia de 10,0 mg/placa de EAB.

La co-incubación del pro-mutágeno 2-AF en niveles de concentración de 0,25-2,50 µg/placa con 1,0 y 10,0 mg/placa inducen un menor número de revertantes/placa, que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) y altamente significativas $p<0,01$, en comparación con el mutágeno control (100% de mutagenicidad) .

Tabla 20. Número de revertantes/placa de la cepa TA98 inducidas por 2-AF y revertantes/placa inducidos por 2-AF y co-incubados con el EAB con el agregado de activación metabólica. %I de la mutagenicidad inducida por 2AF en presencia de 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB (método de incorporación en placa).

| µg/placa 2-AF | Rev. / placa 2AF+S9 | Rev. / placa 2AF+ EAB 1,0mg/placa | %I EAB 1,0mg/placa | Rev. / placa 2AF + EAB 10,0mg/placa | %I EAB 10,0mg/placa |
|------------------|------------------------|---|-----------------------|---|------------------------|
| 0,00 | 37±2 ^a | 38±3 | | 32±6 | |
| 0,25 | 959±40 [*] | 695±5 [*] | 28,1±2,9 | 326±20 ^{**} | 68,0±1,9 |
| 0,50 | 1583±13 [*] | 1165±52 [*] | 28,0±0,7 | 311±8 ^{**} | 82,0±0,4 |
| 1,25 | 1769±25 [*] | 1169±40 [*] | 40,0±1,2 | 332±2 ^{**} | 73,0±0,6 |
| 2,50 | 2334±126 [*] | 1600±57 [*] | 32,0±5,6 | 489±3 ^{**} | 80,0±3,0 |

%I: Porcentajes de inhibición del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2- AF

^arevertantes espontáneos. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$.

Se pudo observar que con el empleo de 1,0 mg/placa de EAB, los valores de %I varían desde 28,1±2,9 a 40,0±1,2% en el rango de concentraciones del mutágeno ensayado.

Con la mayor concentración del EAB estudiada (10,0 mg/placa) los %I fueron de 68,0±1,9 a 82,0±0,4% en el rango de concentraciones del mutágeno ensayadas.

Se pudo observar que el efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el mutágeno de acción directa 2-AF, se acentúa cuando la concentración del EAB es de 10,0 mg/placa.

Cepa TA98. Mutágeno 2- AF. Método de pre-incubación:

En la **Fig. 17** se presentan los resultados obtenidos de las revertantes/placa de la cepa TA98 inducidas por el pro-mutágeno 2-AF (rango de concentraciones 0,25-2,50 µg/placa) con el agregado de activación metabólica (mezcla S9). En la figura se incluyen las curvas correspondientes a las revertantes/placa de *S. typhimurium* cepa TA98 inducidas por 2-AF en presencia de EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) y mezcla S9 empleando el método de pre-incubación.

En la **Tabla 21** se presenta el número de revertantes/placa correspondientes a la cepa TA98 inducidas por el pro-mutágeno 2-AF en el rango de concentraciones ensayadas 0,25 – 2,50 µg/placa y co-incubado con el extracto de EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) en presencia de activación metabólica utilizando el método de pre-incubación. En la Tabla se incluyen los %I de la mutagénesis inducida por 2-AF en presencia de activación metabólica cuando se co-incuba con 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB. Pudo observarse en la curva dosis-respuesta correspondiente al pro mutágeno 2-AF en presencia de activación metabólica que el número de revertantes/placa aumenta en forma estadísticamente significativa a medida que se incrementa la concentración del mutágeno.

La co-incubación del pro-mutágeno 2AF en niveles de concentración de 0,25 - 2,50 µg/placa con 1,0 y 10,0 mg/placa inducen un menor número de revertantes/placa

que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) y altamente significativas ($p < 0,01$), en comparación con el mutágeno diagnóstico (100% de mutagenicidad).

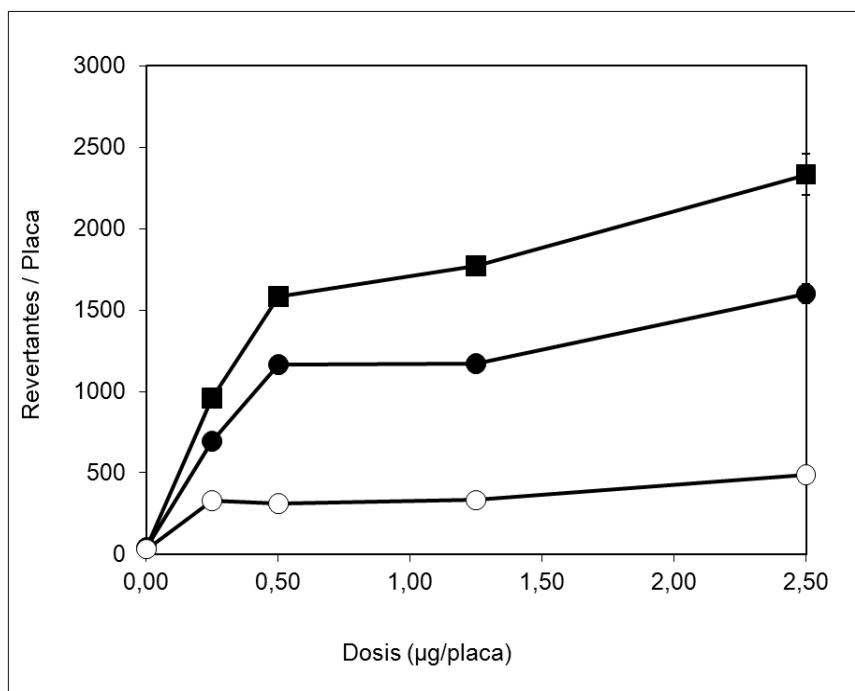


Fig. 16. Efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2-AF con activación metabólica utilizando *S. typhimurium* cepa TA98 (método de pre-incubación). ■, revertantes/placa inducidas por 2-AF; ●, revertantes/placa inducidas por 2-AF en presencia de 1,0 mg/placa de EAB; ○, revertantes/placa inducidas por 2-AF en presencia de 10,0 mg/placa de EAB.

En la **Tabla 21** pudo observarse que la co-incubación del mutágeno con 1,0 mg/placa de EAB arrojó un %I de $28,0 \pm 0,5$ a $41,0 \pm 5,8\%$ en el rango de concentraciones de mutágeno ensayado. Con la mayor concentración del EAB estudiada (10,0 mg/placa), los índices de inhibición fueron de $84,0 \pm 0,2$ a $92,0 \pm 2,1\%$ en el rango de concentraciones del mutágeno ensayado.

Tabla 21. Número de revertantes/placa de la cepa TA98 inducidas por el 2-AF y revertantes/placa inducidos por 2-AF co-incubados con el EAB y con el agregado de activación metabólica y %I de la mutagenicidad inducida por 2-AF en presencia de 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB (método de pre-incubación).

| µg/placa 2-AF | Rev. / placa 2AF+S9 | Rev. / placa 2AF+ EAB 1,0mg/placa | %I EAB 1,0mg/placa | Rev. / placa 2AF+ EAB 10,0mg/placa | %I EAB 10,0mg/placa |
|------------------|------------------------|---|-----------------------|--|------------------------|
| 0,00 | 46±3 ^a | 30±3 | | 30±3 | |
| 0,25 | 808±82* | 478±13* | 41,0±5,8 | 88±13** | 92,0±2,1 |
| 0,50 | 1836±20* | 1267±92* | 31,0±1,0 | 235±20** | 89,0±0,4 |
| 1,25 | 1890±10* | 1345±70* | 28,0±0,5 | 310±13** | 84,0±0,2 |
| 2,50 | 2285±45* | 1414±8* | 38,0±1,9 | 396±28** | 84,0±0,9 |

%I: Porcentajes de inhibición del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2- AF

^arevertantes espontáneas. *, p<0,05; **, p<0,01

En esta condición (método de pre-incubación y con activación metabólica) se pudo observar que el efecto antimutagénico ejercido por el EAB frente a la mutagenicidad inducida por el mutágeno de acción indirecta 2-AF sobre la cepa TA98 se acentuó cuando la concentración de EAB fue de 10,0 mg/placa.

Comparando los resultados de los %I en ambos métodos (ensayo de incorporación en placa y pre-incubación) con la cepa testigo TA98 frente a la mutagenicidad ejercida por el pro- mutágeno 2-AF en presencia de activación metabólica, la mayor inhibición se logra empleando el método de pre-incubación, que es superior a el método de incorporación en placa. (Tabla 20 y 21).

Cepa TA100. Mutágeno 2- AF. Método de incorporación en placa

En la **Fig. 18** se presentan los resultados obtenidos de las revertantes/placa de la cepa TA100 inducidas por el pro-mutágeno 2-AF (rango de concentraciones 0,25-2,50 µg/placa) con el agregado de activación metabólica (mezcla S9).

En la figura se incluyen las curvas correspondientes a las revertantes/placa de *S. typhimurium* cepa TA100 inducidas por 2-AF en presencia de EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) y mezcla S9.

En la **Tabla 22** se presenta el número de revertantes/placa de la cepa TA100 inducidas por el pro-mutágeno 2-AF en el rango de concentraciones ensayadas 0,25 – 2,5,0 µg/placa y co-incubado con el extracto de EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) en presencia de fracción microsomal S9 utilizando el método de incorporación en placa.

En la Tabla se incluyen los porcentajes de inhibición %I de la mutagénesis inducida por 2-AF en presencia de activación metabólica cuando se co-incuba con 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB.

Pudo observarse en la curva dosis-respuesta correspondiente al pro mutágeno 2-AF, en presencia de activación metabólica, que el número de revertantes/placa aumentó en forma estadísticamente significativa a medida que se incrementó la concentración del mutágeno ($p < 0,05$).

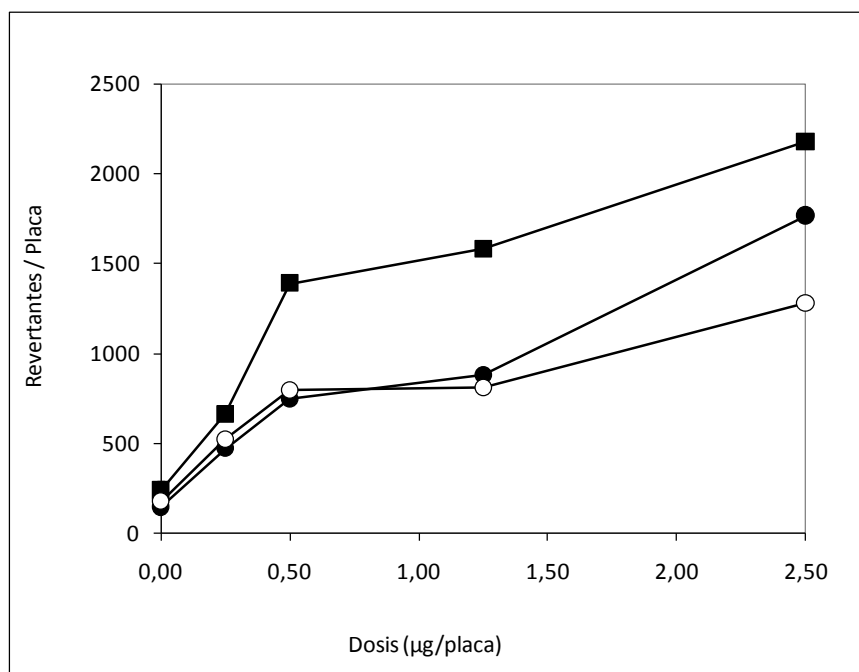


Fig. 17. Efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2-AF con activación metabólica utilizando *S. typhimurium* cepa TA100 (método de incorporación en placa). ■, revertantes/placa inducidas por 2-AF; ●, número de revertantes/placa inducidas por 2-AF en presencia de 1,0 mg/ placa de EAB; ○, revertantes/placa inducidas por 2-AF en presencia de 10,0 mg/placa de EAB.

La co-incubación del pro-mutágeno 2-AF en niveles de concentración de 0,25-2,50 con 1,0 y 10,0 mg/placa indujeron un menor número de revertantes/placa con diferencias estadísticamente significativas en comparación con el mutágeno sólo ($p < 0,05$). Pudo observarse en la **Tabla 22** que el tratamiento con 1,0 mg/placa de EAB arrojó %I que fueron desde $31,0 \pm 2,6$ y $52,0 \pm 2,7\%$ en el rango de concentraciones del mutágeno ensayado.

Con la mayor concentración del EAB estudiada (10,0 mg/placa), %I variaron entre $34,0 \pm 4,9$ y $56,0 \pm 2,5\%$.

Tabla 22. Número de revertantes/placa de la cepa TA100 inducidas por 2-AF y revertantes/placa inducidos por 2-AF co-incubados con el EAB y con el agregado de actividad metabólica. %I de la mutagenicidad inducida por el 2-AF en presencia de 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB (método de incorporación en placa).

| µg/placa 2-AF | Rev. / placa 2AF+S9 | Rev. / placa 2AF+ EAB 1,0mg/placa | %I EAB 1,0mg/placa | Rev. / placa 2AF + EAB 10,0mg/placa) | %I EAB 10,0mg/placa |
|------------------|------------------------|---|-----------------------|--|------------------------|
| 0.00 | 236±58 ^a | 144±3 | | 175±3 | |
| 0,25 | 660±30* | 470±5* | 37,0±5,8 | 520±6* | 34,0±4,9 |
| 0,50 | 1390±9* | 744±1* | 52,0±2,7 | 793±2* | 50,0±2,7 |
| 1,25 | 1580±20* | 880±3* | 41,0±2,7 | 810±3* | 56,0±2,5 |
| 2,50 | 2180±5* | 1767±26* | 31,0±2,6 | 1279±3* | 46,0±2,3 |

%I: Porcentajes de inhibición del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2-AF

^arevertantes espontáneos. *, p<0,05

En esta condición, (método de incorporación en placa con activación metabólica) se pudo observar el efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el mutágeno de acción directa 2-AF sobre la cepa TA100. Asimismo, no se observan diferencias significativas en los %I de la mutagenicidad por 2-AF co incubado con 1,0 o 10,0 mg/placa de EAB.

Cepa TA100. Mutágeno 2-AF. Método de pre incubación.

En la **Fig. 19** se presentan los resultados obtenidos de las revertantes/placa de la cepa TA100 inducidas por el pro-mutágeno 2-AF (rango de concentraciones 0,25-2,50 µg/placa) con el agregado de activación metabólica (mezcla S9). En la figura se

incluyen las curvas correspondientes a las revertantes/placa de *S. typhimurium* cepa TA100 inducidas por 2-AF en presencia de EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) y mezcla S9.

En la **Tabla 23** se presenta el número de revertantes/placa cepa TA100 inducidas por el pro-mutágeno 2-AF en el rango de concentraciones ensayadas 0,25-2,50 µg/placa y co-incubado con el extracto de EAB (1,0 y 10,0 mg/placa) en presencia de activación metabólica utilizando el método de pre-incubación. En la Tabla se incluyen los porcentajes de inhibición %I de la mutagénesis inducida por 2-AF en presencia de activación metabólica cuando se co-incuba con EAB.

Pudo observarse en la curva dosis-respuesta correspondiente al pro- mutágeno 2-AF en presencia de activación metabólica que el número de revertantes/placa aumentó en forma estadísticamente significativa a medida que se incrementó la concentración del mutágeno.

La co-incubación del pro-mutágeno 2-AF en niveles de concentración de 0,25 - 2,50 con 1,0 y 10,0 mg/placa indujeron un menor número de revertantes/placa con diferencias estadísticamente muy significativas con el mutágeno diagnóstico ($p<0,01$)

Pudo observarse que con el empleo de 1,0 mg/placa de EAB los de %I variaron entre $91,0\pm0,7$ y $100,6\pm0,0\%$ en el rango de concentraciones del mutágeno ensayadas.

Con la mayor concentración del EAB (10,0 mg/placa), los %I variaron entre de $95,0\pm0,7$ y $100,0\pm0,1\%$ en el rango de concentraciones del mutágeno ensayadas.

Bajo estas condiciones (método de pre-incubación con activación metabólica) se pudo observar un fuerte efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad

inducida por el mutágeno 2-AF sobre la cepa TA100 el cual resultó ser independiente de la concentración de EAB agregada (1,0 y 10,0 mg/placa).

