

ESTUDIOS DE PRINCIPIOS BIOACTIVOS DE ALGAS, PELOIDES Y AGUAS TERMALES VOLCANICAS DEL DOMUYO Y DEL COPAHUE, NEUQUEN, ARGENTINA

Conferencia plenaria presentada en el IV Simposio Argentino de Farmacobotánica, Buenos Aires, agosto de 1992.

JUAN ACCORINTI

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. (1428) Buenos Aires, Argentina.

STUDIES ON BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM ALGAE, FILAMENTOUS ALGAE AND VULCANIC THERMAL WATERS FROM DOMUYO AND COPAHUE, NEUQUEN, ARGENTINA.

Introducción

Desde siempre, el hombre relacionó las curaciones del cuerpo y del alma con el pensamiento mágico que lo poseía.

Ese concepto mágico que rodeó al hombre primitivo hizo ver en las fuentes termales una materialización de lo sobrenatural; muchas veces les temió, pero también supo aprovecharlas cuando observó empíricamente que producían efectos curativos.

Se pasó luego del concepto mágico al entendimiento provisto por hombres más sabios; se tomó primero como hipótesis de trabajo el parámetro más tangible: el efecto térmico, al que luego se le sumó su condición de medio mineralizado. Así, a la causa que provocaba el efecto se agregaron otros conocimientos científicos.

Entonces se señalaron distintos usos y aplicaciones y se habló de magnetismo, electricidad, ionización, fermentos, gases raros, radiactividad y terapias.

Podemos encarar, entonces, el tema de las fuentes termales desde el punto de vista folclórico, ya que desde tiempos remotos se les asignaban propiedades milagrosas, a extremo tal que los griegos y los romanos, en sus suntuosas instalaciones, aseguraban que encerraban el «elixir de la vida» y de «la eterna juventud», como quedó luego plasmado en la pintura de la «Fuente de Juvencia» que el pintor Lucas Cranach realizó en 1546.

Por otra parte, en América Latina las antiguas civilizaciones conocían y valoraban el efecto de las aguas que la «Pachamama» (Madre Tierra) les brindaba.

Desde la época preincaica eran conocidos los baños termales del Cuzco, llamados «baños del Inca», en el templo del dios Wiracocha y las curaciones estaban asociadas con los dioses.

En nuestro territorio se tienen noticias que desde la época precolombina se hablaba sobre las propiedades de algunas de las numerosas fuentes termales. Nuestros nativos dieron un sentido mágico al conocimiento folclórico, entre historia y leyenda, aunque sin alcanzar el refinamiento del mundo romano.

En la Introducción de «Panorama Hidrotermal Argentino» podemos leer: «Es interesante notar cómo el tema va íntimamente unido al sentimiento del amor. a la imaginaria narrativa que explica las razones del fenómeno físico de la existencia de las aguas, sus ebullentes fumarolas, su embalse y drenaje, sus beneficios».

En otro párrafo se definen las fuentes como un tejido en el que el hombre ha insertado el efecto y la causa como relación de entelequia inseparable para explicar el fenómeno en la letra de su primitiva poesía.

Así, el hombre americano fue hilvanando hechos de los que desconoce sus razones y, con las verdades de su fe, fue sumando narraciones que con el correr del tiempo se convirtieron en leyendas de múltiples matices donde priman la vida y la muerte y el amor y el odio.

Una de esas leyendas relata que al morir el cacique araucano Copahue (lugar de azufre) y su amante hechicera Pirepillán (nieve del diablo) brotaron de las heladas entrañas de la tierra ensangrentada chorros de vapor y agua hirviente que perforaron la nieve que todo lo cubría hasta formar una laguna y un río.

En general esos pueblos se expresaron con sentimiento de terror hacia esos poderes. Los gases, las burbujas, los olores y la temperatura del agua hicieron pensar a los indios que debajo del manantial, en las entrañas de la tierra de donde brotaba el agua, habitaba su dueño, una especie de ser zoo-antropomorfo que no deseaba que lo perturbaran y que castigaba con la enfermedad y con la muerte a quien lo hiciera. Para defenderse del hechizo se debía cubrir la fuente con piedras. Aún hoy se conservan algunas con apariencia de construcciones recientes. Además, tampoco se debía mirar ni tocar el agua que arrojaba el genio maléfico.

Sin embargo, a pesar de estas creencias, esos pueblos temerosos de lo ignoto supieron apreciar el valor del agua y los fangos en las zonas de sus asentamientos.

Si enfocamos el estudio de las fuentes termales con el criterio científico de Brock podemos decir que los primeros estudios químicos de las fuentes termo-minerales fueron iniciados hacia el siglo XVII por Roberto Boyle, y sistematizados por Bunsen en el siglo XIX.

Los balneólogos han realizado investigaciones químicas para explicar las propiedades curativas de algunas fuentes. Si bien la química y la balneoterapia se hallan relacionadas con las correspondientes investigaciones biológicas, Brock expresa que desafortunadamente no se hicieron suficientes ensayos con elementos químicos que fueran significativos para los biólogos.

Los primeros registros de organismos presentes en aguas termales figuran en la Historia Natural de Plinio el Viejo, quien estudió las fuentes de Padua, en Italia. El nos habla de «plantas verdes» que asombrosamente crecen en aguas calientes.

Desde esa época a la actual muchos años han pasado, y aun hoy, en algunos países como los EE.UU. e Italia se realizan importantes estudios biológicos. En el país del norte, Brock, con sus investigaciones microbiológicas en el Parque Nacional de Yellowstone desarrolló estudios incluso a nivel molecular; esos estudios permiten entender cómo la estructura biológica puede vivir a tan altas temperaturas (como a 100°C en el caso de bacterias y hasta 74°C en el de las primitivas algas azul-verdes).

La pregunta es por qué a dichas temperaturas no coagulan sus proteínas por desnaturalización como ocurriría con las formas de vida de temperatura media, que no sobrepasan los 50°C, por tomar a ésta como extrema. (En realidad, la mayoría de las especies mesotermales no pueden vivir a temperaturas constantes superiores a 37°C).

Existen algunas evidencias que nos refieren una especial configuración de esas primitivas macromoléculas termofílicas asociadas con iones metálicos como el magnesio que serviría de puntal o de sostén, junto con el fósforo, y protegiendo a las primigenias y asombrosas moléculas.

Del mismo modo debemos pensar acerca de los genes o ácidos nucleicos, encargados de los caracteres hereditarios de esos organismos y cuya estructura debe tener una especial y distinta construcción, aunque no demasiado diferente de los organismos de temperatura media.

En conclusión, podemos afirmar que la vida en las fuentes termales de alta temperatura es realmente extraordinaria.

La temperatura, junto con la luz, es uno de los factores más importantes del medio externo en el control de las actividades y evolución de los organismos. Por otra parte, es uno de los factores más fáciles de medir.

Nos referiremos, en especial, a los hábitats asociados con la actividad volcánica que dieron origen a las fuentes termales y que han existido a través de los tiempos. Allí se habrían dado condiciones similares a las del inicio de la vida, y, por lo tanto, a la evolución orgánica en nuestro planeta.

Avances logrados por nuestro grupo de trabajo

Nuestros estudios en las áreas volcánicas de Neuquén del Domuyo y del Copahue comenzaron hace tres años.

Seguimos la línea demarcada por el Dr. Gregorio Alvarez e investigamos, en primer lugar, las algas que crecen en el arroyo Aguas Calientes.

Las investigaciones básicas se orientaron en principio al reconocimiento de las especies; esa tarea estuvo a cargo de la Lic. María Teresa Wenzel en colaboración con la Dra. Dora Halperín. Identificaron 24 especies de cianofíceas, de las cuales un género y doce especies representan citas nuevas para Argentina (Dominguezia Vol. 9 (1), 1991).

Muy pronto se pudieron distinguir que las primitivas algas azul-verdes se hallaban asociadas formando «matas» o comunidades algales.

Posteriormente realizamos valoraciones biológicas para investigar las propiedades antibacterianas y antifúngicas de las matas algales más representativas que crecían en el arroyo del Domuyo. Cosechamos muestras a lo largo del gradiente térmico, entre los 40 y 65°C de temperatura del agua.