Comparando los resultados de los %I en ambos métodos (ensayo de incorporación en placa y pre-incubación) con la cepa testigo TA100 frente a la mutagenicidad ejercida por el pro mutágeno 2-AF con activación metabólica, se logra una mayor inhibición empleando el método de pre-incubación (**Tabla 22 y 23**).

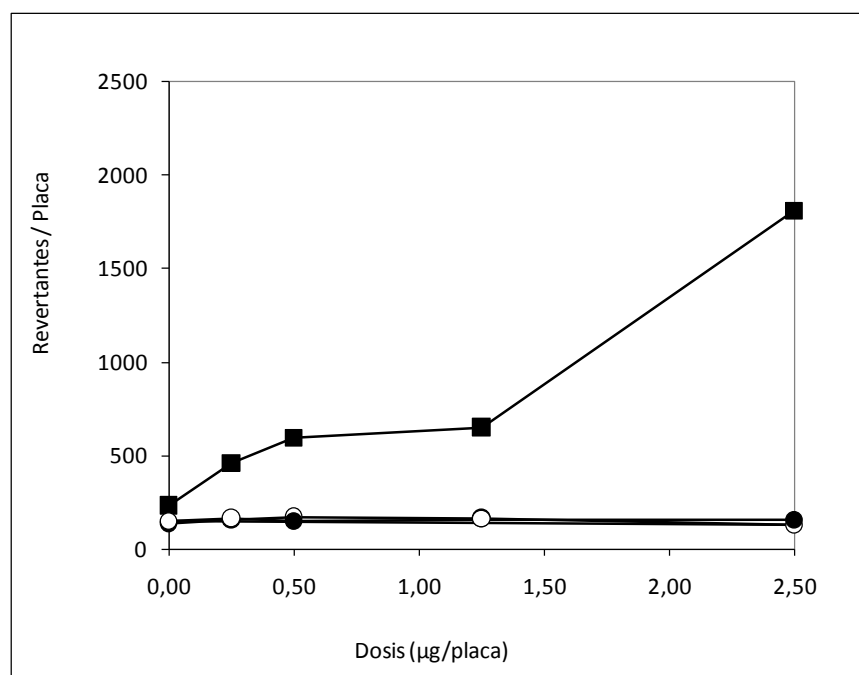


Fig. 18. Efecto antimutagénico del EAB frente a la mutagenicidad inducida por el 2-AF con activación metabólica utilizando *S. typhimurium* cepa TA100 (método de pre-incubación). ■, revertantes/placa inducidas por 2-AF; ●, revertantes/placa inducidas por 2-AF en presencia de 1,0 mg/ placa de EAB; ○, revertantes/placa inducidas por 2-AF en presencia de 10,0 mg/placa de EAB

Tabla 23. Número de revertantes/placa de la cepa TA100 inducidas por el 2-AF y revertantes/placa inducidos por 2-AF co-incubados con el EAB con el agregado de activación metabólica. %I de la mutagenicidad inducida por el 2-AF en presencia de 1,0 y 10,0 mg/placa de EAB (método de pre-incubación).

| µg/placa 2-AF | Rev. / placa 2AF+S9 | Rev. / placa 2AF+(EAB 1,0mg/placa) | %I EAB 1,0mg/placa | Rev. / placa 2AF+ EAB 10,0mg/placa | %I EAB 10,0mg/placa |
|------------------|------------------------|--|-----------------------|--|------------------------|
| 0,00 | 130±12 ^a | 136±9 | | 146±1 | |
| 0,25 | 458±8* | 154±9** | 93,0±0,7 | 162±13** | 95,0±0,7 |
| 0,50 | 592±7* | 170±26** | 91,0±0,7 | 146±17** | 100,0±0,1 |
| 1,25 | 650±5* | 163±18** | 99,0±0,4 | 158±17** | 98,0±0,3 |
| 2,50 | 1808±7* | 148±20** | 100,6±0,0 | 154±16** | 99,0 ±0,1 |

%I: Porcentajes de inhibición del EAB frente a la mutagenicidad inducida por 2- AF

^arevertantes espontáneos. *, p<0,05; **,p<0,01

4.2.3. Comparación de los métodos de incorporación en placa y de pre-incubación

A efectos de evaluar en forma conjunta los resultados encontrados en la actividad antimutagénica del EAB empleando el ensayo de Ames en sus dos formas metodológicas, se presentan los %I en forma conjunta en la **Tabla 24**.

Puede observarse en la tabla que en la mayoría de los ensayos el método de pre-incubación produce los mayores %I. Resulta importante recalcar que el mayor %I de antimutagenicidad del EAB se logra con frente a la cepa TA100, sobre el mutágeno 2-AF empleando activación metabólica. Además se observó que esta inhibición fue independiente de la concentración de EAB ensayada (1,0 y 10,0 mg/placa). En la **Tabla 24**, se puede observar que los porcentajes de inhibición obtenidos con el EAB,

en esta condición, son similares frente a cada concentración de mutágeno (0,25-2,50 µg/ml) y para cada concentración de EAB ensayadas 1,0 y 10,0 mg/placa.

Tabla 24. Porcentaje de inhibición de la mutagenicidad inducida por los mutágenos 2AF, 2NF y AZS en las cepas *S. typhimurium* TA98 y TA100 mediante los métodos de incorporación en placa (IP) y pre-incubación (PI); utilizando EAB (1,0 Y 10,0 mg/placa).

| Ensayo | Cepa TA98 | | | | Cepa TA100 | | | |
|-----------|-----------|-----------------------|-------------------|--------------------|------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| | mezcla S9 | Mutágeno ^b | EAB1 ^a | EAB10 ^a | mezcla S9 | Mutágeno ^b | EAB1 ^a | EAB10 ^a |
| | | | %I ^c | %I ^c | | | %I ^c | %I ^c |
| IP | + | 2AF | | | + | 2AF | | |
| | | 0,25 | 28,1±2,9 | 68,0±1,9 | | 0,25 | 37,0±5,8 | 34,0±4,9 |
| | | 0,50 | 28,0±0,7 | 82,0±0,4 | | 0,50 | 52,0±2,7 | 50,0±2,7 |
| | | 1,25 | 40,0±1,2 | 73,0±0,6 | | 1,25 | 41,0±2,7 | 56,0±2,5 |
| | | 2,50 | 32,0±5,6 | 80,0±3,0 | | 2,50 | 31,0±2,6 | 46,0±2,3 |
| PI | + | 2AF | | | + | 2AF | | |
| | | 0,25 | 41,0±5,8 | 92,0±2,1 | | 0,25 | 93,0 ±0,7 | 95,0±0,7 |
| | | 0,50 | 31,0±1,0 | 89,0±0,4 | | 0,50 | 91,0±0,7 | 110,0±0,1 |
| | | 1,25 | 28,0±0,5 | 84,0±0,2 | | 1,25 | 99,0±0,4 | 98,0±0,3 |
| | | 2,50 | 38,0±1,9 | 84,0±0,9 | | 2,50 | 100,0±0,0 | 99,0±0,1 |
| IP | - | 2NF | | | - | AZS | | |
| | | 0,25 | 20,0±0,8 | 28,0±0,7 | | 0,50 | 7,4±3,1 | 10,0±5,1 |
| | | 0,50 | 23,0±2,6 | 24,0±2,4 | | 2,50 | 5,0±1,9 | 10,7±1,7 |
| | | 1,25 | 41,0±0,4 | 43,0±0,4 | | 5,00 | 5,0±2,4 | 26,0±2,1 |
| | | 2,50 | 46,0±4,4 | 56,5±4,0 | | | | |
| PI | - | 2NF | | | - | AZS | | |
| | | 0,25 | 67,0±0,9 | 74,0±0,8 | | 0,50 | 5,0±4,2 | 11,0±4,1 |
| | | 0,50 | 40,0±1,4 | 59,0±1,1 | | 2,50 | 28,0±2,1 | 26,0±2,2 |
| | | 1,25 | 71,0±0,3 | 91,0±0,4 | | 5,00 | 40,0±2,0 | 41,0±2,0 |
| | | 2,50 | 64,0±0,5 | 81,0±0,7 | | | | |

^a mg/placa, ^b µg/placa, ^c porcentaje de inhibición, EAB1 (1,0mg/placa), EAB 10 (10,0 mg/placa).

El EAB produce un %I de la mutagenicidad inducida por el 2-AF entre 68,0±1,9 y 92,0±2,1% en la cepa TA98 en presencia de activación metabólica siendo mayor la inhibición aplicando el método de pre-incubación. En este caso, la inhibición es

dependiente de la concentración de EAB utilizada (1,0 y 10,0 mg/placa), siendo esta inhibición mayor cuando se ensayó la concentración mayor 10,0 mg/placa. El EAB produce los menores valores de %I con el empleo de AZS sobre la cepa TA100, observándose una inhibición mayor empleando el método de pre-incubación.

Esta cepa resulta ser menos sensible frente al efecto antimutágeno del EAB sobre la mutagenicidad inducida por AZS.

4.3. Evaluación de la actividad antimutagénica del ácido clorogénico

Los resultados de antimutagenicidad encontrados con el EAB nos condujeron a preguntarnos si el principal componente de los polifenoles detectados en el EAB, el ácido clorogénico, podría ser uno de los constituyentes presentes en el extracto responsable y/o contribuyente de la antimutagenicidad observada en los experimentos anteriores. Para ello, se evaluó la actividad antimutagénica de diferentes concentraciones de ácido clorogénico utilizando las cepas TA98 y TA100 frente a la mutagenicidad inducida por los mutágenos diagnóstico 2-AF, 2-NF y AZS con y sin activación metabólica. Las concentraciones de ácido clorogénico estudiadas se seleccionaron considerando el valor hallado en el EAB mediante la técnica de HPLC (2,05 mg de ácido clorogénico/ml del EAB) y un valor 5 veces mayor a éste. Por lo tanto, se empleó una concentración de ácido clorogénico de 0,10 mg/placa (concentración contenida en 10mg de EAB) y una concentración 5 veces mayor correspondiente a 0,50 mg/placa.

Se utilizó el método de pre-incubación dado que resultó ser el que presentó mayor sensibilidad en detectar la actividad antimutagénica del EAB.

En la **Tabla 25** se presenta el número de revertantes/placa en las cepas TA98 y TA100 inducidas por los mutágenos 2-AF, 2-NF y AZS en una única concentración de 2,50 µg/placa y co-incubado con el ácido clorogénico (0,10 y 0,50 mg/placa) con y sin activación metabólica utilizando el método de pre-incubación.

En la Tabla se incluyen los porcentajes de inhibición %I de la mutagénesis inducida por los mutágenos 2-AF, 2-NF y AZS con y sin activación metabólica cuando se co-incubó con ácido clorogénico.

Para la cepa TA98 el ácido clorogénico mostró un efecto inhibidor de la mutagénesis inducida por el 2-AF de $29,0 \pm 0,3\%$ y de $84,0 \pm 0,1\%$ para 0,10 y 0,50 mg/placa, respectivamente.

El ácido clorogénico en valores de 0,10 y 0,50 mg/placa presentó similar comportamiento en los ensayos sin activación metabólica frente a la mutagénesis inducida por el 2-NF, donde los %I fueron de $44,0 \pm 0,7$ y $75,5 \pm 0,4\%$, respectivamente.

La capacidad antimutagénica del ácido clorogénico sobre la cepa TA100 frente a la mutagenicidad inducida por 2-AF (con activación metabólica) resultó ser efectiva para ambas concentraciones ensayadas presentando mayor efecto antimutagénico cuando se ensayó la concentración mayor de 0,50 mg/placa ($98,9 \pm 0,1\%$).

Al analizar la capacidad antimutagénica del ácido clorogénico frente al mutágeno de acción directa AZS (cepa TA100) no se observó un efecto marcado en los valores del %I según las concentraciones utilizadas 0,10 y 0,50 mg/placa siendo de $36,0 \pm 0,3\%$ y $41,0 \pm 0,72\%$, respectivamente.

Tabla 25. Número de revertantes/placa de la cepa TA98 y TA100 inducidas por el 2-AF, 2-NF y AZS co-incubados con el ácido clorogénico (ACL) con y sin activación metabólica empleando el método de pre-incubación. %I de la mutagenicidad inducida por los mutágenos en presencia de 0,10 y 0,50 mg/placa de ACL.

| Cepa | Mutágeno 2,50 µg/placa | Rev/placa mutágeno | Rev/placa mutágeno+ACL 0,10 mg/placa) | %I ACL 0,10 mg/placa | Rev/placa mutágeno+ACL 0,50 mg/placa | %I ACL 0,50 mg/placa) |
|-------|------------------------------|-----------------------|---|----------------------------|--|-----------------------------|
| TA98 | 2-AF+S9 | 2379±431 ^a | 1696±125 [*] | 29,0±0,3 | 398±37 ^{**} | 84,0±0,1 |
| TA98 | 2-NF | 691±62 ^a | 330±46 [*] | 44,0±0,7 | 192±30 ^{**} | 75,5±0,4 |
| TA100 | 2-AF+S9 | 2329±140 ^a | 656±58 ^{**} | 76,0±0,2 | 159±4 ^{**} | 98,9±0,1 |
| TA100 | AZS | 2300±280 ^a | 1520±88 [*] | 36,0±0,3 | 1443±51 [*] | 41,0±0,72 |

%I: Porcentajes de inhibición del ácido clorogénico frente a la mutagenicidad inducida por

2-NF, 2-NF y AZS. ^acontrol positivo. Valores en la misma fila con *, p<0,05,**p<0,01

respecto al control positivo

4.4. Análisis comparativo del efecto antimutagénico ejercido por EAB y el ácido clorogénico

A efectos de comparar la actividad antimutagénica del EAB y la correspondiente al ácido clorogénico, se evaluaron en forma conjunta los %I sobre la mutagenicidad inducida por los mutágenos diagnóstico.

4.4.1. Ensayo sin activación metabólica

En la **Fig. 20 A y B** se representa los efectos antimutagénicos ejercidos por el ácido clorogénico (0,10 y 0,50 mg/placa) y el EAB (10,0 mg/placa) en presencia de las cepas TA98 y TA100 , frente a la mutagenicidad inducida por los mutágenos 2-NF y

AZS (2,50 µg/placa). Para el análisis comparativo se utilizó 0,10 mg/placa de ácido clorogénico, que corresponde a la concentración de este compuesto en la muestra de EAB (10,0 mg/placa) y una segunda concentración de ácido clorogénico 5 veces mayor 0,50 mg/placa, que la contenida en el EAB (10mg/placa), con la finalidad de evaluar la posible diferencia en la respuesta, según las condiciones ensayadas. Para la cepa TA98 (**Fig. 20 A**) el % I de la mutagenicidad inducida por el 2-NF empleando 0,10 mg/placa de ACL fue de $44,0 \pm 0,7\%$ mientras que empleando 10,0 mg/placa de EAB se observó un %I del $81,0 \pm 0,7\%$. Al incrementar la concentración del ácido clorogénico a 0,50 mg/placa, el %I resultó ser de $75,5 \pm 0,4\%$.

Para la cepa TA100 (**Fig. 20 B**) los % I frente a la mutagenicidad inducida por AZS co-incubado con 0,10 y 0,50 mg/placa de ácido clorogénico fueron de $36,0 \pm 0,3$ y $41,0 \pm 0,72\%$ respectivamente, mientras que el EAB con 10,0 mg/placa presentó un %I del $26,0 \pm 2,2\%$. Estos valores indican que en esta condición, el ácido clorogénico a concentraciones de 0,10 y 0,50 mg/placa, mostró una actividad antimutagénica superior a la ejercida por el EAB 10,0 mg/placa.

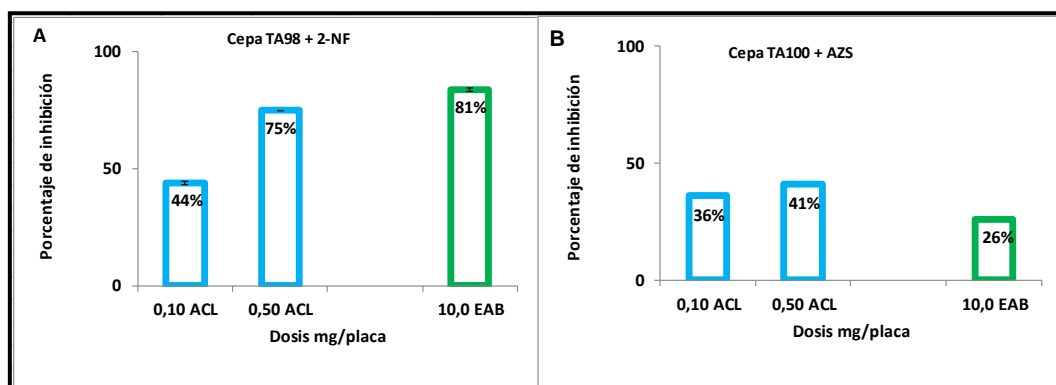


Fig. 19. Efecto antimutagénico del ácido clorogénico (ACL) 0,10 y 0,50 mg/placa (Barras turquesa) y del EAB 10 mg/placa (Barra verde) frente a la mutagenicidad inducida por: **A)** 2-NF (2,50 µg/placa) utilizando *S. typhimurium* TA98 sin activación metabólica **B)** AZS (2,50 µg/placa) *S. typhimurium* cepa TA 100 sin activación metabólica

4.4.2. Ensayo con activación metabólica

En las Figura **21 A** y **B** se representa los efectos antimutagénicos ejercidos por el ácido clorogénico (0,10 y 0,50 mg/placa) y el EAB (10,0 mg/placa) en presencia de las cepas TA98 y TA100 , frente a la mutagenicidad inducida por el pro -mutágeno. 2-AF, con activación metabólica.

Para la cepa TA98 (**Fig. 21 A**) los % I de la mutagenicidad inducidas por el 2-AF co-incubado con 0,10 y 0,50 mg/placa de ácido clorogénico fueron de $29,0 \pm 0,3$ y $84,0 \pm 0,1\%$ respectivamente, mientras que con 10,0 mg/placa de EAB se observó un %I del $84 \pm 0,9\%$. Pudo observarse que la capacidad antimutagénica del EAB, resultó semejante a la ejercida por la mayor concentración ensayada de ácido clorogénico 0,50 mg/placa.

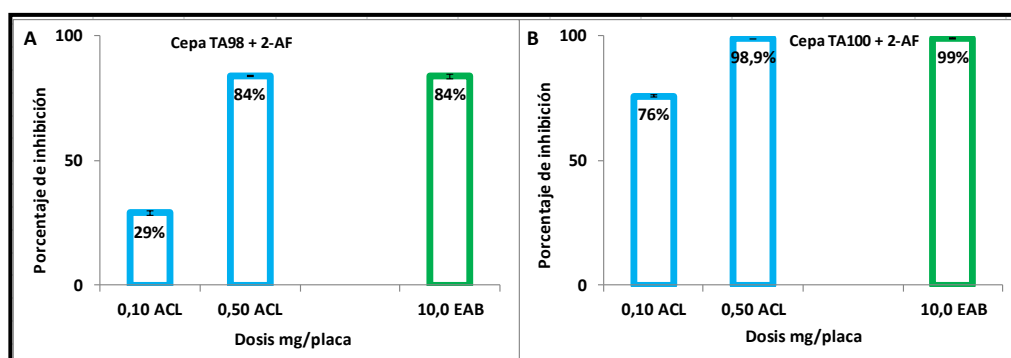


Fig. 20. Efecto antimutagénico del ácido clorogénico (ACL) 0,10 y 0,50 mg/placa (Barras turquesa) y del EAB 10,0 mg/placa (Barra verde) frente a la mutagenicidad inducida por el 2-AF (2,50 μ g/placa) utilizando la cepa *S. typhimurium* con activación metabólica. **A)** cepa TA98, **B)** cepa TA100

Para la cepa TA100 (**Fig.21 B**), los % I de la mutagenicidad inducidos por el 2-AF con 0,10 y 0,50 mg/placa de ácido clorogénico fueron de $76,0 \pm 0,2$ y $98,9 \pm 0,1\%$ respectivamente, mientras que con 10,0 mg/placa del EAB %I fue del $99,0 \pm 0,1\%$. Estos valores indicaron que 0,10 mg/placa de ácido clorogénico tuvo una capacidad antimutagénica menor que la ejercida por el EAB 10,0 mg/placa. Sin embargo cuando se incrementó 5 veces la concentración de ácido clorogénico, la capacidad antimutagénica del ácido clorogénico resultó semejante a la ejercida por el EAB.

5. DISCUSIÓN

Esta Tesis Doctoral tuvo como objetivo general evaluar la acción antimutagénica de un extracto acuoso de la especie vegetal *B. articulata* (EAB) mediante el Ensayo de Ames utilizando las cepas de *S. typhimurium* y empleando dos métodos de evaluación: el método de incorporación en placa y pre-incubación. Para ello, resultó relevante caracterizar previamente la composición química del EAB y evaluar la actividad antioxidante así como su actividad mutagénica y tóxica.

Los resultados encontrados en el presente estudio referidos a la caracterización química del EAB indicaron que el principal polifenol identificado fue el ácido clorogénico con una concentración de $2,05 \pm 0,11$ mg/ml lo cual representaría 1mg de ácido clorogénico por cada 100 mg de EAB (1%).

El estudio de la actividad antioxidante producida por el EAB y el ácido clorogénico mostró un valor de CE_{50} de 101,86 μ g/ml y de 0,269 μ g/ml respectivamente. La actividad antioxidante del ácido clorogénico resultó ser mayor que la obtenida para el EAB, indicando que se requiere una concentración menor de ácido clorogénico para lograr el 50% de la eficiencia inhibitoria.

Respecto a los resultados encontrados al evaluar la toxicidad tanto del EAB como del ácido clorogénico, estos indicaron que ambas fracciones no fueron tóxicas para las cepas de *S. typhimurium* TA98 y TA100, dentro del rango de las concentraciones ensayadas.

Asimismo, se evaluó la actividad mutagénica y se determinó que, tanto el EAB como el ácido clorogénico, no resultaron ser mutagénicos empleando el Ensayo de Ames como modelo experimental. Ello nos permitió continuar evaluando la posible

capacidad antimutagénica del EAB y del ácido clorogénico frente a la mutagenicidad inducida por agentes mutágenos de acción reconocida tales como 2-AF, 2-NF y AZS. Respecto a los estudios de antimutagenicidad, los resultados encontrados empleando la cepa TA98 mostraron que el EAB presentó un efecto protector frente a la mutagenicidad inducida por el mutágeno 2-NF (ensayos sin activación metabólica) que varió con la concentración de EAB utilizada. Los valores de los %I indicaron un efecto antimutágeno que resultó ser mayor cuando la concentración del EAB fue de 10,0 mg/placa. Comparando los resultados de los %I en ambos métodos (ensayo de incorporación en placa y pre-incubación), la mayor inhibición ejercida por el EAB se obtuvo empleando el método de pre-incubación con valores que variaron entre $59,0 \pm 1,1$ y $91,0 \pm 0,4\%$.

De manera similar a lo mencionado anteriormente, para la cepa TA98 en los ensayos con activación metabólica, el EAB presentó efecto antimutagénico frente a la mutagenicidad inducida por el 2-AF utilizando 10 mg/placa, con %I que variaron entre $89,0 \pm 0,4$ y $92,0 \pm 2,1\%$ para los ensayos realizados con el método de pre-incubación y activación metabólica.

Al emplear la cepa TA100 se observó que el EAB presentó un efecto protector frente a la mutagenicidad inducida por el mutágeno 2-AF (ensayos con activación metabólica) que varió con la concentración de EAB utilizada. En forma similar, la mayor inhibición ejercida por el EAB se obtuvo empleando el método de pre-incubación con %I que variaron entre $95,0 \pm 0,7$ y $100,0 \pm 0,0\%$ utilizando 10 mg/placa de EAB.

Para la cepa TA100 en los ensayos sin activación metabólica, empleando la AZS como mutágeno diagnóstico, en una concentración de 10 mg/placa de EAB, el %I varió entre $11,0 \pm 4,1$ - $40,0 \pm 2,0\%$ con el método de pre-incubación. Valores menores de %I se obtuvieron empleando el método de incorporación en placa.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la discusión de esta Tesis Doctoral está planteada teniendo en cuenta la caracterización química, actividad antioxidante, mutagénica y la capacidad antimutagénica del EAB.

5.1. Composición química del EAB y evaluación de la actividad antioxidante

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral sobre los compuestos químicos presentes en el EAB analizados por HPLC permitieron determinar al ácido clorogénico como el polifenol mayoritario de la muestra. En la bibliografía internacional se confirma la presencia de este polifenol en diversas plantas como *Ilex paraguayensis*, *B. genistelloides*, *Pimpinella anisum*, entre otras (Yoshimoto y col., 2002; Marques y Farah, 2009). El ácido clorogénico es un éster del ácido cafeico y el ácido quínico. Otros estudios han demostrado que el ácido clorogénico (**Fig. 22**) es el compuesto mayoritario aislado del café, de hojas y frutos de las plantas dicotiledóneas siendo el más importante del grupo de fenoles bioactivos (Olthof y col., 2001). En concordancia con nuestros resultados, estudios fitoquímicos realizados sobre especies de *Baccharis* han identificado compuestos tales como flavonoides, ácidos fenólicos y diterpenos como constituyentes principales en esta planta (Verdi y col., 2005).

Respecto a la composición química, Grecco y col. (2012) aislaron ocho flavonoides (sakuranetina, naringenina, eriodictyol, apigenina, taxifolina, aromadendrina, quercetina, kaempferol) y tres ácidos clorogénicos (3,4-O-dicaffeoylquinic acid, 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, 4,5-O-dicaffeoylquinic acid) de las partes aéreas de *B. retusa*. Estos autores concluyeron que la fitoquímica de esta especie es similar a la de otros miembros del género *Baccharis*: *B. dracunculifolia* (Marques y Farah, 2009), *B. trimera* y *B. usterii* (Verdi y col., 2005; Simões-Pires y col., 2005).

De acuerdo a Marques y Farah (2009) el principal grupo de compuestos fenólicos encontrado en las plantas es el de los ácidos hidroxicinámicos; éstos están compuestos por el ácido cafeico, ferúlico y p-cumárico que son ácidos trans-cinámicos, naturalmente en estas tres formas o como mono éteres o di-ésteres de éstos compuestos con el ácido quínico, conocidos genéricamente como la familia de los ácidos clorogénicos (Farah y Donangelo, 2006). Dentro de este grupo, los más frecuentemente hallados en la naturaleza son los ácidos cafeilquínicos, ácidos dicafeilquínicos y los menos comunes los ácidos feruloquínicos. Asimismo, cabe señalar que cada uno de estos grupos posee al menos tres isómeros químicos (Palacios y col., 1999).

Los principales componentes químicos y principios activos responsables de la actividad estimulante digestiva colerética y colagoga informados para la especie de *Baccharis* son los flavonoides, ácidos cafeilquínicos y terpenoides (Simões-Pires y col., 2005).

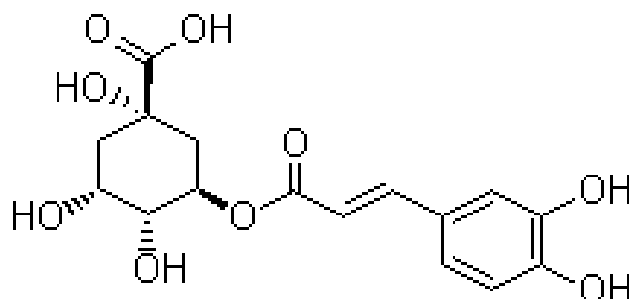


Fig. 21. Estructura química del ácido clorogénico (5- cafeilquínico (CQA))

En estudios cromatográficos empleando HPLC realizados con extractos hidroalcohólicos de *B. articulata* y otras carquejas del mismo género, tales como *B. crispa* y *B. trímera*, Palacios y col. (1999) demostraron la presencia de ácidos fenólicos (ácido cafeíco, ácido clorogénico y ácidos isoclorogénicos). Estos autores encontraron que *B. crispa* presentó un mayor contenido de ácido clorogénico y de isoclorogénico que *B. articulata*. Los niveles detectados de ácido clorogénico para *B. crispa* fueron de 0,35% y para *B. articulata* de 0,17% expresados como g/100 g de material seco. Los niveles de isoclorogénico encontrados en *B. crispa* y para *B. articulata* fueron de 1,51% y 1,14% expresados como g/100 g de materia seca respectivamente. Sólo trazas de ácido cafeico fue encontrado en *B. crispa* y *B. articulata*.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se detectó ácido clorogénico en niveles de 2,05 mg/ml de EAB y considerando que la concentración inicial es de 1mg por cada

100 mg de material seco, este valor indica que el contenido de ácido clorogénico es del 1% expresada como g/100 g de material seco.

Este valor resultó ser mayor a los informados por Palacios y col. (1999) pudiendo deberse a las diferencias en la metodología de extracción (extracción metanólica) de los ácidos cafeilquínicos realizado por estos autores. Por otra parte, en nuestro trabajo no se detectaron niveles de ácido cafeico de manera similar a lo informado en el trabajo de Palacios y col. (1999).

Castañeda y col. (2008) realizaron un estudio de la capacidad antioxidante de diferentes plantas medicinales del Perú. Ellos informaron que el extracto acuoso de las hojas de “lagarto caspi” *Calophyllum brasiliense* (árbol medicinal americano) en una concentración de 100 µg/ml presentó un porcentaje de inhibición de DPPH* de 110,56%. Asimismo, el extracto metanólico de hipocótilo de *Lepidium peruvianum* (200 µg/ml) mostró un porcentaje de inhibición de DPPH* de 95,55%. Los extractos acuosos de *L. meyenii* (200 µg/ml) y de *Minthostachys mollis* (50 µg/ml) presentaron un porcentaje de inhibición de 88,21% y 92,41%, respectivamente. En todos los casos, se utilizó como patrón la actividad antioxidante promedio el ácido ascórbico (Vitamina C) que resultó del 92,82%.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral empleando una concentración de 150 µg/ml del EAB se obtuvo un porcentaje de inhibición de DPPH* de 76,1% indicando que el EAB presentó una actividad antioxidante similar a la obtenida en los extractos de las plantas anteriormente mencionados.

Otros autores tales como Vieira y col. (2011) realizaron un análisis de la actividad antioxidante de diferentes especies de *Baccharis* e informaron que la concentración eficiente (CE_{50}) para el extracto acuoso de *B. articulata* fue de $CE_{50} = 26 \pm 2 \mu\text{g/ml}$; para el extracto acuoso de *B. trimera* fue de $CE_{50} = 30 \pm 1 \mu\text{g/ml}$; para el extracto acuoso de *B. spicata* fue de $CE_{50} = 36 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ y para el extracto acuoso de *B. usterii* de $CE_{50} = 18 \pm 3 \mu\text{g/ml}$. El control positivo para estas determinaciones fue quercetina con un $CE_{50} = 0,02 \mu\text{g/ml}$, valor superior de actividad antioxidante al mostrado por los extractos. Rodrigues y col. (2009) en un estudio realizado con la especie *B. trimera*, que posee propiedades similares a *B. articulata*, informaron un valor de $CE_{50} = 92,39 \mu\text{g/ml}$, siendo los patrones utilizados por estos autores ácido ascórbico y rutina $CE_{50} = 4,03$ y $18,93 \mu\text{g/ml}$, respectivamente.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, el EAB mostró actividad antioxidante con un valor de $CE_{50} = 101,86 \mu\text{g/ml}$ utilizando como control positivo el ácido clorogénico. El valor de CE_{50} para el ácido clorogénico fue de $0,269 \mu\text{g/ml}$, indicando que la eficiencia inhibitoria del ácido clorogénico frente al DPPH* resultó ser mayor que la obtenida para el EAB.

Madsen (1997) en base a estudios fitoquímicos realizados en especies del género *Baccharis* identificó compuestos fenólicos, fenilpropanoides y flavonoides que poseen varias propiedades biológicas *in vitro* e *in vivo*. Estos efectos biológicos fueron atribuidos mayoritariamente a la actividad antioxidante de estas hierbas capaces de neutralizar radicales libres producidos por la peroxidación lipídica o iones metálicos responsables de la generación de especies reactivas y del daño a

biomoléculas esenciales.