Se hizo una clasificación preliminar en base a distintas coloraciones de las matas; se distinguieron tres ecotipos correlativos al aumento de la temperatura según se comprobó posteriormente: desde el color típico de las cianofíceas normales, el verdeazulado, con todos sus pigmentos fotosintéticos, creciendo a 42°C, pasando por el ecotipo rosado, entre 60 y 65°C, hasta el ecotipo blanco (terminal) de temperatura superior a los 60°C.

De otras doce especies identificadas por Wenzel, integrantes de la mata algal similar a la usada por el Dr. Gregorio Alvarez en su ficoterapia, se pudo apreciar la predominancia de los géneros *Phormidium* (con varias especies) y *Mastigocladus laminosus*, ambos reconocidos y citados en distintos trabajos de diversas localidades mundiales como habitantes termofílicos.

Se llevaron las muestras conservadas en metanol al laboratorio donde se practicaron sus extracciones con metanol y con acetato de etilo (ambos indicados para la obtención de principios hidrosolubles).

Los extractos obtenidos se ensayaron en antibiogramas de discos, usando como patrones de valoración la bacteria *Staphylococcus aureus* y el hongo *Candida albicans*.

Los extractos «crudos» resultaron inocuos; en cambio, los seguidos de hidrólisis ácidas liberaron productos bioactivos frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Los análisis cromatográficos paralelos señalaron actividad relacionada con ácidos grasos y fenólicos, que resultaron ser antibacterianos, y con moléculas volátiles no saturadas con actividad antifúngica.

Entre los principales resultados podemos destacar que los principios antibacterianos y antifúngicos hidrosolubles resultaron inocuos y fue necesario efectuar hidrólisis ácida y la reextracción con éter sulfúrico para detectar los efectos antibióticos.

Esta conclusión nos sugirió que además de otros principios activos más específicos -que no se descartan - se trataría en este caso de agliconas solubles en éter que actuaban como sustancias alelopáticas de bajo peso molecular incluyendo moléculas volátiles no saturadas. Estas últimas explicarían el importante efecto antimicótico total obtenido contra el hongo *C. albicans*.

El análisis comparativo entre los ecotipos indicó que la actividad máxima procedía de los extractos obtenidos con el ecotipo normal, el verdeazulado; suponemos que el blanco y el rosado serían derivados del normal y que se hallarían en paulatino proceso de degradación correlativo al aumento de temperatura y al anormal contenido de sus pigmentos fotosintéticos.

Correlacionamos este fenómeno con la interrupción de síntesis de porfirinas, probablemente por inactivación enzimática, a nivel del ecotipo rosado. El color sugiere que la biosíntesis de clorofilas podría interrumpirse al llegar a la etapa de protoporfirina IX, «rosada», presunción que se halla en proceso de investigación.

Otra deducción, de extensión ecológica, es la que ocurriría in situ con las matas algales expuestas a la leve pero constante hidrólisis alcalina provocada por el agua natural del arroyo de pH 7.7 que constantemente baña las algas sumergidas.

Este hecho nos permite suponer que la total lixiviación de los metabolitos algales sería coincidente en forma natural con la máxima temperatura del agua; podría ser la causa de muerte de la flora de la mata en el ecotipo blanco terminal, con apariencia de material orgánico coagulado y de exquisito y delicado aroma.

Concluimos en consecuencia que las matas activas y útiles para aplicar en

ficoterapia serían los ejemplares normales (verdeazulados) por sus efectos antibióticos. Son particularmente indicados para el tratamiento localizado de diversas micosis epidérmicas y de mucosas, como las candidiasis.

En el futuro trataremos de aislar las especies que integran las matas en forma unialgal y cultivarlas en forma masiva en medios sintéticos y en condiciones controladas de laboratorio para corroborar sus efectos antimicrobianos individuales. De sus resultados podrá confirmarse o no, si los principios activos son similares o diferentes de los producidos por la interacción natural.

A partir del supuesto de que las matas contienen principios inductores relacionados con los efectos de regeneración de tejidos planificamos nuevos ensayos para su estudio.

Se obtuvieron los extractos de las matas normales en condiciones similares a las anteriores, es decir con metanol y acetato de etilo, pero esta vez aplicando hidrólisis ácidas graduales.

Los análisis comparativos llevados a cabo entre las hidrólisis moderadas con HCl 2N en tubo abierto, variando el tiempo de hidrólisis de 15 minutos a 5 horas, y las hidrólisis drásticas con HCl 6N, durante 22 horas en ampolla cerrada, permitieron la detección cromatográfica de sustancias peptídicas.

Por otro lado, la hidrólisis ácida drástica analizada por cromatografía gaseosa evidenció la presencia de 16 aminoácidos que se individualizaron como constitutivos de aproximadamente 8 fracciones peptídicas; estas fracciones presentaban bajo peso molecular. Junto a los péptidos, los extractos crudos contenían también una variedad de compuestos que dieron positivo con los reactivos para indoles y para derivados del metabolismo nucleico.

Si bien las valoraciones biológicas resultaron hasta entonces inocuas en inducción para los compuestos hidrosolubles planificamos nuevos ensayos que se extenderán en «abanico» hacia la detección de otros posibles inductores.

Sin embargo, esos ensayos permitieron confirmar que los ecotipos rosado y blanco son, sin duda, derivados del normal verdeazulado, lo que confirma la importancia del gradiente térmico en la transición de las distintas matas algales.

Por otra vía se obtuvo actividad inhibitoria en subfracciones que contenían, en aparente homogeneidad, principios relacionados con un complejo fosfo-lipoproteico; se utilizaron técnicas de detección específica para lípidos y proteínas, como por ejemplo, cromatografía en placa, valoraciones paralelas en antibiogramas, purificaciones por columnas de adsorción de C18 sep-pak, eluciones y análisis simultáneos de registros de espectros visibles y de U.V.- «recording».

Pasando del Domuyo al área volcánica del Copahue, hemos realizado un estudio para tratar de aproximarnos al conocimiento de las cualidades del agua del volcán Copahue (AVC) y poder entender mejor sus propiedades curativas.

El AVC es uno de los elementos más importantes en la terapia que se aplica en forma directa o indirecta en el Complejo Termal del Copahue. Se trata de un agua sulfurosa de pH muy ácido, con valor 1.3.

Quizá, la evidencia mayor de sus propiedades curativas sean los recientes trabajos científicos publicados por médicos dermatólogos pertenecientes al equipo del EPROTEN (Ente Provincial de Termas de Neuquén). Estos especialistas aplicaron tratamientos localizados en los que se observaron una franca recuperación de diversas

afecciones cutáneas.

Similares observaciones clínicas fueron también evidenciadas por la Dra. Ana Pérez quien participó en nuestra investigación junto a la microbióloga Dra. Squadrone.

Esos antecedentes nos motivaron a encarar el estudio de las propiedades antimicrobianas del AVC frente a distintos gérmenes patógenos y fundamentar así sus efectos antisépticos (antibacterianos y antifúngicos).

En las conclusiones publicadas en los Archivos Argentinos de Dermatología de 1992 se destacan las actividades antibacterianas y antifúngicas de amplio espectro que posee el AVC.

Además, se comprobó que la extrema acidez natural del AVC no es el factor inhibitorio principal del crecimiento de los microorganismos de ensayo en los antibiogramas.

Por otra parte, las extracciones con distintos solventes orgánicos a que fue sometido el AVC, y que fueron practicadas en forma directa o indirecta previa adsorción con carbón activado, indicaron ausencia de compuestos orgánicos residuales de origen vital.

Estos resultados sugirieron que la exclusión del factor pH como primario y la ausencia de sustancias orgánicas los efectos curativos experimentados por los médicos en la balneoterapia, además de los complementarios de la mecánica hidrotermal, serían exclusivos de la especial composición química del AVC.

En esa crenoterapia el elemento azufre, por su mayor abundancia o quizá por su combinación con otros elementos que se indican en los análisis de la compleja composición química, aparecen en principio como los de mayor significación.

Entonces nuestros resultados de antibiosis frente a distintas bacterias y hongos inferiores definen al AVC como un antiséptico profiláctico eficaz en balneoterapia, en particular muy recomendable en afecciones provocadas por dermatofitos y para tratar las candidiasis cutáneas y otras afecciones secundarias en especial.

Como conclusión, podemos afirmar que además de su reconocido efecto como regenerador de tejidos, en la curación de heridas ulceradas y en casos de psoriasis (como señalan los resultados médicos) el AVC posee también importantes efectos antibióticos.

Otro importante efecto del AVC es el que deriva de los recientes estudios realizados por la Dra. Squadrone, quien en sus ensayos con distintas líneas microbianas del género *Mycobacterium*, cultivadas en medios específicos, llega a la conclusión de que los efectos in vitro señalan la posibilidad de usar el AVC en el tratamiento de diversas afecciones provocadas por esos gérmenes patógenos, en particular en el control de tuberculosis cutáneas y como terapia complementaria por aplicaciones tópicas.

Otra fuente o sistema, también en estudio en el Complejo Termal del Copahue, es la que brinda el agua y la excepcional «floración» algal dominante de la llamada Laguna Verde. Esa fuente es también empleada por los médicos del EPROTEN para uso terapéutico hidrotermal.

Por medio de los estudios quimiosistemáticos realizados se comprobó que la especie dominante es la clorococal *Chlorella keslerii*, una microalga verde cuyo profuso crecimiento confiere a la laguna su particular coloración.

Los ensayos in situ realizados con el agua y la «floración», y luego repetidos in vitro en cultivos de laboratorio, permitieron identificar la presencia de sustancias

antibióticas de naturaleza lipídica cuya caracterización química más específica abordaremos en próximos ensayos.

En síntesis, los estudios realizados por nuestro grupo de investigación han permitido el reconocimiento de las especies algales y además, la caracterización de productos naturales con propiedades antibióticas (antibacterianas y antifúngicas) en las algas del Domuyo, en el agua del volcán Copahue y en la Laguna Verde.

A los resultados enunciados debemos sumar las primeras evidencias de los análisis resultantes de los fangos de otras lagunas sulfurosas del área del Copahue. Esos análisis indican una gran riqueza en ácidos orgánicos de diversos tipos que serían indicativos de las interrelaciones algas-bacterias que se producen en los fangos. Esos barros son también usados por los médicos con fines terapéuticos, en dermatología y en el tratamiento de afecciones reumáticas.

Los resultados obtenidos ponen de relieve la importancia de encarar los estudios futuros en forma integral.

Es decir que la fico, la creno y la fangoterapia deben estudiarse en su conjunto para tratar de aproximarnos al entendimiento de la interacción de los respectivos efectos.

El factor «bios» -la parte viva del complejo termal- está representado por las especies productoras, como son las abundantes cianobacterias (algas verdeazules) y las menos comunes pero excepcionales algas sulfurosas termofílicas verdes, tipo *Chlorella* como las de la Laguna Verde. Junto a las algas, debe tenerse en cuenta también la flora microbiana, en particular las bacterias quimiotróficas (sulfurosas y ferruginosas) que constituyen el eslabón más importante de los degradadores de las sustancias orgánicas aportadas por las algas.

Aparte de los enunciados productores-degradadores hemos observado la presencia de otras microalgas muy interesantes: las diatomeas termofílicas presentes en las muestras de los barros. En general, estas algas silíceas son también reconocidas como productoras de importantes principios bioactivos y que merecen investigaciones más profundas.

En general, las lagunas del Complejo Termal Copahue se hallan en constante dinámica de estabilización dando como resultante una masa orgánica de algas y bacterias que en principio forman biogleas o masas mucilaginosas en procesos de lenta descomposición de los cuerpos vegetativos algales. Estas derivan luego en los definidos peloides.

Los peloides pueden ser termovegetales cuando predominan los compuestos orgánicos sobre el sustrato mineral o termomineral cuando disponen de poca materia orgánica y mayor mineralización.

Es decir, las algas normales pasan por un estado preliminar de bioglea, y terminan cediendo sus compuestos degradados por la actividad bacteriana, quizá algunos ya a nivel molecular, y que son retenidos por los coloides del suelo fangoso y húmedo en aguas sulfurosas.

Es sabido que los peloides pueden contener una compleja variedad de sustancias orgánicas procedentes del «bios»: glúcidos, polisacáridos, esteroides, sustancias de acción estrogénica, péptidos, aminoácidos y vitaminas, entre otras.

Al término de su maduración, el peloide es una masa semifluida, por lo general rica en coloides que retienen los productos de la descomposición orgánica. En la fangoterapia

el peloide se usa por aplicación directa o localizada sobre la zona a tratar; se produce entonces una «ilutación» o penetración a temperatura moderada en afecciones dermatológicas y reumáticas y son indicados como antiinflamatorios. Gracias a su alta conductividad térmica el peloide mantiene durante tiempo prolongado el efecto temperatura facilitando la absorción de los principios bioactivos a través de la piel.

Por lo referido, podemos acordar que la problemática de las investigaciones biológicas, trabajando en coordinación con los médicos especialistas en el tema, se dirigen hacia el conocimiento de los efectos de la balneoterapia integral (creno, fango y ficoterapia) y que nuestro interés se inclina hacia el estudio de nuevos productos naturales potencialmente bioactivos, de aplicación en profilaxis como antisépticos (antimicrobianos) y en terapéutica, con incidencia de los posibles bio-inductores en la regeneración de tejidos.

Así, el problema nos indica que su solución debe ser abordada en forma multidisciplinaria sumando los esfuerzos de distintos especialistas: biólogos, ecólogos, limnólogos, bioquímicos y especialistas en química orgánica, coordinando sus esfuerzos en su resultante: la transferencia de los conocimientos a los médicos lo que permitirá pasar de la medicina de alternativa a una terapia racional y optimizada.

Las investigaciones ecofisiológicas podrán encararse básicamente sobre modelos de interacción ternaria en los que entran en juego el sustrato suelo y el agua como vehículo fundamental, ya que movilizan la resultante orgánica del bios involucrado. Para emprender su desarrollo estamos esperanzados en el apoyo de las instituciones pertinentes cuya comprensión e interés descontamos para la incorporación de nuevos investigadores.

Saltando de lo mítico y sublimando lo místico, quizás, con vuelo imaginario, aunque basado en la razón de los hechos, y usando algunas relaciones por analogías, podamos acercarnos a la comprensión de lo que los griegos encerraban en su «fuente de Juvencia».

Con aquello de que «viejas verdades conectan con nuevas verdades», viene el caso referir una reciente información publicada en el Congreso Internacional de Compuestos Bioactivos de Organismos Marinos realizado en la India en 1989. Esa información señala que las algas rojas y diferentes líneas de cianobacterias, ambas Clases relacionadas filogenéticamente por disponer de los mismos pigmentos (ficoeritrinas y ficocianinas), producen biomoléculas de oligopéptidos que han sido experimentalmente ensayadas con éxito como sustitutos miméticos del GABA (ácido gamma amino butírico) en la actividad bioquímica cerebral de mamíferos. Se trata de neurotransmisores que ayudan a la comprensión del funcionamiento del sistema de máxima evolución en el reino animal.

Bajo el común denominador que nos brinda la biología molecular es probable que el secreto de la resistencia a las enfermedades se esté investigando en la ruta correcta. Es decir, en el nexo que liga los tres fundamentales sistemas de coordinación: el nervioso, el endocrino y el inmunitario, según el descubrimiento formulado en el II Congreso Internacional de Neurociencia, por la científica italiana Rita Levi Montalcini, premio Nobel de Medicina 1986. Ella demostró experimentalmente que el factor de crecimiento de la fibra nerviosa es una proteína producida por el organismo humano que se comporta como una sustancia reguladora o directriz del metabolismo, como nexo entre los tres sistemas y presidiendo la salud y la calidad de vida. Es decir, que contiene el secreto

de la longevidad, de la resistencia a las enfermedades y a la capacidad de sobrellevar el estrés. Su descubrimiento produjo una verdadera revolución en los estudios de los mecanismos celulares que provocan el envejecimiento.

Se podría aventurar que los oligopéptidos producidos por las algas azul-verdes guardarían cierta relación con el descubrimiento de Montalcini; la explicación científica de la rápida regeneración de los tejidos con la aplicación de la balneoterapia integral que se practica en el Copahue. A esta explicación obviamente hemos de agregar las observaciones del Dr. Gregorio Alvarez.

Quizás el hombre razonador, científico, pueda, volviendo a las fuentes, cerrar el circuito. Aunque también es dable suponer que luego de informarse, aplicando el método experimental, deba conformarse, según reza en «Panorama Hidrotermal Argentino», con la explicación que bastaba a sus primitivos e intuitivos ancestros: «de que hay algo en el elemento simplificado que puede llegar a ser Dios mismo». Agrego: Dios, para los creyentes o la Verdad para los agnósticos. Aunque Dios y Verdad para los creyentes sean una misma esencia.