De Oliveira y col. (2003) estudiaron la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH* de los extractos acuoso y etanólico de *B. articulata* así como las fracciones de diclorometano, acetato de etilo y n-butanol obtenidos a partir de extractos acuosos. Estos autores encontraron que la fracción de n-butanol fue la más activa en su actividad antioxidante siendo el principal compuesto aislado e identificado el 4'-O- β -D glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzil-cafeato el cual representó el 2,5% del total de los constituyentes y fue el responsable del efecto protector frente al estrés oxidativo generado por el peróxido de hidrógeno.

De Oliveira y col. (2004) determinaron la actividad antioxidante de *B. spicata*, *B. trímera* y *B. uterii* a través del ensayo TRAP (parámetro de radical-atrapador de antioxidantes) y TBARS (formación de especies reactivas por el ácido tiobarbiturico). Los autores determinaron que la fracción n-butanol fue la más activa en *B. spicata* y *B. trímera*, sin embargo en *B. uterii* tanto la fracción acuosa como la n-butanol la actividad antioxidante resultó ser similar. En un trabajo previo (De Oliveira y col., 2003) la fracción n-butanol en *B. articulata* presentó la mayor actividad antioxidante de la cual se aisló un compuesto denominado Ball (4'-O- β -D glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzil-cafeato). Este compuesto no fue identificado en *B. spicata*, *B. trímera* y *B. uterii*. Los autores sugieren lo anterior podría indicar la presencia de diferentes compuestos químicos (derivados fenólicos y terpenoides) en las especies de *Baccharis* estudiadas.

En la presente Tesis Doctoral, la actividad antioxidante obtenida para el EAB resultó ser comparable a la presentada en la bibliografía de otros géneros de *Baccharis* (Rodríguez y col., 2009).

A efectos de completar la caracterización del EAB se evaluó el efecto tóxico y mutagénico frente cepas de *S. typhimurium* mediante el Ensayo de Ames .

5.2. Evaluación del efecto tóxico y mutagénico del EAB y del ácido clorogénico

Existe abundante evidencia de los efectos benéficos de *B. articulata* sobre la salud humana y animal. En la extensa bibliografía referida a la toxicidad de las diferentes especies de *Baccharis* como ser *B. trímera*, *B. crispa* y *B. articulata*. (Debenedetti y col., 2006). En otros trabajos, no se encontraron evidencias que indiquen toxicidad ni efectos adversos en ensayos en vía oral en ratones. La dosis administrada fue 100 veces superior al consumo humano habitual (extracto acuoso equivalente a 14,0 - 14,4 g de planta seca/kg de peso corporal) (Gorzalczany y col., 1999).

Respecto a su acción bactericida, resulta importante tener en cuenta que algunos compuestos químicos presentes en los extractos de plantas ejercen acción bactericida sobre las cepas bacterianas utilizadas en el Ensayo de Ames (Purchase y col., 1976).

Los resultados de toxicidad encontrados en la presente Tesis Doctoral empleando EAB en el rango de concentraciones (1,0 y 10,0 mg/placa) no presentó efectos tóxicos sobre las cepas de *S. typhimurium* TA98 y TA100 con y sin activación metabólica. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en la toxicidad con los métodos ensayados (incorporación en placa y pre-incubación).

Respecto al ácido clorogénico, en el rango de concentraciones estudiadas (0,05 y 0,50 mg/placa), no resultó ser tóxico frente a las cepas TA98 y TA100 con el método de pre-incubación.

Respecto a la actividad mutagénica del EAB y del ácido clorogénico, aplicando el Ensayo de Ames, las cepas TA98 y TA100, nuestros resultados no indicaron efecto mutagénico en el rango de concentraciones estudiadas.

Sin embargo, los estudios de mutagenicidad realizados por Borgo y col. (2004) con un extracto acuoso de *B. articulata* en concentraciones de 62, 50, 125, 250 y 500 mg/placa empleando el Ensayo de Ames observaron una actividad mutagénica leve a partir de 250 y 500 mg/placa con la cepa TA98 empleando el método de pre-incubación y sin activación metabólica. La diferencia encontrada con nuestros resultados podría deberse a las altas concentraciones de extracto acuoso utilizada por los autores (entre 25 y 50 veces mayores a los ensayados en esta Tesis Doctoral) que podrían producir una interferencia con el ensayo, permitiendo la duplicación bacteriana durante el estado de pre-incubación (Chu y col., 1981).

Rodriguez y col. (2009) llevaron a cabo un análisis *in vivo* de genotoxicidad y anti-genotoxicidad del extracto acuoso del género *B. trímpera*, empleando el ensayo de micronúcleos y electroforesis de células únicas (ensayo cometa) en ratones expuestos al extracto. Estos autores concluyeron que independientemente de la dosis ensayada, no se observaron efectos genotóxicos, tanto en sangre periférica como en hígado de los animales tratados cuando la metodología del ensayo cometa fue empleada como biomarcador. Sin embargo, el extracto acuoso en

concentraciones de 500, 1000 o 2000 mg/Kg de *B. trimera* aumentó la frecuencia de micronúcleos en medula ósea de ratón, después de ser tratados tres días consecutivos, indicando capacidad clastogénica y/o aneugénica del mismo. Estos autores encontraron además un efecto antigenotóxico, protegiendo el daño oxidativo sobre el ADN cuando la sangre de los ratones fue tratada *in vivo* con peróxido de hidrógeno (Datos no mostrados). Los mismos autores sugieren que el efecto antigenotóxico encontrado podría estar relacionado con la actividad antioxidante del extracto acuoso de *B. trimera*.

Por otra parte, la actividad citotóxica del extracto acuoso frío de *B. articulata* fue estudiada *in vitro* en linfocitos de sangre periférica de individuos humanos sanos en concentraciones de 40, 78, 156, 313, 625 y 1250 µg/ml mediante tratamiento continuo de 18-24 h (Cariddi y col., 2010). Asimismo, estos autores analizaron la genotoxicidad inducida mediante el ensayo de micronúcleos empleando ratones Balb/c inyectados con 1800, 900 y 450 mg/kg de extracto acuoso de *B. articulata*. Los estudios pusieron en evidencia que el extracto acuoso de *B. articulata* no ejerció actividad citotóxica sobre linfocitos humanos, ni mutagénicos en eritrocitos de médula ósea de ratón luego de 6 h de aplicación (Cariddi y col., 2010). Sin embargo, en un estudio posterior Cariddi y col. (2012) revelaron que el extracto acuoso frío de *B. articulata*, mostró tener un efecto mutagénico cuando se incrementó el tiempo de exposición a 24 y 48 h en las dosis ensayadas (900 y 1800 mg/Kg) incrementándose estadísticamente el número de micronúcleos ($p < 0,05$) evaluados mediante un ensayo ANOVA empleando la comparación múltiple de

Tukey. Los autores argumentaron que el tiempo de exposición estaría influenciando esta respuesta diferencial.

Los resultados encontrados en la presente Tesis Doctoral y otros que surgen de la bibliografía consultada referidos a la evaluación de la mutagenicidad por el Ensayo de Ames, nos permite afirmar que el EAB y el ácido clorogénico son no tóxicos sobre las cepas de *S. typhimurium* utilizadas (TA98 y TA100) ni mutagénicos en las concentraciones ensayadas en los dos métodos estudiados (incorporación en placa y pre-incubación), con y sin activación metabólica. Esto nos habilita a avanzar en la discusión inherente a los ensayos de antimutagenicidad del EAB realizados con el Ensayo de Ames.

5.3. Evaluación de la actividad antimutagénica del EAB y del ácido clorogénico frente a mutágenos de acción conocida empleando las cepas TA100 y TA98 con y sin activación metabólica

Existe en la bibliografía gran número de estudios en los cuales las plantas medicinales muestran su capacidad inhibitoria sobre mutágenos de reconocida actividad mutagénica y carcinogénica. Entre la gran lista de posibles ejemplos, se encuentran fundamentalmente las frutas, como: la arjuna o arjun árbol (*Terminalia arjuna*) (Kaur y col., 2001), la guayava o guava (*Psidium guajava*) (Grover y Bala, 1993).

Diversos estudios realizados en ensayos bacterianos demuestran la clara capacidad antimutagénica de algunos extractos de plantas, como son los provenientes del árbol de la orquídea roja o bauhinia roja (*Bauhinia galpinii*), de la mariposa azul

(*Rotheca myricoides*), igual que tes chinos (Gunpowder Chinese y Japanese Sencha) (Bunkova y col., 2005, Verschaeve y Van Staden, 2008).

En la bibliografía se encuentran gran cantidad de investigaciones previas que examinan las propiedades antimutagénicas de hierbas e infusiones de plantas de uso popular (Marnewick y col., 2000; Santana-Rios y col., 2001; ; Horn y Ferrañ Vargas, 2008). Muchos de estos trabajos fueron realizados utilizando el Ensayo Ames como modelo experimental (Yen y col., 2001; ; Horn y Ferrañ Vargas Vargas, 2003; Cariño-Cortéz y col., 2007). Como consecuencia se ha sugerido que tal efecto protector podría estar relacionado con los flavonoides y/o taninos presentes en los extractos acuosos, inactivadores potenciales de las enzimas involucradas en el metabolismo de la mutagénesis (Horn y Ferrañ Vargas, 2008).

En concordancia con los estudios anteriores, los resultados encontrados en la presente Tesis Doctoral indican que el EAB resultó ser antimutagénico sobre la mutagenicidad inducida por tres mutágenos diagnóstico (2-AF, 2-NF y AZS), en el Ensayo de Ames en sus dos variantes, en las concentraciones estudiadas ,con las cepas testigo seleccionadas y con y sin activación metabólica. Asimismo, el principal compuesto detectado en el EAB correspondió al ácido clorogénico, el cual también mostró ser antimutagénico en el rango de concentraciones ensayadas. En la **Tabla 25** (acápito 4.3.) se observan los índices de inhibición del ácido clorogénico sobre la mutagenicidad inducida por los mutágenos 2-AF, 2-NF y AZS .en la cual se observa una efectividad mayor al ensayar la concentración más alta del mismo (0,50 mg/placa).

En la bibliografía algunos autores hacen mención a la capacidad antimutagénica de los polifenoles, los cafeilquínicos y sus derivados en ciertas plantas (Yoshimoto y col., 2002). Otros autores mencionan los efectos inhibitorios del ácido clorogénico y el ácido cafeíco frente a los mutágenos Trp-P-1 y Glu-P-2 utilizando el Ensayo de Ames (Yamada y Tomita, 1996).

Los resultados encontrados en la presente Tesis Doctoral son coincidentes con los encontrados en la bibliografía respecto a la capacidad antimutagénica del ácido clorogénico. Por ello, estaríamos en condiciones de afirmar que el EAB y el ácido clorogénico en los rangos ensayados es antimutagénico, utilizando el Ensayo de Ames.

5.3.1. Evaluación del efecto antimutagénico del EAB utilizando dos variantes del ensayo (incorporación en placa y pre-incubación)

Diferentes autores han empleado el método de incorporación en placa del Ensayo de Ames para determinar la actividad antimutagénica de un xenobiótico (Nakasugi y Komai, 1998; Abdullaev y col., 2003; Moreno y col., 2005; Guachalla 2006; Bunkova y col., 2005).

Otros autores, sin embargo, utilizan el método modificado con pre-incubación (Yen y col., 2001; Santana-Rios y col., 2001; Pedreschi y col., 2006; Saito y col., 2006; Cariño-Cortez y col., 2007). Finalmente, otros autores implementan ambos métodos para la evaluación de la antimutagénesis de diversas sustancias, drogas e hierbas (Ferrer y col, 2002; Anjana y col., 2007). Según datos bibliográficos en todos los

casos el ensayo con pre-incubación resulta ser igual o más sensible que el de incorporación en placa (Matsushima y col., 1980). Kaur y col., (2002) en su estudio sobre la antimutagénesis ejercida por los extractos (fracción metanólica, acetónica, benzoica y clorofórmica) de la planta medicinal *Terminalia arjuna* sobre la mutagenicidad inducida por diferentes mutágenos (colorante ácido negro, 4-nitro-o-fenilenediamina y 2-AF) con la cepa testigo TA98 y utilizando ambos métodos (incorporación en placa y pre-incubación) concluyen que el efecto inhibitorio de la mutación por las fracciones estudiadas fue similar en ambos métodos. Anjana y col. (2007) de manera similar encuentran que para la cepa TA100 utilizando el ensayo de incorporación en placa y pre-incubación y mutágenos de acción directa, los valores de inhibición fueron similares.

Nuestros resultados indicaron que el método de pre-incubación mostró mayor sensibilidad que el método de incorporación en placa en todas las condiciones ensayadas.

Similares resultados fueron obtenidos por Cariño-Cortés y col. (2007) quienes observaron una mayor inhibición de la mutagénesis empleando el método de pre-incubación al evaluar extractos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* empleando el Ensayo de Ames. Estos autores vinculan los hallazgos a la formación de metabolitos antimutagénicos de corta duración que podrían tener una mejor oportunidad de reaccionar con la cepa de ensayo en el pequeño volumen de la mezcla de preincubación.

Considerando que tanto el EAB como el ácido clorogénico resultaron ser antimutagénicos frente a las cepas testigo y los mutágenos diagnóstico, resulta de interés evaluar en forma comparativa estos efectos.

5.3.2. Comparación de los efectos antimutagénicos del EAB y del ácido clorogénico

El análisis comparativo del efecto antimutagénico del EAB y del ácido clorogénico revelan que cuando se ensayó el ácido clorogénico en la concentración contenida en los 10,0 mg/placa del EAB (correspondiente a 0,10 mg/placa de ácido clorogénico) el EAB mostró mayor eficiencia protectora.

La comparación de la actividad antimutagénica entre el EAB y el ácido clorogénico indicó que se necesitó una concentración 5 veces mayor de ácido clorogénico para alcanzar una actividad antimutagénica similar a la observada en el EAB. Esto nos estaría indicando que la capacidad antioxidante, tanto del EAB como del ácido clorogénico contenido en la muestra, tendría vinculación con el efecto antimutagénico. Es probable que el EAB contenga otros compuestos antioxidantes (flavonoides, y otros cafeilquínicos) que podrían contribuir a la capacidad antimutagénica observada la cual es mayor a la observada con el ácido clorogénico puro.

Por otra parte, el efecto antimutagénico observado en el EAB con tres diferentes mutágenos ensayados sugeriría que éste extracto podría tener diferentes mecanismos de acción por parte de cada uno de los mismos, los que serían responsables de las variaciones observadas. Ello es objeto de análisis en los siguientes puntos.

5.4. Posibles mecanismos de antimutagénesis del EAB frente a diferentes mutágenos y cepas seleccionadas

A efectos de evaluar el mecanismo de la actividad antimutagénica se han propuesto dos categorías de antimutágenos denominados desmutágenos y bioantimutágenos de acuerdo a su modo de acción. Según se definió en el acápite 1.14, los desmutágenos son compuestos que inactivan al mutágeno antes que este sea incorporado en la célula bacteriana e incluyen los que actúan directamente sobre el mutágeno o sobre la actividad del mutágeno. Otros desmutágenos, en cambio inhiben la acción de las enzimas del sistema P450 durante la activación metabólica del mutágeno.

Por otra parte, los bioantimutágenos son compuestos que actúan sobre la reparación del DNA después de que el mutágeno ha infligido su daño en el mismo. A efectos de proponer un posible mecanismo de la antimutagenicidad encontrada en el EAB se presenta a continuación un análisis de la capacidad inhibitoria del EAB ejercida frente a cada mutágeno diagnóstico y la cepa testigo seleccionada.

5.4.1. 2-AF

El mecanismo exacto por el cual EAB inhibe la mutagenicidad de 2-AF no se conoce hasta el presente. Sin embargo, algunas sugerencias se pueden hacer sobre la base de los resultados encontrados en la presente Tesis Doctoral y aquellos informados previamente por otros grupos de investigación (Cariño- Cortés y col., 2007; Horn y Ferrañ Vargas, 2008). Para ello resulta importante considerar las rutas metabólicas del mutágeno 2-AF y las cepas testigo empleadas (TA98 y TA100).

Las aminas aromáticas, como lo es el 2-AF, son mutagénicas a través de un proceso de reducción que genera un radical anión nitro. La principal ruta de activación metabólica en la N-oxidación a hidroxilamina es mediante la enzima citocromo P4501A2 y la subsecuente activación por la enzima N-acetiltransferasa (NAT) (Dong y Guengerich, 1995). El 2-AF es un mutágeno que precisa de activación metabólica en la forma electrofílica para ser mutagénico y carcinogénico (Hereflich y Neft, 1994). En la **Fig. 23** se presenta la estructura molecular del 2-AF.