Por ahora, como «Carta de Intención», podemos decir:

«Que el Domuyo es el anuncio de asombrosas curaciones, que Don Gregorio, el pionero, mostró sin limitaciones. Balsámico derivado es el reto del termal del dominio de Vulcano. Con nueva vuelta a las fuentes, el biólogo busca el origen, ese vital, inicial; en las curvas de la vida, de la termal proteína con espiral singular. El DNA resistente, el de las flexibacterias, distinto mas no diferente, relictus del ser primordial.

Procariotas cianofíceas, las de hipertermofilia a nivel molecular.

En gradientes efluyentes, los colores de la vida son el secreto a descifrar. Nueva fe ya se alimenta de la fármaca producción, e ignotos metabolitos sustentan la curación y el folclórico empirismo vislumbra la explicación».

ENSAYOS BIOLÓGICOS CON ALGAS TERMALES ARGENTINAS

*Promotores potenciales de crecimiento celular en Algas del Domuyo (Provincia de Neuquén, República Argentina).** (Segunda parte)

JUAN ACCORINTI(**) Y MARIA TERESA WENZEL

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. (1428) Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Se investigó la presencia de promotores del crecimiento celular en matas algales seleccionadas y cosechadas en el Arroyo Aguas Calientes, en el área del Domuyo (Neuquén, Argentina). Los análisis cromatográficos demostraron la presencia de péptidos intracelulares, aminoácidos, derivados indólicos y ácidos nucleicos. Estas sustancias, potencialmente inductoras y aisladas de matas algales frescas, serían responsables de los rápidos efectos curativos al aplicarse directamente sobre la epidermis de pacientes con dolencias dermatológicas. El ecotipo más activo correspondió al definido como "verde-azulado" que incluye diferentes especies del género *Phormidium* y *Mastigocladus laminosus*. Los análisis comparativos entre los extractos de hidrólisis moderada y los de hidrólisis drástica demostraron que los péptidos detectados son de relativo bajo peso molecular y de estructura dimérica y biológicamente inactivos.

BIOLOGICAL ESSAYS IN ARGENTINE THERMAL ALGAE

2. Potential growth promoters in algae from Domuyo (Neuquen Province, Argentina).

Summary

Chromatographic screening of cellular growth stimulants were performed on selected cyanobacterial algal mats collected in the Aguas Calientes stream at the Domuyo area (Neuquén, Argentina). The analysis showed the presence of intracellular peptides, aminoacids, indol and nucleic acid derivatives. These potentially inductive substances would be responsible for the fast curative effects, previously obtained with fresh algal

Palabras Claves: Matas algales termales, Cyanophyceae, Cyanobacteria, promotores potenciales de crecimiento in vitro.

Key words: Thermal algal mats, Cyanophyceae, Cyanobacteria, potencial growth promoters in vitro.

* Extensión del Proyecto nº EX-086,(UBA).

(**) Lab. de Fisiología Vegetal. Dpto. de Ciencias Biológicas. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, Pab. 2, 4º piso,(1428) Buenos Aires. República Argentina.

mats, directly applied on damaged human skin. The most active ecotypes analyzed were the those called "bluish-green" which included different *Phormidium* species and *Mastigocladus laminosus*. The comparative analysis between moderately and drastically hydrolized products showed that the detected peptides probably have a dimeric molecular structure and biologically inactive.

Introducción

Los efectos curativos obtenidos con matas algales frescas aplicadas sobre la piel enferma de pacientes con distintas dolencias fueron señalados por Alvarez^(1,2,3) y serían debidos a un posible efecto antibiótico y a las propiedades simultáneas regenerativas de las matas algales de cianobacterias "verde azuladas". Los ejemplares de matas "rosadas", derivadas del anterior por exposición natural a temperaturas más elevadas, evidenciaron un efecto biológico menor. Estas propiedades antimicrobianas de los diferentes ecotipos de las matas algales fueron demostradas en los resultados de un trabajo anterior⁽⁴⁾.

La actividad antibiótica fue detectada frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, luego de extraer respectivamente los hidrolizados de los extractos de las matas algales con metanol, acetato de etilo y éter etílico. Las propiedades antibacterianas se relacionaron con el posible efecto sinérgico de ácidos orgánicos y fenólicos, mientras que los antifúngicos, muy activos, se atribuyeron a moléculas volátiles no saturadas.

Los extractos más activos de las matas algales normales incluyen cinco especies de *Phormidium*: *P. tenue* (Menegh.) Gom; *P. treleasei* Gom., *P. subuliforme* Gom., *P. fragile* (Menegh.) Gom. y *P. laminosum* (Ag.) Gom. y *Mastigocladus laminosus* Cohn en interacción con otras cianobacterias menos abundantes.

La existencia de un tercer ecotipo "blanco", sobreviviente en el hábitat bajo condiciones de temperatura extrema, sugiere la gradual destrucción de los pigmentos fotosintéticos y el empobrecimiento del contenido algal. La temperatura (65 °C) y el pH (7,7) alcalino del agua del arroyo produciría la lixiviación "in situ" de las sustancias activas.

La bibliografía refiere diferentes metabolitos obtenidos de cianofíceas continentales que podrían actuar como posibles promotores de crecimiento, tales como el 1-aminopropano de *Microcystis* sp.⁽⁵⁾; la excreción de aminoácidos en *Calothrix brevissima* West⁽⁶⁾, en *Aulosira fertilissima* y *Anacystis nidulans* (Richt.) Dr.⁽⁷⁾; aminoácidos, péptidos y amidas, purinas y pirimidinas de células hidrolizadas de *Nostoc muscorum* (Ag) ex Bornet & Flah^(8,9). Se indica la producción de vitamina B₁₂ en cultivos de *Anabaena flos-aquae* (Lyngbye) Brebisson⁽¹⁰⁾.

Por otro lado, Gupta & Shukla⁽¹¹⁾ y Gupta & Argwal⁽¹²⁾ refieren en sus bioensayos, la presencia de sustancias similares a la giberelina en los extractos de *Phormidium faveolarum* Gom. También otros autores citan la posible presencia de ácido indol-acético en *Nostoc muscorum* n° 79 a⁽¹³⁾.

Además, otros trabajos consideran los efectos promotores del crecimiento, ya sea como morfogenéticos en *Nostoc muscorum*⁽¹⁴⁾, o como inductores en diferentes especies de algas azules^(15, 16, 17, 18).

Las únicas referencias de promoción de crecimiento por cianofíceas termales son las que citan Tassigny & Lefèvre⁽¹⁹⁾ quienes consideran la excreción de "cianoestimulinas" como inductoras de la división celular en plantas y animales.

Luego de los trabajos de Feller⁽²⁰⁾, los posibles usos de las cianobacterias termales se han extendido a la terapéutica veterinaria, y los efectos promotores de crecimiento se ensayaron sobre fibroblastos de ratas y cobayos. Otros procesos, como los efectos balsámicos y sedantes sobre procesos curativos ulcerosos, también han sido citados por Feller.

El objetivo de este trabajo es comparar el contenido de aminoácidos y péptidos de los diferentes ecotipos de matas algales. Se detectaron, además, otros derivados indólicos y nucleicos; se supone que representan potenciales inductores bioterapéuticos, ya sean nutricionales, hormonoidales o de naturaleza más específica. Por esta razón, no solo se explicarían los efectos antibióticos sino también los resultados preliminares obtenidos por Alvarez⁽¹⁾ sobre la regeneración de tejidos epidérmicos (ficoterapia).

Materiales y métodos

Las muestras de matas algales fueron recolectadas en el Arroyo Aguas Calientes en marzo de 1990 y preservadas en metanol. Posteriormente se trataron siguiendo las secuencias de extracción descritas por Accorinti & Wenzel⁽⁴⁾ (Tabla 1).

Muestras algales ecotipos	Temperatura Arroyo °C	Volumen mata ml	Agregado metanol ml/pH	Extracto filtrado ml	Extracto crudo	
					metanol	ac. etilo
1. verde-azulado mucilaginoso	40 - 45	100	100	90/5.5	1m	1 ae
2. verde-azulado desflecado	59 - 60	50	50	45/6.0	2m	2 ae
3. rosado	60 - 65	30	30	25/5.5	3m	3 ae
4. blanco	60 - 65	30	30	25/5.5	4m	4 ae
5. mezcla (1+3+4)	40 - 45	30	30	25/5.5	5m	5 ae

Tabla 1: **Extracciones de las matas algales (1-5)**

Las cromatografías de los extractos "crudos" extraídos con metanol o con acetato de etilo se realizaron según las técnicas de Smith⁽²¹⁾ para las sustancias solubles en agua. Las resoluciones de péptidos y aminoácidos se obtuvieron de los extractos crudos y de sus subfracciones gradualmente hidrolizadas.