Ames y col. (1972) demuestran que ciertos metabolitos del carcinógeno 2-AF (especialmente 2-NF y N- hidroxi-2-aminofluoreno) y los derivados de cinco aminas aromáticas son carcinogénicas e inductores de mutaciones de corrimiento de marco de lectura.

El 2-AF, al igual que otras aminas aromáticas (N-2- acetilaminofluoreno (AAF), y su derivado N-2-(acetilamino) 7- iodofluoreno (AAIF), introducen aductos en el ADN y son considerados como mutágenos que otorgan importante información en relación a la actividad metabólica en procesos de mutagénesis y carcinogénesis (Hereflich y Neft, 1994). Además de ser los más estudiados por generar aductos en la posición C8 de la guanina del ADN, su estudio aporta información acerca de las consecuencias biológicas del daño sobre el mismo.

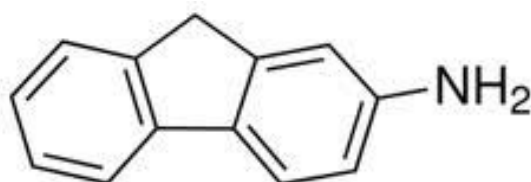


Fig. 22. Estructura química del 2-AF

En la **Fig. 24** se resume el proceso metabólico de las aminas aromáticas y compuestos relacionados.

Respecto a las cepas utilizadas en el Ensayo de Ames, la cepa testigo TA100 presenta una mutación en el gen *histG46* que codifica para la primera enzima de la biosíntesis de histidina. Esta mutación sustituye prolina por leucina en la secuencia del ADN (Ames, 1971). La cepa TA100 detecta mutágenos que causan sustitución de pares de bases que podría depender de las especies reactivas generadas por la N-oxidación del compuesto (Levine y col., 1994).

La cepa testigo TA98 presenta una mutación *HisD3052* (-1) de corrimiento de marco de lectura (delección del par de bases G-C). Esta mutación posee, además del complejo del corrimiento del marco de lectura, una sustitución de base (Levin y col., 1982). La mutación que causa corrimiento del marco de lectura es revertida por mutágenos dependientes de la estructura molecular plana del compuesto activo y permite su interacción con el ADN (Levine y col., 1994). Esta mutación compleja también requiere la presencia de sitios moleculares capaces de formar aductos en el ADN (mayoritariamente C-8-G). Este efecto es inducido por las aminas aromáticas en presencia de activación metabólica (Levine y col., 1994).

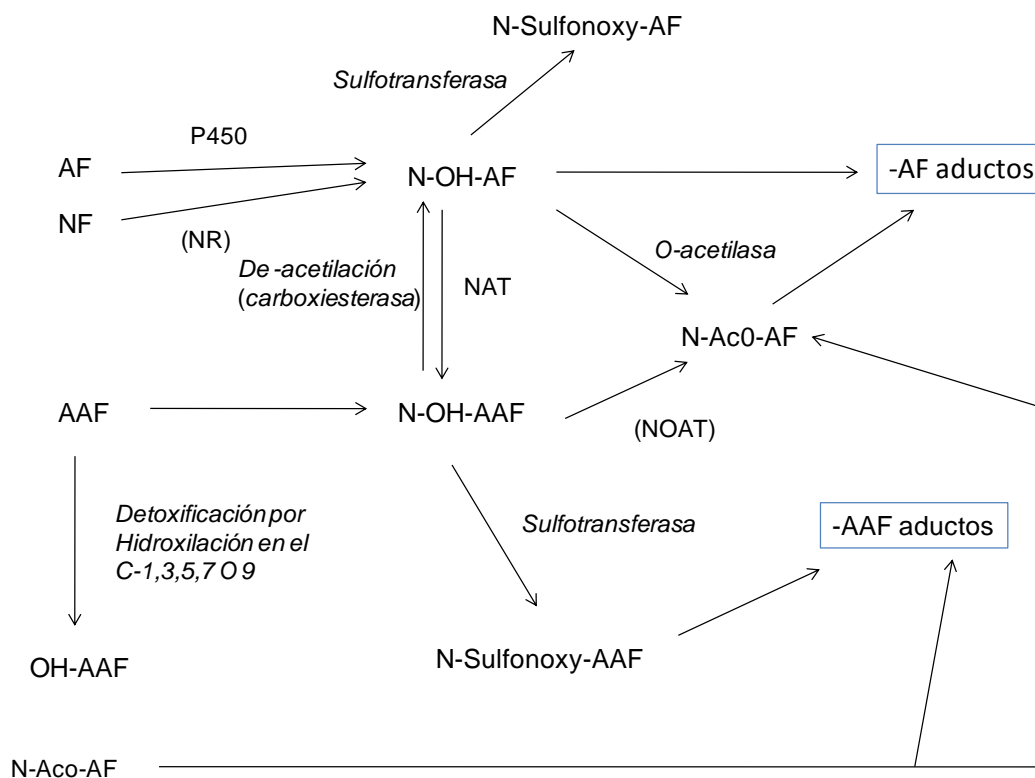


Fig. 23. Descripción del metabolismo del AAF y AF y compuestos relacionados AAF: N-2-acetilaminofluoreno; NF: 2-nitrofluoreno; N-Aco-AAF: N-acetoxi-N-2-acetilaminofluoreno; N-Aco-AF: N-acetoxi-N-2-aminofluoreno; N-OH-AAF: N-hidroxi-N-2-acetilaminofluoreno; OH-AAF: varios C-hidroxilados derivados del AAF; N-OH-AF: N-hidroxi-N-2-aminofluoreno. Enzimas activas: P450: citocromo monoxigenasas; NR: nitroreductasas; NAT: N-acetiltransferasa; NOAT: N,O-acetiltransferasa (modificado de Hereflich y Neft, 1994)

Existen diversos estudios de antimutagénesis realizados con extractos de plantas empleando el Ensayo de Ames (cepas TA98 y TA100) y el mutágeno diagnóstico 2-AF.

Horn y Ferrañ Vargas (2008) evaluaron la antimutagenicidad de extractos acuosos de tres especies pertenecientes a la familia *Asteraceae* y *Lamiaceae* (plantas de uso

medicinal popular en Brasil) utilizando el Ensayo de Ames. Demostraron que los mismos presentaron un efecto antimutagénico muy significativo frente a la mutagenicidad inducida por el pro-mutágeno 2-AF (5 µg/placa) utilizando el método de pre-incubación encontrando un porcentaje de inhibición de la mutagenicidad del 67% y 100% para la cepa TA98 y TA100, respectivamente. Los autores sugieren que este efecto protector posiblemente esté relacionado con las propiedades descritas para los flavonoides y/o taninos actuando como inactivadores potenciales de las enzimas comprometidas con el metabolismo del mutágeno. En concordancia con lo anterior, nuestros resultados indicaron que al co-incubar el EAB con el pro-mutágeno 2-AF (2,50 µg/placa) se obtuvo un %I en un rango de 95,0±0,7-100,0±0,1 % (para la mayor concentración de EAB 10,0 mg/placa) y de 84,0±0,2-92±2,1% con las cepas TA100 y TA98, respectivamente, utilizando el método de pre-incubación (Tabla 24).

Numerosos autores sugieren que el efecto inhibitorio ejercido por diferentes extractos de plantas y hierbas frente al pro-mutágeno 2-AF podría deberse a un proceso de desactivación del pro-mutágeno mediado por el bloqueo de las enzimas comprometidas con el metabolismo del mutágeno (Teel, 1986; Calomme y col., 1996; Shih y col., 2000; Kweon y col., 2001; Chan y col., 2011; Yun y col., 2012).

Asimismo, Kaur y col. (2001) analizaron la capacidad inhibitoria de los extractos del té negro y Oolong frente a la mutagenicidad inducida por el 2-AF utilizando el Ensayo de Ames con la cepa TA98 y TA100. Estos autores sugieren que algún compuesto antimutágeno presente en las fracciones de los extractos de té

interactuarían específicamente con el sistema microsomal citocromo P450 del homogeneizado de hígado, necesario para la activación del mutágeno. De manera semejante, Cariño- Cortés y col. (2007) analizaron la antimutagénesis ejercida por los extractos de las plantas medicinales tales como *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* mediante el Ensayo de Ames frente al mutágeno indirecto 2-aminoantraceno utilizando las cepas TA98 y TA100 y el método de pre-incubación. Estos autores demostraron que para ambas cepas y en ambas especies de plantas, la inhibición de la mutagenicidad mostró un porcentaje de inhibición del 94-99%. Los mismos sugieren que la reducción de la mutagenicidad del 2-aminoantraceno podría deberse a la capacidad de los extractos de estas plantas de interferir con la activación metabólica del pro-mutágeno, funcionando así como un agente bloqueador.

Según De Flora (1997), los inhibidores de la mutagénesis y de la carcinogénesis actúan por impedimento o modulación de la cascada de eventos involucrados en los pasos consecutivos de las mutaciones y el cáncer. Por otro lado, otros estudios realizados sobre la capacidad inhibitoria de fenoles naturales presentes en las plantas (e.g., ferúlico, cafeico, clorogénico y elágico) sobre la mutagénesis del benzo(α)pireno, utilizando el Ensayo de Ames como modelo experimental, pondrían en evidencia que una concentración relativamente alta de ácido clorogénico, ferúlico y cafeico (dosis de 150, 75 y 50 nmol respectivamente) es requerida para bloquear la mutagenicidad del benzo(α)pireno en un 50% (Wood y col., 1982) .

Asimismo, estos autores demostraron que el efecto antimutagenico de los fenoles resulta de la interacción directa con el benzo(α)pireno 7,8-diol-9, 10-epoxido-2.

Varios autores sugieren que la respuesta antimutagénica podría vincularse a la inhibición competitiva de las isoenzimas del citocromo P450 presentes en el hígado (Edenharder y col., 1993; Edenharder y Tang 1997; Edenharder y col., 2003).

Buening y col. (1981) también postularon que algunos flavonoides son potentes inhibidores de citocromo P450 reductasa. Este tipo de actividad protectora, después de la activación metabólica, ha sido relacionada con la función de las isoformas del citocromo P450 en el sistema de desintoxicación con reductasa y/o oxigenasa, cuya función en el sistema antioxidante es neutralizar compuestos que generan radicales de oxígeno, radicales libres y especies reactivas del oxígeno (Kappus, 1986). Por lo tanto, el mayor potencial antimutagénico observado en ensayos se observa siempre en presencia de la fracción microsomal metabólica. Esto puede estar relacionado con la activación de un citocromo P450 que media la oxidación de promutágenos (Mitscher y col., 1986). En este sentido, se ha informado que el compuesto químico luteolina (una flavona encontrada en *B. trimera*) es un potente inhibidor del CY1A2 (Edenharder y col., 1993). Este compuesto es conocido como fuerte desmutágeno y muestra una importante actividad antimutagénica llegando a valores cercanos al 94% (Samejima y col., 1995).

Del análisis de la bibliografía, se desprende que la mayoría de los extractos de plantas frente al pro-mutágeno 2-AF ejercerían su acción antimutagénica mediante el mecanismo de tipo desmutágenos.

Los resultados encontrados en la presente Tesis Doctoral indicaron que el EAB mostró capacidad antimutagénica frente al mutágeno indirecto 2-AF. Estos resultados permitirían sugerir que compuestos presentes en el EAB podrían interactuar con algunas enzimas específicas presentes en la activación metabólica que resultan necesarias para la metabolización del pro-mutágeno.

Teniendo en cuenta que el Ensayo de Ames es una prueba basada en la reversión de la mutación, la diferente respuesta de las cepas bacterianas resulta dependiente de la mutación puntual que genera su condición auxótrofa *his⁻*.

Cuando la cepa TA100 fue utilizada como indicadora, el efecto inhibitorio resultó independiente de las concentraciones ensayadas y se obtuvo una inhibición completa de la mutagenicidad inducida por 2-AF en presencia del EAB con el método de pre-incubación (**Fig 19**). Por el contrario, cuando se utilizó la cepa TA98 como cepa indicadora, el efecto protector del EAB se comportó dependiente de las concentraciones utilizadas (**Fig. 16 y 17**) y se observó un efecto antimutagénico parcial. Ello nos indicó que la actividad inhibitoria del EAB frente al pro-mutágeno 2-AF se comporta en forma diferente y muy probablemente debido a la diferencias genotípicas de la cepa testigo utilizada TA100 o TA98.

Por otra parte, entre los constituyentes del EAB encontramos al ácido clorogénico que ha mostrado una actividad antioxidante y antimutagénica efectiva frente a la mutagenicidad inducida por el 2-AF en las cepas TA98 y TA100 (Acápite 4.4.2).

Nakasugi y Komai (1998) analizaron la actividad antimutagenica de cuatro flavonas aisladas de *B. trimera* (cirsimaritina, hispidulina, apigenina y luteolina) las cuales mostraron fuerte actividad antimutagénica (72-90%) en el Ensayo de Ames.

Se ha informado que el ácido clorogénico suprime la actividad mutagénica de la N-metil-N-nitro-nitrosoguanidina en *S. typhimurium* cepa TA1535 por captura de productos electrofílicos generados por los compuestos carcinogénicos (Chen y col., 1996).

Nuestros resultados sugieren que tanto el EAB como el ácido clorogénico podrían estar involucrados en la captura de productos electrofílicos debido a que ambos mostraron propiedades antioxidantes inhibiendo al radical libre DPPH* como se presentó en este trabajo de Tesis Doctoral (Acápite 4.1.2). Por ello, la actividad antimutagénica del EAB observada podría estar vinculada con la inhibición de la ruta de reducción de las aminas aromáticas. Una interpretación similar se encuentra en los trabajos de Beudot y col. (1998); estos autores informan sobre la actividad antimutagénica de flavonas sintéticas evaluadas mediante el Ensayo de Ames empleando 2-AF como mutágeno de referencia.

De esta forma, podríamos inferir que los compuestos presentes en el EAB podrían ejercer su acción antimutagénica mediante un mecanismo denominado desmutágeno.

5.4.2. 2-NF

Los fluorenos, pirenos y fluorantenos son los hidrocarburos policíclicos aromáticos que se encuentran en gran cantidad en la atmósfera, siendo el 2-NF (**Fig. 25**) y el

nitroareno dominantes en la misma, seguido por los nitrofluorenos, 3-nitrofluorantreno y nitropirenos (Edenharder y Tang, 1997).

El 2-NF es un mutágeno de acción directa, reconocido como iniciador y promotor del proceso de carcinogénesis y formación de aductos en el ADN de células de animales de laboratorio (Möller, 1994). Es conocido que en mamíferos expuestos en condiciones de laboratorio, este agente después de ser inhalado, produce potentes metabolitos mutagénicos. Entre los mismos se pueden mencionar nitrofluorenos hidroxilados que migran al torrente sistémico. A su vez después de ser inhalado es reducido por la microflora intestinal a su correspondiente amina, el AAF, el cual es un potente carcinógeno (**Fig. 24**) (Hereflich y Neft, 1994). La inducción del sistema P450 afecta a este metabolito y se forma mayor cantidad de N-OH-AAF, un potente agente mutagénico (Möller, 1994; Bichara y Fuchs, 1985).

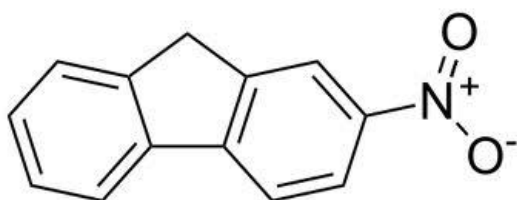


Fig. 24. Estructura química del mutágeno 2-NF

Mosovská y col. (2010) analizaron el efecto antimutagénico de diferentes extractos de pseudocereales (*Amarantus* sp., *Sorghum bicolor* y *Echinochloa frumentacea*) frente al mutágeno de acción directa 2-NF y confirmaron que la inhibición producida por estos extractos es dependiente de la concentración de los mismos.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, el EAB presentó, bajo nuestras condiciones ensayadas, un efecto antimutagénico frente a la mutagenicidad inducida por el mutágeno de acción directa 2-NF, con la cepa testigo TA98.