La hidrólisis suave se obtuvo agregando gotas de HCl 2N hasta un valor de pH:2-

3, en tubos de ensayo "abiertos" y calentando en baño de agua a 100 °C durante 15 minutos o 5 horas.

La hidrólisis drástica se llevó a cabo agregando HCl 6N y calentando las muestras en ampollas cerradas durante 22 hs. El hidrolizado de este tratamiento drástico permitió la detección individual de los aminoácidos que se analizaron por cromatografía gaseosa (GLC) en un aparato Beckmann 119 CL corriendo muestras de 10 µl.

Las muestras hidrolizadas (10 y 30 µl) se corrieron sobre papel Whatman 1 o 3MM con el sistema de solventes butanol: ácido acético: agua (120:30:50).

Para la separación de péptidos y aminoácidos se sembraron 300 µl del extracto crudo 5 ae a lo largo de la línea de partida sobre papel Whatman 3MM. Tomando como testigo de revelado una fracción representativa del total del cromatograma el resto fue fraccionado a distintos Rf, y eluido con metanol. Posteriormente, los extractos correspondientes a distintos Rf fueron concentrados sobre pequeños volúmenes de agua destilada y finalmente evaluados en antibiogramas frente a *S. aureus* y *C. albicans*.

Se utilizaron reactivos reveladores: ninhidrina (N), ninhidrina-pirimidina (NP) y ninhidrina-ácido acético glacial (NA), ensayados a 80 °C.

Se usó el reactivo de Ehrlich (E) para la detección preliminar de los productos indólicos, azul de bromofenol-nitrato de plata (ABF-NP) para los derivados de ácidos nucleicos (purinas y pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos), complementando con exposición a lámparas de U.V. (250 µm, tipo chromatolite).

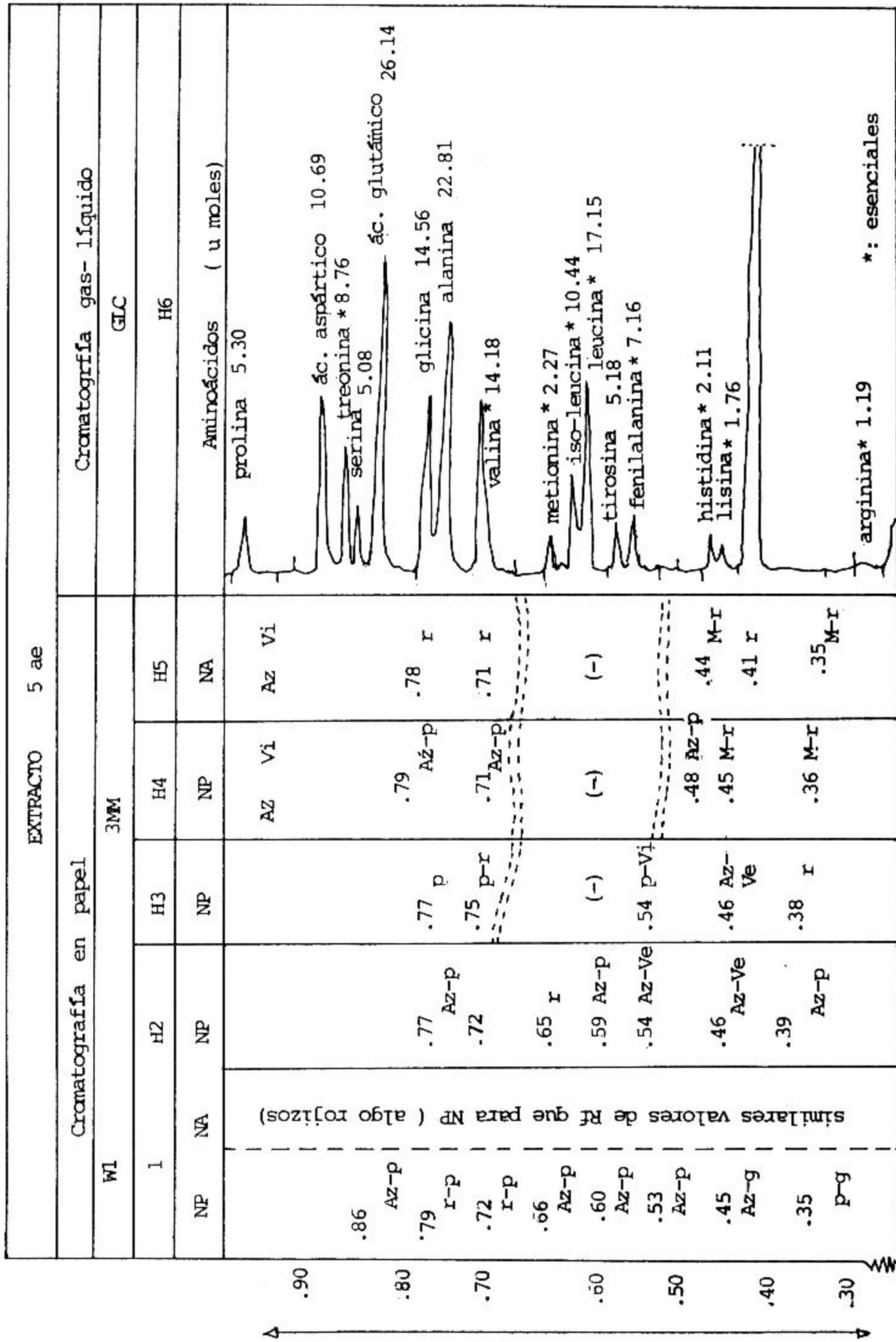
Resultados

Las figuras 1 y 2 señalan los resultados obtenidos.

Ecotipos de matas algales					
	1m	2m	3m	4m	5m
1.00					
.90	.89 p	.90			.90
.85	.87 p-r	.88			.86
.80	.82 Az-p	.82			
.75	.77 Mr	.79			.79 .78

Condiciones: W1, BAA, 26 hs., 10 µl, H2, N. - Ref promedio: .76; .80; .86; .90 (3 corridas, 12 lecturas)

Fig. 1: Análisis comparativo de los diferentes extractos de los ecotipos (1m-5m) con hidrólisis suave (*)



Condiciones: BAA, 24 hs, W1 (10 µl), 3MM (30 µl), H2 hasta H6, Glc (10 µl), NA, NP.

Fig. 2: Análisis comparativo del extracto "crudo" 5 ae (ecotipos1; 1+3+4) gradualmente hidrolizados hasta el tratamiento drástico. (*)

(*) *Referencias y abreviaturas*

Ecotipos de matas algales (1-5): 1. verde-azulado mucilaginoso; 2. verde-azulado desflecado; 3. rosados; 4. blancos; 5. mezcla (1+3+4).

Extractos: ecotipos metanólicos (1m a 5m); ecotipos con acetato de etilo (1 ae a 5 ae)

Condiciones de hidrólisis: extracto crudo. 1- crudo -; H2 - hidrólisis suave (2N HCl/15'/100°C) -; H3 - hidrólisis suave (5N HCl/15'/100°C)-; H4 - hidrólisis drástica (5N HCl/5hs/100°C, NP)-; H6 - hidrólisis drástica (6N HCl/22 hs/100°C, GLC)

Condiciones cromatográficas: - W1: Whatmann (10-30 µl); 3MM: Whatmann (15-30 µl); BAA: butanol: ácido acético-agua: (120:30:50); tiempo de corrida ascendente: hs.

Reactivos de revelado: N: ninhidrina (péptidos y aminoácidos); NA: ninhidrina - ácido acético glacial - agua; NP: ninhidrina pirimidina; GLC: cromatografía líquida - gaseosa. E: Ehrlich (derivados indólicos). ABF/NP: azul de bromofenol / nitrato de plata (derivados de ácidos nucleicos).

Reacciones de color: Az: azul; M: marrón; Ve: verde; g: gris; p: púrpura; r: rosado; R: rojo; C: celeste; Vi: violeta; Am: amarillo.