El 2-NF actúa como mutágeno de acción directa e induce mutaciones de corrimiento de marco de lectura debido a la formación de aductos (Rosenkranz y Mermelstein, 1983). La mutación depende de la forma planar de la molécula del compuesto activo, lo cual permite su intercalación en el ADN.

Horn y Ferrañ Vargas (2003) proponen que los extractos de plantas probablemente puedan ejercer su efecto protector por un mecanismo de intercepción del mutágeno. Asimismo, estos autores proponen que también podrían actuar desactivando el 2-NF y así, por consiguiente, bloquear la inducción de daño del mutágeno en el ADN.

Rossi y col. (2003) estudiaron la capacidad antimutagénica de la planta sudamericana Sangre de Drago (*Croton lechleri*, Euphorbiaceae), utilizada en medicina folclórica, y encontraron que la capacidad protectora frente a la mutagenicidad inducida por el 2-NF en la cepa TA98 resultó ser moderada, con un %I de 45% al utilizar 500 µg/placa.

Horn y Ferrañ Vargas (2003) informaron resultados interesantes en relación a la capacidad antimutagénica demostrada en dos plantas medicinales, *Maytenus ilicifolia* y *Peltastes peltatus*, ricas en flavonoides y taninos. La mayor inhibición frente a la mutagenicidad inducida por el 2-NF utilizando la cepa TA98 la obtuvieron con *M. ilicifolia* en las dosis de 125 ó 375 mg/placa con un %I de 50,56 ó 52,90%

respectivamente. Estos autores concluyen que esta protección frente a la mutagenicidad del agente sería mediada a través de un mecanismo de intercepción del mutágeno, más que por alteración de la actividad enzimática. La desactivación se produciría bloqueando directamente el 2-NF, no permitiendo de esta manera ejercer daño sobre el ADN bacteriano.

Evandri y col. (2005) en estudios similares y utilizando también la cepa TA98, para analizar la capacidad antimutagénica del aceite de lavanda (*Lavandula angustifolia*) frente al mutágeno 2-NF, obtienen un %I máximo frente al 2-NF del 66,4% con una concentración de 0,28 mg/placa. En coincidencia con los autores antes mencionados, sugieren que el aceite de lavanda probablemente protege el ADN de la mutación mediante la intercepción del agente mutagénico. Estos autores agregan que este efecto inhibidor del aceite de lavanda sería directamente ejercido por un mecanismo de desactivación del 2-NF bloqueando así el mutágeno que daña el ADN.

Cabe mencionar que otros autores, luego de analizar los nitro derivados (nitroarenos), como el 2-NF, frente a la capacidad inhibitoria de varios compuestos de la clase de los polifenoles, plantean en forma especulativa otro mecanismo factible y concebible, tal como la interferencia con el mecanismo que conduce a la mutagenicidad o los efectos de los flavonoides sobre el sistema de reparación, fijación y expresión del daño causado por el 2-NF, 2-3-nitrofluorantreno y nitropirenos (Edenharder y Tang, 1997).

Otro posible mecanismo propuesto para la acción protectora ejercida por los extractos de plantas es la adsorción de los mutágenos, los que han sido asociados a pigmentos pirrolicos tales como la clorofila (Arimoto y col., 1995; Ferguson y col., 2004; Nogueira y col., 2006).

Nuestros resultados muestran que el EAB ejerce un efecto antimutagénico frente al mutágeno de acción directa 2-NF (sin activación metabólica), lo cual excluiría alguna interacción entre los componentes del EAB y el sistema de enzimático presente en la activación metabólica.

Asimismo, el principal compuesto hallado en el EAB (ácido clorogénico), también mostró una actividad antimutagénica efectiva frente a la mutagenicidad del 2-NF en la cepa TA98 (Acápite 4.2.1). La mayor inhibición de la mutagénesis se logró con la mayor concentración de clorogénico ensayada (0,50 mg/placa). En esta concentración, el ácido clorogénico mostró un efecto antimutagénico frente al 2-NF presentando un %I del $75,5 \pm 0,4\%$.

De esta forma, podríamos sugerir que los compuestos presentes en el EAB podrían ejercer su acción antimutagénica frente al 2-NF mediante un mecanismo de desmutágenos, a través de un mecanismo de intercepción, bloqueando parcialmente el agente de acción directa 2-NF.

5.4.3. AZS

La AZS es un potente mutágeno (**Fig. 26**) y un agente muy común en los laboratorios químicos, además de ser extensamente utilizado en los laboratorios industriales (gas nitrógeno de los “airbags” de los autos, entre otros ejemplos), la agricultura,

prácticas médicas y en estudios de síntesis orgánica. Químicamente es la base conjugada del ácido hidrazoico, es un anión linear que tiene propiedades isoelectricas con CO₂ y N₂O. Según la teoría del enlace de valencia, la AZS puede ser descrita con diferentes estructuras resonantes, siendo una de la más importante la que se presenta a continuación.

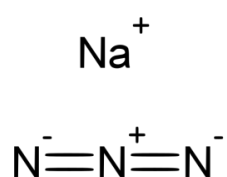


Fig. 25. Estructura química de la AZS

Anjana y col. (2007) en estudios realizados con extractos metabólicos de la planta espino amarillo (*Hippophae Rhamnoides* Linn.) planta medicinal india, demostraron un efecto antimutagénico moderado frente a la AZS empleando el Ensayo de Ames y las cepas TA98 y TA100, con un %I en el rango de 41-46% respectivamente para una concentración de $2,50 \times 10^7$ mg/ml. Estos autores sugieren que la capacidad inhibitoria de estos extractos probablemente sea a través de un mecanismo antioxidante.

Rossi y col. (2003) realizaron estudios de la capacidad antimutagénica de la planta medicinal *Croton lechleri* frente a la mutagenicidad de la AZS y concluyeron que una concentración de 1mg/placa de la planta posee una leve actividad antimutagénica con %I de 34%.

Similares valores de %I se obtuvieron en el presente trabajo de Tesis Doctoral con el EAB en concentraciones de 1,0 y 10,0 mg/placa frente a la mutagenicidad de la AZS que mostró una baja efectividad llegando a valores máximos de inhibición de $40,0 \pm 2,0$ y $41,0 \pm 2,0\%$ respectivamente con el método de pre-incubación utilizando la cepa TA100 (**Tabla 23**).

Asimismo, el principal compuesto fenólico (ácido clorogénico) hallado en el EAB ha mostrado una actividad antimutagénica frente a la mutagénesis de la AZS en la cepa TA100 (Acápite 4.2.1) con un %I que varió entre $36,0 \pm 0,3$ y $41,0 \pm 0,72\%$ en el rango de concentraciones ensayadas 0,10 – 0,50 mg/placa (Tabla 25).

Estos resultados sugieren que la actividad antimutagénica hallada en el EAB frente a la AZS sería probablemente a través de un mecanismo antioxidante, propiedad que ha sido demostrada tanto en el EAB como en el ácido clorogénico.

Por otra parte otro posible efecto antimutagénico informado en diversas plantas sobre la mutagenicidad de la AZS sugieren que el mecanismo protector frente a este mutágeno podría depender de la activación metabólica bacteriana del mutágeno (AZS). De acuerdo con esta hipótesis se ha informado que la mutagénesis de la AZS inorgánica (N³-) estaría mediada por un metabolito orgánico, la L-azidoalanina, en el medio ambiente bacteriano (Owais y Kleinhofs, 1988). Por ello podríamos sugerir que en el EAB podrían coexistir diversos compuestos además del ácido clorogénico los cuales interferirían con la activación bacteriana del mutágeno. Este mecanismo también forma parte del denominado desmutágeno.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados encontrados y de la discusión planteada en la presente Tesis Doctoral se presentan las siguientes conclusiones:

La caracterización del EAB mediante HPLC permitió detectar al ácido clorogénico como el principal y mayoritario polifenol de la muestra.

El contenido de ácido clorogénico presente en el EAB fue de 2,05 mg/ml de EAB que corresponde a 1 g/100 g de material seco (1%).

No se detectó ácido cafeico en el EAB similarmente a lo informado por otros autores.

El EAB en una concentración de 150 µg/ml mostró capacidad antioxidante inhibiendo en un 76,1% al radical DPPH* siendo este valor similar al observado para otros extractos de plantas que presentan propiedades antioxidantes.

El estudio de la actividad antioxidante del EAB mostró un valor de CE_{50} de 101,86 µg/ml siendo comparable a la informada para otras especies del género *Baccharis*.

El valor de CE_{50} para el ácido clorogénico fue de $CE_{50}= 0,269$ µg/ml, indicando una mayor eficiencia inhibitoria del ácido clorogénico frente al DPPH* que el EAB.

El EAB en el rango de las concentraciones ensayadas (1,0 y 10,0 mg/placa) no resultó ser tóxico frente a las cepas de *S. typhimurium* TA98 y TA100 en el Ensayo de Ames empleando tanto el método de pre-incubación como el de incorporación en placa.

El ácido clorogénico en el rango de las concentraciones ensayadas (0,05 y 0,50 mg/placa) no resultó ser tóxico frente a las cepas de *S. typhimurium* TA98 y TA100 en el Ensayo de Ames empleando el método de pre-incubación.

El EAB en el rango de las concentraciones ensayadas (1,0 y 10,0 mg/placa) no resultó ser mutagénico frente a las cepas de *S. typhimurium* TA98 y TA100 en el Ensayo de Ames en sus dos variantes: incorporación en placa y pre-incubación.

El ácido clorogénico en el rango de las concentraciones ensayadas (0,05 y 0,50 mg/placa) no resultó ser mutagénico frente a las cepas de *S. typhimurium* TA98 y TA100 en el Ensayo de Ames en sus dos varianteslos incorporación en placa y pre-incubación.

El EAB en el rango de concentraciones estudiadas (1,0 y 10,0 mg/placa), utilizando el Ensayo de Ames, resultó ser antimutagénico sobre la mutagenicidad inducida por los mutágenos de acción directa 2-NF y AZS, sobre las cepas TA98 y TA100 respectivamente y la mutagenicidad inducida por el pro-mutágeno 2-AF (con activación metabólica) sobre las cepas TA98 y TA100.

Comparando ambos métodos del Ensayo de Ames (incorporación en placa y pre-incubación), la mayor inhibición de la mutagénesis ejercida por el EAB se obtuvo empleando el método de pre-incubación con %I que variaron entre 28,0±0,5% y 92,0±2,1,% para la cepa TA98 y de 5,0±4,2 a 100,0±0,1% para la cepa TA100.

Empleando el Ensayo de Ames (método de preincubación), el EAB mostró actividad antimutagenica frente a la cepa TA98 inducida por diferentes concentraciones del mutágeno 2-AF con activación metabólica que varió con la concentración de EAB utilizada. Con 1,0 mg/placa de EAB los valores de los %I de la mutagenicidad variaron entre 28,0±0,5 y 41,0±5,8%. Con 10,0 mg/placa de EAB los %I de la mutagenicidad variaron entre 84,0±0,9 y 92,0±2,1%.

Empleando el Ensayo de Ames (método de pre-incubación), el EAB mostró actividad antimutagénica frente a la cepa TA98 inducida por diferentes concentraciones del mutágeno 2-NF (sin activación metabólica) que varió con la concentración de EAB utilizada. Con 1,0 mg/placa de EAB los %I de la mutagenicidad variaron entre $60,0 \pm 1,4$ y $71,0 \pm 0,3\%$. Con 10,0 mg/placa de EAB los %I de la mutagenicidad variaron entre $59,0 \pm 1,1$ y $91,0 \pm 0,4\%$.

Empleando el Ensayo de Ames (método de pre-incubación), el EAB mostró actividad antimutagénica frente a la cepa TA100 inducida por diferentes concentraciones del mutágeno 2-AF (con activación metabólica) que varió con la concentración de EAB utilizada. Con 10,0 mg/placa de EAB los %I de la mutagenicidad variaron entre 95 y 100%.

Empleando el Ensayo de Ames (método de pre-incubación), el EAB mostró actividad antimutagenica frente a la cepa TA100 inducida por el mutágeno AZS (sin activación metabólica) que varió con la concentración de EAB utilizada. Con 1,0 mg/placa de EAB los %I de la mutagenicidad variaron entre $5,0 \pm 4,2\%$ y $40,0 \pm 2,0\%$. Con 10,0 mg/placa de EAB los %I de la mutagenicidad variaron entre $11,0 \pm 4,1$ y $41,0 \pm 2,0\%$.

Con el Ensayo de Ames (método de pre-incubación), el ácido clorogénico presentó actividad antimutagénica frente a la cepa TA98 inducida por el mutágeno 2-AF (con activación metabólica) que varió con la concertación utilizada. Empleando 0,10 y 0,50 mg/placa de ácido clorogénico el %I de la mutagenicidad fue de $29,0 \pm 0,3$ y $84,0 \pm 0,1\%$ respectivamente.

Empleando el Ensayo de Ames (método de preincubación), el ácido clorogénico presentó actividad antimutagénica frente a la cepa TA98 inducida por el mutágeno 2-NF (sin activación metabólica) que varió con la concentración utilizada. Con 0,10 y 0,50 mg/placa de ácido clorogénico el %I de la mutagenicidad fue $44,0 \pm 0,7\%$ y $75,5 \pm 0,4\%$ respectivamente.

Empleando el Ensayo de Ames (método de pre-incubación), el ácido clorogénico presentó actividad antimutagénica frente a la cepa TA100 inducida por el mutágeno 2-AF (con activación metabólica) que varió con la concentración utilizada. Con 0,10 y 0,50 mg/placa de ácido clorogénico el %I de la mutagenicidad fue de $76,0 \pm 0,2\%$ y $98,9 \pm 0,1\%$ respectivamente.

Empleando el Ensayo de Ames (método de pre-incubación), el ácido clorogénico presentó actividad antimutagénica frente a la cepa TA100 inducida por el mutágeno AZS (sin activación metabólica) que varió con la concentración utilizada. Con 0,10 y 0,50 mg/placa de ácido clorogénico el %I de la mutagenicidad fue de $36,0 \pm 0,3\%$ y $41,0 \pm 0,72\%$ respectivamente.

La comparación de la actividad antimutagénica entre el EAB y el ácido clorogénico indicó que se necesitó una concentración 5 veces mayor de ácido clorogénico para alcanzar una actividad antimutagénica similar a la observada en el EAB, lo cual indica que otros compuestos presentes en EAB podrían generar la capacidad antimutagénica observada.

El efecto antimutagénico aplicando el Ensayo de Ames, del EAB y el ácido clorogénico frente a tres diferentes mutágenos ensayados permitiría sugerir que

podrían operar diferentes mecanismos antimutagénicos puesto en evidencia en este Trabajo de Tesis.

La actividad antimutagénica observada con el Ensayo de Ames del EAB frente al pro-mutágeno 2-AF podría producirse mediante un mecanismo de desmutágeno, dado por la interferencia o bloqueo de las enzimas microsomales involucradas en la activación metabólica de este mutágeno.

Existen diferencias en la actividad antimutagénica en el EAB cuando se la caracteriza con el Ensayo de Ames, según las cepas estudiadas, las que resultan ser dependientes de las características genéticas de cada cepa.

La antimutagénesis resultó ser mayor para la cepa TA100 que para la cepa TA98 empleando el método de pre-incubación con el Ensayo de Ames, pudiendo ser atribuido a que en esta última la mutación resultante constituye un complejo del corrimiento del marco de lectura más una sustitución de bases.

La antimutagénesis del EAB sobre el mutágeno de acción directa 2-NF podría ser ejercida mediante un mecanismo de intercepción del mutágeno. La desactivación se produciría bloqueando directamente al agente, no permitiendo de esta manera ejercer daño sobre el ADN bacteriano, de acuerdo al diseño empleado en el Ensayo de Ames en el marco de esta Tesis Doctoral.

La antimutagenicidad observada del EAB sobre el mutágeno AZS podría ser según el Ensayo de Ames y el diseño experimental implementado, debida a un mecanismo de intercepción en la actividad metabólica bacteriana también denominado desmutágeno.

Un mecanismo relacionado con la vía antioxidante del EAB, acentuado por la presencia del ácido clorogénico y otros compuestos derivados como los cafeilquínicos, podrían ser responsables o al menos contribuir a los efectos observados.