Al comparar los diferentes extractos de los ecotipos 1m, 2m y 5m de las matas algales, luego de aplicar hidrólisis suave (H2), mostraron manchas nítidas ninhidrina positivas. Los extractos de los ecotipos "rosado" 3m y "blanco" 4m no reaccionaron (Fig.1).

El extracto crudo 5ae rindió manchas ninhidrina positiva (Fig.2). Alícuotas de los extractos sometidos a hidrólisis graduales mostraron resultados similares con excepción de las áreas centrales H3, H4 y H5, que fueron negativas debido al ácido clorhídrico residual adsorbido en la zona. Este ácido residual causó la excesiva digestión de los productos correspondientes, previamente detectados como derivados en la proximidad del frente del solvente (cromatogramas H4 y H5).

Además, el extracto crudo 5 ae permitió, en forma preliminar, poner en evidencia varios compuestos indólicos (Rf 0.43, 0.52, 0.74, 0.94 y 0.98) que se identificaron con el reactivo de Ehrlich.

Alícuotas de los extractos 1m, 3m y 4m, luego de la hidrólisis suave (H2) aplicando ABF/NP, dieron reacción positiva (azul "real"- "royal-blue"- del complejo de plata) para derivados de ácidos nucleicos (Rf 0.40).

La elución metanólica de un cromatograma preparativo del extracto crudo 5 ae rindió 8 bandas de reacción positiva a la ninhidrina (N). Todas resultaron inocuas frente a *S. aureus* y *C. albicans*

Se comprobó que el acetato de etilo resultó más efectivo que el metanol para el aislamiento de los péptidos.

Discusión

Las reacciones negativas de ninhidrina para las muestras 3m y 4m (Fig.1) confirman la hipótesis previa de que los ecotipos rosados y blanco derivarían del normal "verde-azulado" y se hallan en un proceso destructivo gradual.

Además, se comprobó que las matas algales rosadas presentan un menor efecto antibiótico que el ecotipo normal(4). La ausencia de aminoácidos y péptidos sugiere

que esas matas no resultan convenientes como inductoras de crecimiento de tejidos epiteliales.

Los ecotipos azul-verdosos resultan los más adecuados para utilizar en ficoterapia, ya sea por aplicación directa de los especímenes frescos, o por el uso de los respectivos extractos "crudos" hidrolizados debido a sus efectos antibióticos e inductivos.

El contenido total de péptidos de la mata normal verde-azulada, detectada en los diferentes extractos hidrolizados y analizados por cromatografía en papel, parecen mantener una relación constante 1:2 respecto del número total de unidades de aminoácidos del análisis por GLC. Estas relaciones permiten asumir que la detección peptídica correspondería a productos de bajo peso molecular (probablemente dipéptidos). Este aspecto se está analizando mediante el aislamiento del tamaño molecular y los correspondientes bioensayos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Santomé, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) por el análisis GLC; al E.PRO.TE.N (Ente Provincial Termas del Neuquén) y a la Universidad de Buenos Aires, extensión del Proyecto n° EX-086.

Bibliografía

1. Alvarez, G. (1976 a). Algas termales del Domuyo y su utilización en Dermatología. **XII Congreso Internacional de Técnica Hidrotermal. INCYTH-CITH** (Argentina).
2. Alvarez, G. (1976 b). Un caso de psoriasis palmar y artropatía falángica tratado con algas termales del Volcán Domuyo y su utilización en dermatología. **XII Congreso Internacional de Técnica Hidrotermal. INCYTH-CITH** (Argentina).
3. Alvarez, G. (1979). El Domuyo y sus misterios. **Universidad Nacional del Comahue**, Neuquén, Argentina:97.
4. Accorinti, J. y Wenzel, M.T. (1991). Valoraciones biológicas de algas termales argentinas. I. Propiedades antibacterianas y antifúngicas de algas termales del Domuyo (Provincia del Neuquén) **Dominguezia** **9** (1): 40-48.
5. Herrmann V. y Juettnner F. (1977). Excretion products of algae: Identification of biogenic amines by gas liquid chromatography and mass spectrometry of their trifluorocetamides. **Ann. Biochem.** **78**:365-373.
6. Watanabe, A. (1951). Production in cultural solutions of some aminoacids by the atmospheric nitrogen fixing blue-green algae. **Ach. Bioch. Bioph.** **34**:50.
7. Singh, V.P. y Trehan, K. (1973). Extracellular protein aminoacids of the blue-green algae. I. The production of the extracellular aminoacids by *Aulosira fertilissima* and *Anacystis nidulans*. **Phykos** **12** : 36-41.
8. Magee, W.E. y Burris, R.H. (1954) Fixation of N and utilization of combined nitrogen by *Nostoc muscorum*. **Am. J. Bot.** **41**:772-782.
9. Walsby, A.E. (1965) Biochemical studies on the extracellular polypeptides of *Anabaena cylindrica*. **Lemm. Brit. Phycol. Bull.** **2** :514-515.
10. Grieco, E. y Desrochers, R. (1978). Production of vitamin B12 by a blue-green algae. **Can. J. Microbiol.** **24**:1562-

- 1566.
11. Gupta, A.B. y Shukla, A.C. (1969). Effect of algal extracts of **Phormidium** species on growth and development of rice seedlings. **Hydrobiologia** 34:77-84.
 12. Gupta, A.B y Argwal, P.R. (1973) Extraction, isolation and bioassay of giberelin-like substance from **Phormidium foveolarum**. **Ann. Bot.** 37 :737-741.
 13. Caire, G.Z, Mulé, M.C y Cano, M.S. (1979). Productos extracelulares de **Nostoc muscorum** Ag. (n°79 a) obtenidas en medio con y sin nitrógeno combinado.I. Sus efectos sobre plántulas de arroz. **Phyton** 37 :1-13.
 14. Lazaroff, N. y Vishniac, W. (1961) The effect of lighth on the development cycle of **Nostoc muscorum**, a filamentous blue-green algae. **J. Gen. Microbiol.** 25 :365-374.
 15. Gupta, A.B. y Gupta, K.K (1970). The effect of **Phormidium foveolarum** extract on growth and development of pea seedling. **Labder. I. Sci.Technol. part b**, 8:151.
 16. Accorinti, J. , Caire, G.Z. y Mulé, M.C. (1974). Sustancias biológicamente activas en cultivos axénicos de Cyanophyta. **Phyton** 32(1): 23-33.
 17. Caire, G.Z. Mulé,M.C., Doallo, S., Halperin, D.R. y Halperin, L. (1976). Acción de los extractos algales, acuosos y etéreos de **Nostoc muscorum** Ag.(n° 79 a).I -Efecto sobre plántulas de mijo (**Panicum miliaceum L.**) mediante tratamiento con semillas. **Bol. Soc. Arg. Bot.** 17:289-300.
 18. Behal, K.K. y Gupta, A.B.(1980) Note on effect of **Phormidium foveolarum** extract on "Varona" Indian mustard. **Indian J. Agr. Sci.** 51:124-127.
 19. Tassigny, M. y Lefevre, M. (1971). Autohetero-antagonisme et autres consequences des extractions d' algues d' eau douce ou thermale. **Intern. Vereing.Theor. Limnol. Mitt.** 19:26-38.
 20. Feller, B.(1948) Contribution à l' etude des plais traités par un antibiotique dérivé des Algues. **These Veter.**, Paris (Alfort) en: Tassigny y Lefevre, 1971).
 21. Smith, I. (1963). Chromatographic and electrophoretic techniques. **Chromatography**. 1:617. W. Heineman, London and Interscience Public., New York.

INFLUENCIA DE LACTONAS SESQUITERPÉNICAS SOBRE LA GERMINACIÓN DE LA *LACTUCA SATIVA*

NORMA I. KAMIYA, ALICIA BARDON* Y CESAR A.N. CATALAN

Instituto de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. Ayacucho 471, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina.

Resumen

Se analizó el efecto de un hidroxiéster sesquiterpénico y de once lactonas sesquiterpénicas sobre el proceso de germinación de *Lactuca sativa*. Las principales alteraciones se producen a un nivel de radícula donde, en la mayoría de los casos, el efecto fue de inhibición del desarrollo radicular. Solo con dos lactonas a bajos niveles de concentración se observó un efecto promotor de la elongación radicular.

SESQUITERPENE LACTONE INFLUENCES ON *LACTUCA SATIVA* GERMINATION

Summary

Eleven sesquiterpene lactones and one sesquiterpene ester were assayed for effects on *Lactuca sativa* germination. Inhibition and alterations of the radicle growth were the main effects observed. Only two lactones at low concentrations promoted radical elongation.