Conclusiones finales de la Tesis Doctoral

El EAB, mostró capacidad antimutagénica en el Ensayo de Ames, con las cepas *S. thyphimurium* TA 98 y TA100 utilizando dos variantes del ensayo (incorporación en placa y pre-incubación). Dicha actividad estaría vinculada a la capacidad antioxidante del EAB, la presencia del ácido clorogénico y otros compuestos bioactivos presentes en la infusión.

Prespectivas futuras

Posibles temas de investigación a ser desarrollados:

- 1) Profundizar en los posibles mecanismos de quimioprotección implicados en el efecto antimutagénico ejercido por el EAB, frente a los diferentes mutágenos.
- 2) Evaluación de la actividad antioxidante y antimutagénica de otros compuestos bioactivos presentes en *B. articulata* (Lam.) Persoon.
- 3) Futuros ensayos de genotoxicidad en experimentos *in vivo*.

7. BIBLIOGRAFIA

Abad M. J., P. Bermejo, S. S. Palomino, X. Chiriboga y L. Carrasco. 1999. Antiviral activity of some South American medicinal plants. *Phytotherapy Research* 13:142–146.

Abad M. J. y P. Bermejo. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc* 2:76-96.

Abdullaev F. I., L. Riverón-Negrete, R. Caballero-Ortega, J. M. Hernandez, I. Perez-Lopez, R. Pereda-Miranda y J. J. Espinosa- Aguirre. 2003. Use of *in vitro* assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effect of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicology In Vitro* 17: 731-736.

Aguirre P. 2007. Las transiciones alimentarias en el tiempo de la especie. Una mirada desde la antropología. En: *Obesidad, Saberes y Conflictos*. J. Braguinsky (Ed.). Fundación Favaloro-AWWE. Madrid. Tomo1. Capítulo 4.

Alonso J. R. 1998. Tratado de fitomedicina: bases y clínicas farmacológicas. Isis (Ed.). Buenos Aires. Pp. 350-354.

Ames B. N. 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. En: *Chemical mutagens, principles and methods for detection*. Hollaender A. (Ed.). Plenum, New York 1: 267-282.

Ames B. N. 1972. A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens, in mutagenic effects of environmental contaminants. Sutton H. E. y Harris M. I. (Eds.). Academic Press, New York. Pp. 57-66.

Ames B. N., F. D. Lee y W. E. Durston. 1973. An improved bacterial tester system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 70: 782-786.

Anjana B., A. Saroj, N. Avinash, S. Bikram y P. S. Ahuja. 2007. Evaluation of *in vitro* antimutagenic activity of “seabuckthorn” (*Hippo-phae Rhamnoides* Linn.) in Ames assay. Journal of Chinese Clinical Medicine 21: 428-434.

ANMAT. 2011. Expediente 1- 47-1110 283/11-9. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica. Ministerio de Salud, Secretaría Política, Regulación e Institutos. Buenos Aires, Argentina.

Arimoto S., K. Kan-Yama, H. Rai y H. Hayatsu. 1995. Inhibitory effect of hemin, chlorophyllin and related pyrrole pigments on the mutagenicity of benzo(a)pyrene and its metabolites. Mutation Research 345: 127-135.

Ashwell M. 2005. Conceptos sobre alimentos funcionales. Concise Monograph Series. International Life Sciences Europe, ILSI . Brown N. L. (Ed.) Washington DC USA. Pp. 1-6.

Bandoni A. L., R. V. D. Rondina y J. D. Coussio. 1972. Estudio fitoquímico de plantas indígenas argentinas. Revista de Investigación Agropecuaria INTA 9: 49-53.

Beudot C., M. P. De Méo, D. Dauzonne, R. Elias, M. Laget, H. Guiraud, G. Balasard y G. Duménil. 1998. Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of forty-two 3-substitued flavones in Ames test. Mutation Research 417: 141-153.

Bhattacharya S. 2011. Natural antimutagens: a review. Research Journal of Medicinal Plant 5: 116-126.

Bichara M. y R. P. P. Fuchs. 1985. DNA binding and mutation spectra of the carcinogen N-2-aminofluorene in *Escherichia coli*. A correlation between the conformation of the premutagenic lesion and the mutation specificity. Journal of Molecular Biology 183: 341-351.

Boelcke O. 1981. Plantas vasculares de la República Argentina nativas y exóticas FECIC, Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Buenos Aires, Argentina. Pp. 265.

Borgo J., D. P. Rosa y V. M. F. Vargas. 2004. Mutagenicidade do extracto aquoso de *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon no ensaio *Salmonella*/microsoma. Revista Brasileira de Toxicología 85: 37-43.

Brand-Williams W., M. E. Cuvelier y C. Berset. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology 28: 25–30.

Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutrition Reviews 56: 317-33.

Buening M. K., R. L. Chang, M. T. Huang, J. G. Fortner, A. W. Wood y A. H. Conney. 1981. Activation and inhibition of benzo(a)pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. Cancer Research 41: 67-72.

Bunkova R., I. Morova y M. Nemec. 2005. Antimutagenic properties of green tea. Plant Foods for Human Nutrition 60: 25-29.

Calomme M., L. Pieters, A. Vlietinck y D. Vanden Berghe. 1996. Inhibition of bacterial mutagénesis by citrus flavonoids. Planta Medica 62: 222-226.

Campeato V. R., U. Graf, M. L. Reguli y H. H. Rodrigues de Andrade. 1997. Recombinagenic activity of integerrimine, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio brasiliensis*, in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Environmental and Molecular Mutagenesis 29: 91-97.

Campillo Alvarez J. E. 2011. El mono obeso. Critica (Ed.). Barcelona. Pp. 50-58.

Cañigüeral S. y R. Vila. 2001. Principios de la fitoterapia. En: Plantas medicinales y fitoterapia. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid 1: 173-193.

Cañigüeral S., E. Dellacassa y E. Bandoni. 2003. Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo? Acta Farmacéutica Bonaerense 22: 265-78.

Cariddi L. N., F. M. Escobar, M. C. Sabini, C. V. Torres, J. Zygodlo y L. I. Sabini. 2010. First approaches in the study of cytotoxic and mutagenic damage induced by cold aqueous extract of *Baccharis articulata* on normal cells. Molecular of Medicinal Chemistry 21: 4-7.

Cariddi L. N., F. M. Escobar, M. C. Sabini, C. V. Torres, E. Reinoso, A. Cristofolini, L. Comini, S. Nuñez Montoya y L. Sabini. 2012. Apoptosis and mutagenicity induction

by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. Food and Chemical Toxicology 50: 155-161.

Cariño–Cortés R., J. M. Hernandez-Ceruelos, M. Torres-Valencia, M. Gonzales-Avila, M. Arriaga-Alba y E. Madrigal-Bujaidar. 2007. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames Test. Toxicology In Vitro 21: 691-697.

Castañeda C. B., Q. B. Ramos y V. L. Ibañez. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico 8:56-72.

Chan E. W., Y. Y. Lim y S. P. Tan. 2011. Standardized herbal extract of chlorogenic acid from leaves of *Etlingera elatior* (Zingiberaceae). Pharmacognosy Research 3:178-84.

Chen, Z. Y., P. T. Chan, K. Y. Ho, K. P. Fung y J. Wang. 1996. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. Chemistry and Physics of Lipids 97: 157-163.

Chu K. C., K. M. Patel, R. E. Tarone, M. S. Linhart y V. C. Dunkel. 1981. Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assay. Mutation Research 85: 119-32.

Cifuentes D. A., J. C. Gianello, A. O. M. María, E. M. Petenatti, M. E. Petenatti, L. A. Del Vitto y C. C. Tonn. 2010. Choleretic activity of five species of *Baccharis* ("carquejas") used as phytotherapies in Argentinean traditional medicine. *Latin American Journal of Pharmacy* 29: 1053-1056.

Coelho M. G. P., P. A. Reis, V. B. Gava, P. R. Marques, C. R. Gayer, G. A. T. Laranja, I. Felzenswalb y K. C. C. Sabino. 2004. Anti-arthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. *Toxicology Letters* 154: 69–80.

Czeczot H., B. Tudek, J. Kusztalak, T. Szymczyk, B. Dobrowolska, G. Glinkowska, J. Malinowski y H. Strzelecka. 1990. Isolation and studies of the mutagenic activity in Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. *Mutation Research* 240: 209- 216.

Czok G., W. Midani y R. I. Finke. 1971. Effect of some phenols and hydroxyphenyl carboxy acid on biliary secretion and intestine motility. *Colloquium International Chemicum Cafes* 5: 408-416.

Dai J. R., R. Suttisri, E. Bordas, D. D. Soejarto y A. D. Kinghorn. 1993. Clerodane diterpenoids from *Baccharis articulata*. *Phytochemistry* 34: 1087-1090.

Debenedetti S. L., E. Spegazzini, S. Águila, M. V. Rodríguez, S. Gattuso, A. Herriques, M. Apel y A. M. Aboy. 2006. Carqueja (*Baccharis trimera*). Eficiencia seguridad y determinación de parámetros de seguridad. 1er Congreso Iberoamericano de Fitoterapia. Revista de Fitoterapia 6: Supl.1. Pp. 75.

De Flora S. 1978. Metabolic deactivation of mutagens in the *Salmonella*-microsome test. Nature 271: 455-456.

De Flora S. 1997. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mutation Research 402: 151-158.

de la Sota E. R. 1977. The problems of threatened and endangered plant species and plant communities in Argentina. In extinction is forever. Prance G. T. y Elias T. S. (Eds). Botanical Garden New York USA. Pp. 240-244.

De Oliveira S. Q., F. Dal-Pizzol, G. Gosmann, D. Guillaume, J. C. F. Moreira y E. P. Schenkel. 2003. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. Free Radical Research 37: 555-559.

De Oliveira S. Q., F. Dal-Pizzol, F. C. F. Moreira Schenkel y G. Gosmann. 2004. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. Acta Farmacéutica Bonaerense 23: 365-368.

Dong M. S. y F. P. Guengerich. 1995. Bioactivation of aromatic amines by recombinant human cytochrome P4501A2 expressed in Ames tester strain bacteria: a substitute for activation by mammalian tissue preparations. *Cancer Research* 55: 799–802.

Edenharder R., I. von Petersdorff y R. Rauscher. 1993. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutation Research* 287: 261–274.

Edenharder R. y X. Tang. 1997. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. *Food and Chemical Toxicology* 35: 357-372.

Edenharder R., H. Krieg, V. Köttgena y K. L. Platt. 2003. Inhibition of clastogenicity of benzo[a]pyrene and of its trans-7,8-dihydrodiol in mice *in vivo* by fruits, vegetables, and flavonoids. *Mutation Research* 537: 169–181.

Evandri M. G., L. Battinellia, C. Danielea, S. Mastrangelob, P. Bollea y G. Mazzantia. 2005. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and Chemical Toxicology* 43: 1381-1387.

Fachinetto J. M. y S. B. Tedesco. 2009. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. Revista Brasileira de Plantas Medicinales 11: 360-367.

Farah A. y C. M. Donangelo. 2006. Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology 18: 23-36.

Feresin G. E., A. Tapia, A. Gimenez, A. G. Ravelo, S. Zacchino, M. Sortino, y G. Schmeda-Hirschmann. 2003. Constituents of the Argentinean medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology 89: 73–80.

Ferguson L. R. 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. Mutation Research 475: 89-111.

Ferguson L. R., M. Philpotts y N. Karunasingha. 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. Toxicology 198: 147-159.

Fernandez de Sá Ferreira I. C. y V. M. Ferraõ Vargas. 1999. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay. Phytotherapy Research 13: 397–400.

Fernández G. 2005. Recolección y comercialización de plantas medicinales en el departamento de Santa María, Provincia de Córdoba, Argentina. *Acta Farmacológica Bonaerense* 24: 575-84.

Ferrer M., A. Sanches-Lamar, J. L. Fuentes, J. Barbé y M. Llagostera. 2002. Antimutagenic mechanisms of *Phyllanthus orbicularis* when hydrogen peroxide is tested using *Salmonella* assay. *Mutation Research* 517: 251-254.

Gamberini M. T., L. A. Skorupa, C. Souccar y A. J. Lapa, 1991. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86: 137–139.

Gee J. M. y I. T. Johnson. 2001. Polyphenolic compounds: Interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry* 8: 1245-55.

Gianello J. C., J. P. Cenal, O. S. Giordano, C. E. Tonn, M. E. Petenatti, E. M. Petenatti y L. A. Del Vitto. 2000. Medicamentos herbarios en el centro-oeste Argentino. II. "Carquejas": Control de calidad de las drogas oficiales y sustituyentes. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 19: 99-103.

Giuliano D. A. 2000. Asteraceae, Tribu III. *Asterae*, parte A, Subtribu c. *Baccharinae*, en Flora fanerogámica argentina. A. T. Hunziker (Ed.), Argentina 66: 3-73.

Gonzales Dávalos E., T. Villca Jiménez y R. Loza Almanza. 2007. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género *Baccharis*: *B. articulata*, *B. dracunculifolia*, *B. salicifolia*, *B. ulcina*, *B. latifolia*, *B. pentlandii*, *B. obtusifolia*, *B. subalata*. Revista Boliviana de Química 24: 41-44.

Gorzalczany S., A. Rojo, R. Rondinaz, S. Debenedetti y C. Acevedo. 1999. Estudio de toxicidad aguda por vía oral de plantas medicinales argentinas. Acta Farmacéutica Bonaerense 18: 221-224.

Grecco S. S., M. J. P Ferreira., P. Romoff, O. A. Favero y J. H. G. Lago. 2012. Phenolic derivatives from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). Biochemical Systematics and Ecology 42: 21–24.

Grover I. S. y S. Bala. 1993. Studies on antimutagenic effects of guava (*Psidium guajava*) in *Salmonella typhimurium*. Mutation Research 300: 1-3.

Guachalla E. O. F. 2006. Study of the mutagenesis and antimutagenesis of *Rheedia acuminata* using *Salmonella typhimurium* retromutation assay. Molecular Medicinal Chemistry 10: 17-19.

Harbone J. B. y C. A. Williams. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 55: 481-504.

Hereflich R. H. y R. E. Neft. 1994. Genetic toxicity of 2-acetyl-aminofluorene, 2-aminefluorene, and some of their metabolites and model metabolites. Mutation Research 318: 73-174.

Hernández Rodríguez A. 2001. Efecto tóxico de sustancias presentes en plantas alimenticias. En: Plantas, cultura y sociedad. Rendó Aguilar B., S. Rebollar Domínguez, J. Caballero Nieto y M. A. Alfaro (Eds.). Universidad Autónoma Metropolitana, México D. F Pp: 31-52.

Hieronymus J. 1882. Plantae diaphoricae argentinae. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias. Córdoba, Tomo IV: 159-60.

Himmelblau D. M. 1970. Statistical background for process analysis. En: Process by analysis statistical methods. John Wiley and Sons (Eds.). New York. USA. Pp. 36- 40.

Hirose M., T. Hoshiya, K Akagi, S. Takahashi, Y. Hara y N. Ito. 1993. Effects of green tea catechins in a rat multi-organ carcinogenesis model. Carcinogenesis 14: 1549-1553.

Horn R. C. y V. M. Ferrañ Vargas. 2003. Antimutagenicity activity of extracts of natural substances in the *Salmonella*/microsome assay. Mutagenesis 18: 113-118.

Horn R. C. y V. M. Ferraõ Vargas. 2008. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the *Salmonella*/microsome assay. *Toxicology In Vitro* 22: 1043-1049.

IUPAC. 1995. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities, pure and applied chemistry 67: 1699-1723.

Juliani R. H., F. N. Biurrun, A. Koroch, A. De Carli y J. Zygodlo. 2007. The production of native and exotic herbs, medicinal and aromatic plants in Argentina. En: *Issues in new crops and new uses*. Janick J. y A. Whipkey (Eds.). ASHS Press, Alexandria, VA. USA Pp: 316-321.

Kada T. 1984. Environmental desmutagens and antimutagenic agents. *Environmental Mutation* 240: 135-151.

Kada T., M. Kato, K. Aikawa y S. Kiriya. 1984. Absorption of pyrolysis mutagens by vegetable fibers. *Mutation Research* 141: 149-162.

Kada T., K. Kaneko, S. Matsuzaki, T. Matsuzaki y Y. Hara. 1985. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. A case of the green tea factor. *Mutation Research* 150: 127-132.

Kada T., I. Tadashi, I. Ohata y T. Shirasu. 1987. Antimutagens and modes of action. Basic Life Sciences 39: 181-192.