Introducción

Las lactonas sesquiterpénicas (**LS**) son metabolitos característicos de la familia Compositae que en los últimos años han despertado un marcado interés por su variada actividad biológica⁽¹⁾.

Al presente no están claros los mecanismos que producen diversos efectos observados sobre procesos de germinación de semillas, crecimiento de bacterias, hongos y protozoos, síntesis de ADN y ADN polimerasa en tejidos tumorales, entre otros. Se ha

Plabras claves: Lactonas sesquiterpénicas; alelopatía; germinación de *L.sativa*; elongación radicular.
Key words: Sesquiterpene lactones, allelopathy, germination of *L.sativa*, radical elongation.

* Dirigir correspondencia.

sugerido que la actividad de las **LS** pueden deberse total o parcialmente a la propiedad del agrupamiento α -metilén γ -lactona de reaccionar con los grupos SH de enzimas para formar aductos tipo Michael⁽¹⁾.

Un aspecto de esta actividad son los efectos alelopáticos⁽²⁾ y en particular las interacciones planta - planta, cuyo estudio se ha encarado.

En este trabajo se analizan los efectos sobre la germinación ejercidos por un hidroxiéster sesquiterpénico y once **LS** diferentes al ponerse en contacto con semillas y radículas de *Lactuca sativa* var. Grand Rapids. Se ensayaron **LS** de cuatro tipos esqueléticos, a saber: germacranólido (compuestos **1** a **6**), guaianólido (**10** a **12**), pseudoguaianólido (**9**) y elemanólido (**7**). El hidroxiéster **8** está basado en el esqueleto elemano.

Material y método

El compuesto **1** fue aislado de *Vernonia cognata* Less.⁽³⁾, **2** de *Vernonia squamulosa* Hook et Arn⁽⁴⁾, **3** *Vernonia pinguis* Grises⁽⁵⁾, **4** de *Mikania mendocina* Phil.⁽⁶⁾, **5** de *Mikania minima*⁽⁷⁾, **8** de *Onopordon acaulon* L.⁽⁸⁾, **9** de *Parthenium hysterophorus* L.⁽⁹⁾, **10** y **11** de *Vernonia nitidula* Less.⁽¹⁰⁾ y **12** de *Kaunia lasiophthalma*⁽¹¹⁾. Los productos **6** y **7** fueron sintetizados a partir de **5**⁽¹²⁾.

Las sustancias ensayadas fueron extraídas del material vegetal con cloroformo y luego aisladas y purificadas por cromatografía en columna de sílica gel y por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en fase reversa (C18 y C8). Los productos puros (pureza superior al 98%) se identificaron por métodos espectroscópicos, IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN y EM.

Para observar alteraciones en el proceso de germinación se empleó el método de Kato⁽¹³⁾, con algunas modificaciones introducidas por los autores.

Se impregnaron papeles de filtro (Whatman GP) de 7,5 cm. de diámetro con soluciones de 200, 400, 600 y 1200 ppm de los compuestos a ensayar en CH₂Cl₂. Un papel impregnado únicamente con solvente se empleó como blanco. Se evaporaron los restos de solvente en un desecador al vacío y los papeles se colocaron en sendas cajas de Petri. Sobre cada uno de ellos se ubicaron 50 semillas de *Lactuca sativa* var. Grand Rapids de tamaño y color uniforme y se agregó suficiente agua (bidestilada y filtrada por filtro de 0,2 μ) para mantener un ambiente húmedo. Las cajas de Petri se mantuvieron a oscuras por 96 hs. y luego se realizaron observaciones.

La fotografía N° 1 muestra la germinación y desarrollo de las plántulas de *L. sativa* después de 96 hs. en el experimento testigo.

La fotografía N° 2 muestra el desarrollo al cabo del mismo tiempo cuando el papel fue impregnado con 1200 ppm del compuesto **10**. Se observa una sensible inhibición en el desarrollo radicular.

La temperatura influye en la velocidad de crecimiento de la radícula. Se ha observado que temperaturas superiores a los 27°C aceleran a tal punto el desarrollo radicular que el tiempo que la radícula permanece en contacto con el papel impregnado en el aleloquímico es demasiado corto como para producir efectos diferenciales para cada concentración. Por debajo de los 23°C el proceso de germinación se alarga innecesariamente.

riamente. Por lo expuesto, los experimentos se realizaron a 25°C.

Cada experimento se repitió 2 veces para todas las concentraciones y para todos los compuestos, excepto **7** y **8** con los que se realizó solo una serie de experimentos debido a la limitada cantidad de sustancia disponible. Se promediaron los resultados de ambos ensayos.

No se observaron diferencias significativas al reemplazar el agua bidestilada y filtrada que humedece los papeles de filtro por una solución al 0,1% de Tween 80. Se especuló que un detergente podría favorecer la difusión de los aleloquímicos en el medio acuoso y mejorar el contacto radícula-sustancia. Ensayos en blanco permitieron asegurar que, a las concentraciones empleadas, el detergente no ejerce efecto alguno en el desarrollo de las plantas.

Se realizaron experiencias adicionales empleando 1200 ppm de los compuestos y agregando cantidades equimoleculares de cisteína con el objeto de establecer si los grupos sulfhidrilo juegan algún rol en el efecto alelopático observado.

En cada caso se efectuó la cuenta del número de semillas que se abrieron disparando su radícula, a las que se consideró como "semillas germinadas". Se midieron las longitudes de radícula y de hipocótilo con precisión \pm de 1 mm y se calcularon las medianas de cada longitud.

Se realizaron observaciones bajo lupa y, en los casos de radículas muy afectadas, se efectuaron cortes transversales para microscopía óptica, tanto en radículas dañadas como en otras sanas, empleadas como testigo. Cada corte se impregnó con una solución acuosa de glicerina al 50% y luego se coloreó con una solución de safranina. La fotografía N° 3 (40X) muestra el corte transversal de una radícula de experimento testigo (blanco) donde se observan abundantes pelos radiculares con longitud normal. La fotografía N° 4 (40X) muestra un corte transversal de una radícula afectada por 1200 ppm de la lactona **5** donde se observa una marcada atrofia en el número y desarrollo de los pelos radiculares.

Resultados y discusión

Se analizaron los germacranólidos **1** a **6**, los derivados de elemano **7** y **8**, el pseudoguaianólido **9** y los guaianólidos **10**, **11** y **12** (Tabla 1). Estas sustancias son compuestos mayoritarios de la planta y puede suponerse entonces que, cantidades comparables a las empleadas en nuestros ensayos lleguen al suelo por procesos de lixiviación de las hojas por lluvia, niebla o rocío, por lixiviación o decaimiento de los desechos vegetales o por exudación de las raíces⁽¹⁴⁾.

Entre los compuestos ensayados hay diferencias esqueléticas y funcionales. Se han elegido compuestos con diferentes esqueletos pues, en experimentos relacionados con estimulación de la germinación, se ha sugerido⁽¹⁵⁾ una mayor dependencia con la distribución de los átomos de carbono en el esqueleto, antes que con la presencia de algún grupo funcional específico. Dentro de cada grupo con semejanzas esqueléticas, hay diferencias funcionales las que dan lugar a diferencias en la actividad dentro del grupo. Sin embargo, en general, se puede observar que:

- 1) Los porcentajes de germinación no difieren significativamente del observado para el experimento testigo (Tabla 2). Esto es de esperar si el mecanismo de germinación es influenciado únicamente por factores internos desencadenados por la humedad ambiente. Aparentemente no habría difusión de las sustancias ensayadas hacia el interior de las semillas.
- 2) La longitud del hipocótilo no se ve seriamente influenciada por las diferentes concentraciones de sustancias y solo a 600 o 1200 ppm, en plántulas afectadas (compuestos **3**, **4**, **5**, **7** y **8**), puede verse una caída de hasta un 30% en el promedio de elongación con respecto al testigo.
- 3) El fenómeno de dobles máximos o dobles mínimos de actividad a diferentes concentraciones, que había sido previamente observada⁽¹⁶⁾ aparece también en nuestros experimentos. La explicación bioquímica de este comportamiento podría vincularse con que el mismo compuesto actuaría sobre más de una enzima y entonces el resultado observado correspondería a una combinación de efectos.
- 4) El agregado de 400 ppm de cisteína unido a 1200 ppm del sesquiterpeno no provoca modificaciones mayores a un 15% con respecto a las observadas en los experimentos a 1200 ppm de compuesto puro. Es probable entonces, que las alteraciones observadas no estén relacionadas con el ataque de los aleloquímicos ensayados al grupo sulfhidrilo de enzimas.