Kada T. y K. Shimoi. 1987. Demutagens and bio-antimutagens - their modes of action. BioEssays 7: 113-116.

Kappus H. 1986. Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling and lipid peroxidation. Experientia 37: 1233-1237.

Kaur S., I. S. Grover y S. Kumar. 2001. Antimutagenic potential of extracts isolated from *Terminalia arjuna*. Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology 20: 9-14.

Kaur S., S. Arora, K. Kaur y S. Kumar. 2002. Antimutagenic activities of acetone and methanol fractions of *Terminalia arjuna*. Food and Chemical Toxicology 40: 1475-1482.

Kelloff G. J. 1999. Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development. Advances in Cancer Research 78: 199-334.

King A. y G. Young. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. Journal of the American Dietetic Association 99: 213-218.

Kiso I., M. Thokin y H. Hikino. 1983. Assay method for antihepatotoxic activity using galactosamine-induced cytotoxicity in primary-cultured hepatocytes. *Journal of Natural Products* 46: 841-847.

Kojima H., N. Miwa, M. Mori, M. Osaki y H. Konishi. 1989. Desmutagenic effect of oolong tea. *Syokuhin Eiseigaku Zasshi* 30: 233-239.

Kulisic T., V. Dragovic-Uzelac y M. Milos. 2004. Use of different methods for testing antioxidant activity of oregano essential oil. *Food Chemistry* 85: 633-640.

Kuno T., T. Tsukamoto, A. Hara, y T. Tanaka. 2012. Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *Journal of Biophysical Chemistry* 3: 156-173.

Kweon M. H., H. J. Hwang y H. C. Sung. 2001. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Journal Agricultural and Food Chemistry* 49: 4646-4655.

Lagrotteria M. y M. Affolter. 1999. Sustainable production and harvest of medicinal and aromatic herbs in the Sierras de Córdoba Región, Argentina. In: *Ethnoecology*.

Situated know-lagge/located lives. Nazarea V. D. (Ed.). The University of Arizona Press.Tucson. Pp. 299.

Lapa, A. J., L. A. Fischman y M. T. Gamberini. 1992. Inhibitors of gastric secretion from brazilian folk medicinal plants. In: Natural drugs and the digestive tract. Capasso, F. y N. Mascolo (Eds.). EMSI, Roma. Pp. 63-68.

Levin D. E., M. C. Hollstein, M. F. Chritman, E. A. Schwiers y B. N Ames. 1982. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A:T base pairs at the sites of mutation detects oxidative mutagens. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 79: 7445-7449.

Levine J. G., R. M., Schaaper y D. M. DeMarini. 1994. Complex frameshift mutations mediated by plasmid pKM101: Mutational mechanisms deduced from 4-aminobiphenyl-induced mutation spectra in *Salmonella*. Genetics 136: 731-746.

Mc Cann E., E. Cahoi, E. Yamasaky y B. N. Ames. 1975. Detection of carcinogens in *Salmonella*/ microsome test. Assay of 300 chemicals. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 72: 5135-5139.

Madsen L. H., G. Bertelsen y L. H. Skibsted. 1997. Antioxidative activity of spices and

spice extract. En: Spices: flavor chemistry and antioxidant properties. S. J. Rich y C. T. Ho (Eds.). American Chemical Society, Washington. 14: 176-187.

Marnewick J. L., W. C. A. Gelderblom y E. Joubert. 2000. An investigation on the antimutagenic properties of south african herbal teas. Mutation Research 471: 157-166.

Marques V. y Farah A. 2009. Chlorogenic acid and related compound in medicinal plants and infusions. Food Chemistry 113: 1370-1376.

Martínez-Flórez S., J. González-Gallego, J. M. Culebras y M. J. Tuñón. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria XVII: 271-278.

Maron D. M y B. N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research 113: 173-215.

Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai y M. Sawamura 1980. Factors modulating mutagenicity in microbial test. En: Short-term test system for detecting carcinogens. Norpoth K. H. y col., (Eds.). Springer, Berlin, Heidelberg . Pp 273-285.

Mersch-Sundermanna V., S. Knasmüllerb, X. J. Wua, F. Darroudic y F. Kassiea. 2004. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* 198: 329–340.

Middleton, Jr. E. and C. Kandaswami, 1993. Plant Flavonoid modulation of immune and inflammatory cell functions: in nutrition and immunology. En: Human nutrition a comprehensive treatise, Klurfeld D. M., E. D. Alfin-Slater, R. B. Kritchevsky y D. Gen. (Eds.). Plenum Press, New York, pp: 239-266.

Mitscher L. A., S. Drake, S. R. Gollapudi, J. A., Harris y D. M. Shankei. 1986. Antimutagenesis and anticarcinogenesis: mechanisms. By D. M. Sankel, P. E. Hartman, T. Kada y A. Holleander (Eds.). Plenum Press, New York. Pp 153-151.

Möller L. 1994. In Vivo metabolism and genotoxic effects of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives* 102:139-146.

Moreira N. J. 1862. Dicionario de Plantas Medicinales Brasileiras. Rio de Janeiro, Brasil. 144 pp.

Moreno M. I. N., I. C. Zampini, R. M. Ordóñez, G. S. Jaime, M. A. Vattuone y M. I. Isla. 2005. Evaluation of citotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and

antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. Journal Agricultural and Food Chemistry 53: 8957–8962.

Morita K., M. Hara y T. Kada. 1978. Estudios in natural desmutagens: Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. Agricultural Biological Chemistry 42: 1235-1238.

Mortelmans K. y E. Zeiger. 2000. The *Samonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation Research 455: 29-60.

Mortelmans K. y B. A. D. Stocker. 1997. Segregation of the mutator property of plasmid R46 from its ultravioleta-protection properties. Molecular General Genetics 167: 317-327

Mosovská S., M. Mikulášova, L. Brindzová, Valík y L. Mikusová. 2010. Genotoxic and antimutagenic activities of extracts from pseudocereals in *Salmonella* mutagenicity assay. Food and Chemical Toxicology 48: 1483-1487.

Nagao M., N. Morita, J. Yahagi, M. Shimizu, M. Kuroyanagi, M. Fukuoda, K. Yoshihira, S. Natori, T. Fujino y T. Sugimura. 1981. Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. Environmental and Molecular Mutagenesis 3: 401-419

Nakasugi T. y Komai K. 1998. Antimutagens in Brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less). Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 2560-2564.

Natake M., K. Kanazawa, M. Mizuno, N. Ueno, T. Kobayashi, G. Danno y S. Minamoto. 1989. Herb water-extracts markedly suppress the mutagenicity of Prp-P-2. Agricultural and Biological Chemistry 53: 1423-1425.

Niikawa M., A. Wu, T. Fu, T. Sato, H. Nagase y H. Kito. 1995. Effects of chinese medicinal plant extracts on mutagenicity of Trp-P-1. Natural Medicines 49: 329-331.

Nogueira M. E. I., M. H. Passoni, F. I. Biso, M. do C. Longo, C. R. P. Cardoso, L. S. Campaner do Santos y E. A. Varanda. 2006. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. Toxicology In Vitro 20: 361-366.

Noher de Halac, R. I., M. M. Castro y E. Frank 1986. Informe. Subsecretaria de Gestion Ambiental Gobierno de la Provincia Córdoba. Pp 82.

Novick A. y L. Szilard. 1951. Genetic mechanisms in bacteria and bacterial viruses. I. Experiments on spontaneous and chemically induced mutations of bacteria growing in the chemostat. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 16:337-343.

Novick A. y L. Szilard. 1952. Anti-mutagens. Nature 170: 926-927.

Oliveira S. Q., F. Dal-Pizzol, G. Gosmann, D. Guillaume, J. C. F. Moreira, y E. P. Schenkel. 2003. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: Isolation of a new compound with antioxidant activity. Free Radical Research 37: 555–559.

Oliveira A. C. P., D. C. Endringer, L. A. S. Amorim, M. Das Gracas, M. D. G. Brandao, y M. M. Coelho. 2005. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. Journal of Ethnopharmacology 102: 465–469.

Olthof M. R., P. C. H. Hollman y M. B. Katan. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. Journal of Nutrition 131: 66-71.

OMS. 1978. The promotion and development of traditional medicine, technical report series, N° 622. J. Who (Ed.). Ginebra.

OMS. 1997. Armonización de los requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano. En: Los medicamentos ante las nuevas realidades económicas. Ellacuría I.(Ed.) Civitas, Madrid, España. pp 272.

Owais W. M. y A. Kleinhofs. 1888. Metabolic activation of mutagenic azide in biological system. Mutation Research 197: 313-323.

Palacios P. S., E. G. Wilson y Y. S. Debenedetti. 1999. Análisis por HPLC de ácidos cafeilquínicos presentes en tres especies de *Baccharis*. Dominguezia 15 Nº 1: 39-46.

Pedrazzi A. H. P., Rodriguez E. R. y A. Zanardo-Filho. 1997. Hematological evaluation of "carqueja" (*Baccharis trimera*) Infusion. Fitoterapia 68: 26-28.

Pedreschi R. y L. Cisneros-Zevallos. 2006. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from andean purple corn *Zea mays* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 4557-4567.

Purchase I. F. H., E. Longstaff , J. Ashby, J. A. Style, D. Anderson, P. A. Lefevre y F. R. Wetswood. 1976. Evaluation of six short test for detecting organic chemicals carcinogens and recommendation for their use. Nature London 264: 624-627.

Rocha E. y M. Silva. 1943. Studies of Poisonous Plants in the state of Sao Paulo. Toxicologica Expts. In 27 plants which have been suspected of toxicity. Arquivos do Instituto Biológico 14: 15-17.

Rodrigues C. R. F., J. H. Dias, R. N. de Mello, M. F. Richter, J. N. Picada y A. B. F. Ferraz. 2009. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 125: 97–101.

Rosenkranz H. S. y R. Mermelstein. 1983. Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes: all nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutation Research* 114: 217-267.

Rossi D., R. Bruni, N. Bianchi, C. Chiarabelli, R. Gambari, A. Medici, A. Lista y G. Paganetto. 2003. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. *Phytomedicine* 10: 139–144.

Saito J., Y. Sakai y H. Nagase. 2006. In vitro anti-mutagenic effect of magnolol against direct and indirect mutagens. *Mutation Research* 609: 68-73.

Samejima K., K. Kanazawa, H. Ashida y G. Danno. 1995. Luteolin: a strong antimutagen against dietary carcinogen, Trp-P-2, in peppermint, sage, and thyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 410-414.

Sanabruch W. G. y G. C. Walker. 1980. Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) involved in *recA*⁺*lexA*⁺-dependent mutagenesis. *Molecular and General Genetics* 179: 289-297.

Santana-Rios G., G. A. Orner, A. Amantana, C. Provost, S. Y. Wu y H. Dasshwood. 2001. Potent antimutagenic activity of white tea comparison with green tea in *Salmonella* assay. Mutation Research 495: 61-74.

Shih H., G. V. Pickwell y L. C. Quattroch. 2000. Differential effects of flavonoid compounds on tumor-promoter induced activation of the human CYP1A2 enhancer Archives of Biochemistry and Biophysics 373: 287–294.

Simionatto E., V. Ilha, A. S. Mallmann, C. Porto, L. I. Dalcol y A. F. Morel. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil from *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. Journal of Essential Oil Research 20: 366–368.

Smil V. 2003. Alimentar al Mundo. Un Reto del Siglo XXI. Capitulo 2. Colección Ciencia y Técnica. Siglo XXI de España (Eds.). Madrid.

Simões-Pires C. A., S. Debenedetti, E. Spegazzini, L. A. Mentz, N. I. Matzenbacher, R. P. Limberger y A. Henriques. 2005. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. Plant Systematic and Evolution 253: 23-32.

Snyder L. y W. Champness. 2007. Molecular genetics of bacteria. 3th ed., American society for microbiology (Ed.). ASM Press, Washington D. C. USA. Pp 153-154.

Steinmetz K. A. y J. D. Potter. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. Journal of American Dietetic Association 10:1027-1039.

Taiz L. y E. Zeiger. 2006. Secondary metabolites and plant defense. En: Plant physiology 4th ed., Macmillan P. (Ed), Sinauer Associates. Sunderland, MA. USA. Pp. 152-155.

Teel R. W. 1986. Ellagic acid binding to DNA as possible mechanism for its antimutagenic and anticarcinogenic action. Cancer Letter 45: 1–8.

Troiani H. O., 1985. Las especies de *Baccharis* (Compositae) de la provincia de la Pampa. Revista de la facultad de agronomía. U.N.L. Pam, Argentina Vol. 1 Nº 1-2 Pp 44

Verdi L. G., I. M. C. Brighente y M. G. Pizzolatti. 2005. The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. Química Nova 28: 85–94.

Verschaeve L. y J. Van Staden. 2008. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from south african traditional medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 119: 575-587.

Vieira T. O., I. SeifrizII., C. C. T. Charão, S. Q. De Oliveira y T. B. Creczynski-Pasa. 2011. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. Revista Brasileira de Farmacognosia 21: 601-607.

Vivot Lupi E. P., C. Sánchez Brizuela, F. Cacik Jeifetz y Ch. J. Sequin Acosta. 2009. Screening of antifungal activity of extracts present in Entre Ríos flora species. Revista Cubana de Farmacia 43: 74-84.

Walker G. C. y P. P. Dobson. 1979. Mutagénesis and repair deficiencies of *E. coli* umuC mutants are suppressed by the plasmid pKM101. Molecular and General Genetics 172: 17-24.

Wall E. W., M. C. Wani, T. J. Hughes y H. Taylor. 1988. Plant antimutagenic agents, general bioassay and isolation procedures. Journal of Natural Products 51: 866-873.

Watanabe F., T. Nozaka, S. Tadaki y I. Morimoto. 1989. Desmutagenicity of clove extracts on Trp-P-2 induced mutagénesis in *Salmonella typhimurium* TA98. Shoyakugaku Zasshi 43: 324-330.

Wattenberg L. W. 1981. Inhibitors of chemical carcinogens. In: Cancer: achievements, challenges and prospects for the 1980s. J. H. Burchenal y H. F. Oettgen (Eds.). Grune and Stratton, New York. Pp 517-540.

Wattenberg L. W., A. B. Hanley, G. Barany, V. L. Sparnins, L. K. T. Lam y G. R. Fenwick 1986. Inhibition of carcinogenesis by some minor dietary constituents. En: Diet nutrition and cancer. Hayaachi . Y. (Ed.). Japan Scientific Press, Tokyo. Pp 193-203.

Wattenberg L. W. 1987. Inhibitory effect of benzyl isothiocyanate administrated shortly before diethylnitrosamine or benzo (a) pyrene on pulmonary and for etomach neoplasia in A/J mice. Journal of Carcinogenesis 8: 1971-1973.

Wood A. W., M.T. Huang , R. L.Chang, H. L Newmark, R. L. Leher, H. Yagi, J. M.Sayer, M. D. Jerina y A. H. Conney . 1982. Inhibition of mutagenicity of bay region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plants phenols: exceptional activity of ellagic acid. Proceedings of the Nationals Academy of Sciences of the USA 79: 5513-5517.

Yamada J. y Y. Tomita. 1994. Antimutagenic activity of water extracts of black and oolong tea. *Biotechnology and Biochemistry* 58: 2197-2200.

Yamada J. y Y. Tomita. 1996. Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60: 328-329.

Yen G. C., Chen H. Y. y H. H. Peng. 2001. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food and Chemical Toxicology* 39: 1045-1053.

Yoshimoto M, O. Yahara, O. Shigenori, Md. S. Islam, K. Ishiguro y O.Yamakawa. 2002. Antimutagenicity of mono-,di, and tricaffeoylquinic acid derivatives isolated from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66: 2336-2341.

Yun N., J. W. Kang y S. M. Lee. 2012. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23: 1249-1255.

Zanon S. M., F. S. Ceriatti, M. Rovera, L. J. Sabini y B. A. Ramos. 1999. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 41: 59-62.

Zeiger E., J. K. Hasseman, M. B. Shelby, B. H. Margolin y R. W. Tennant. 1990. Evaluation of four in genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. Environmental and Molecular Mutagenesis 18: 1-14.

Zunino M. P., M. L. Lopez, J. A. Zygodlo y A. G. Lopez. 2004. Essential oil composition of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. Journal of Essential Oil Research 16: 29-30.