Las mayores alteraciones se producen a nivel de la radícula. En la tabla 3 se indican porcentajes de mediana de longitud de radícula de cada grupo tratado con 200, 400, 600 y 1200 ppm de sustancia con respecto a la mediana del grupo testigo considerada como 100%. No solo se altera el proceso de alargamiento sino también aparecen modificaciones morfológicas que se observan a simple vista como torsión de las radículas y pérdida del geotropismo positivo (experimentos a 400, 600 y 1200 ppm con los compuestos **8** y **3**). En los casos de caída de la longitud radicular en más de un 40%, las observaciones al microscopio óptico mostraron una notable afección de los pelos radicales, con lo cual la radícula ve inhibida su capacidad de absorción.

Las sustancias **3**, **4**, **6**, **7** y **10** reducen a menos de la mitad la longitud de radícula a 1200 ppm. A 600 y 400 ppm producen este efecto solo los compuestos **3** y **8** y a 200 ppm ninguno de los analizados tiene un efecto tan drástico. Una estimulación del proceso de elongación solo se ha observado a ciertas concentraciones de los compuestos **2**, **5** y **12**.

Los compuestos **1** a **6** presentan un anillo de 10 Carbonos. El producto **1** (Glaucolide B) y el **2** (Glaucolide A) no afectan notablemente el proceso de germinación. Su rol ecológico se ha vinculado con la actividad molusquicida⁽¹⁷⁾ para **1** e insecticida⁽¹⁸⁾ para **2**.

Los compuestos **1**, **2** y **3** se diferencian del resto por no presentar una función exometilén y - lactona a la que numerosas publicaciones le han asignado una fuerte influencia en la actividad biológica^(1,9,19).

En **3**, aparentemente la presencia del agrupamiento hemiacetal cíclico, sería res-

ponsable de la actividad inhibitoria observada. Previamente⁽²⁰⁾ se ha informado sobre la actividad citotóxica de compuestos de estructura relacionada con **3**; es esta la primera observación de un efecto alelopático de estas circunstancias llamadas ésteres de piptocarfol⁽²¹⁾ o hirsutinolides⁽²²⁾.

Los germacranólidos **4**, **5** y **6** poseen esqueletos más rígidos que **1** y **2** y contienen un sistema de exometilén y - lactona. Ellos también producen alteraciones aunque sus efectos son más leves que los observados para el compuesto **3**. El heliangólido **4** produce disuasión a la predación por cierta clase de hormigas cortadoras⁽²³⁾ de la especie *Atta cephalotes*, de las selvas brasileñas. A productos estructuralmente relacionados con **5** y **6** se les han asignado propiedades citotóxicas y antibacterianas⁽¹⁾. A concentraciones mayores a 600 ppm el compuesto epoxidado **6** produce efectos inhibitorios mayores que **5** observándose también daños más drásticos en pelos radiculares.

Ensayos para probar actividad antimicrobiana⁽²⁴⁾ también mostraron que la esterificación de grupos hidroxilos o la epoxidación de dobles enlaces producen incrementos de la actividad.

Entre los derivados de elemanos que analizamos el compuesto no lactonizado **8** posee la mayor actividad. Cabe destacar que esta molécula presenta síntomas electrofílicos que pueden sufrir adiciones de Michael.

El compuesto **9** (Hymenin) es el único pseudoguaianólido analizado y se halla entre los compuestos menos activos de este trabajo. La actividad biológica de sustancias estructuralmente relacionadas con **9** es diversa⁽¹⁾.

Entre los guaianólidos, los compuestos **10** y **11** provocan inhibiciones importantes a 600 y 1200 ppm observándose alteraciones morfológicas en los pelos radiculares. Si bien el compuesto **12** reduce el desarrollo radicular a 400 y 1200 ppm no se han notado modificaciones morfológicas en las radículas.

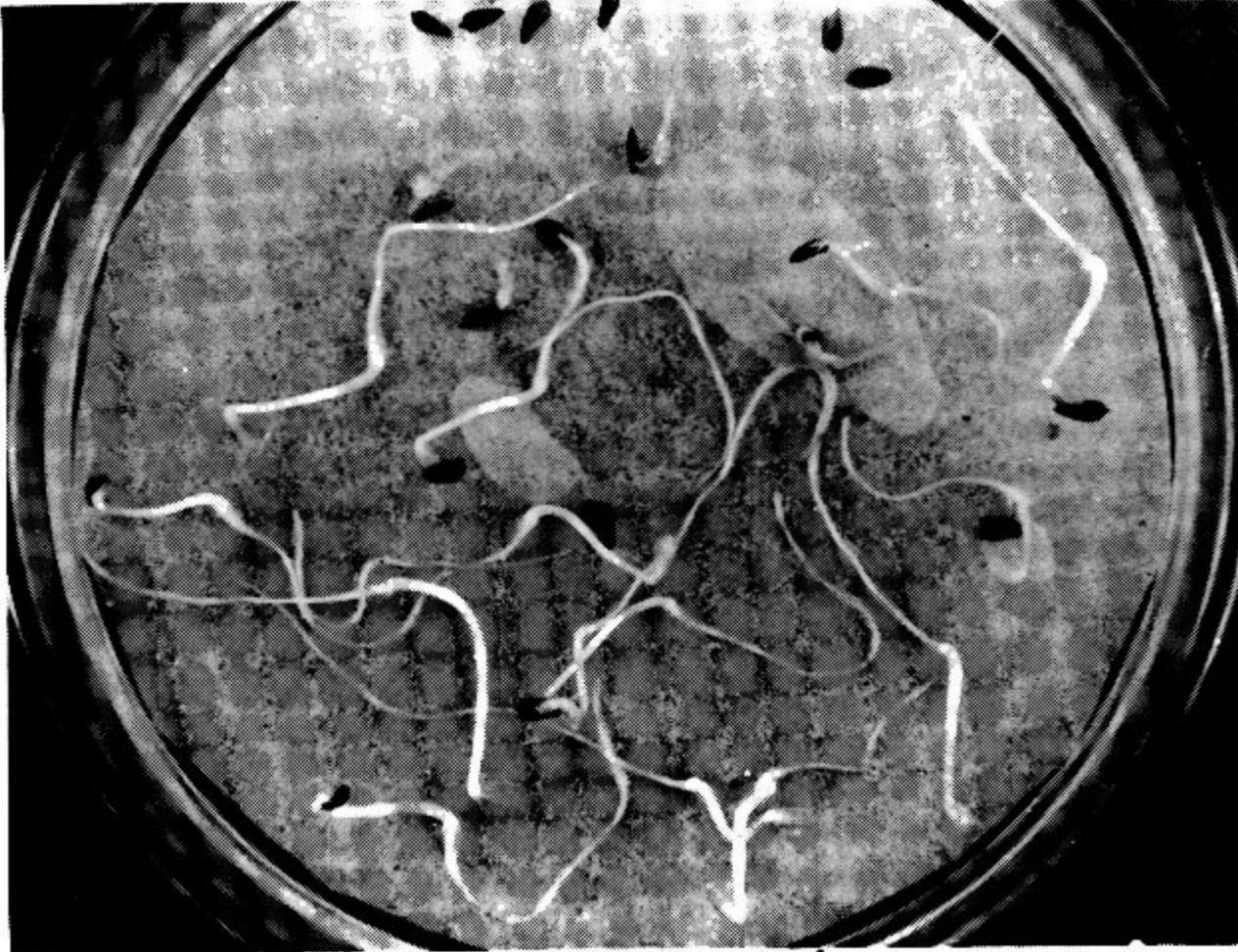
Recientemente se ha informado que el pseudoguaianólido **9** y el guaianólido **10** ejercen efectos citoprotectores leves sobre úlceras gástricas producidas por etanol⁽¹⁰⁾.

Análisis estadístico: Se realizaron dos tests no paramétricos para analizar las diferencias en los resultados para las distintas concentraciones de aleloquímico. Fueron el de "Kruskal y Wallis" y el "Test de la Mediana"⁽²⁴⁾. No se realizó el supuesto de normalidad.

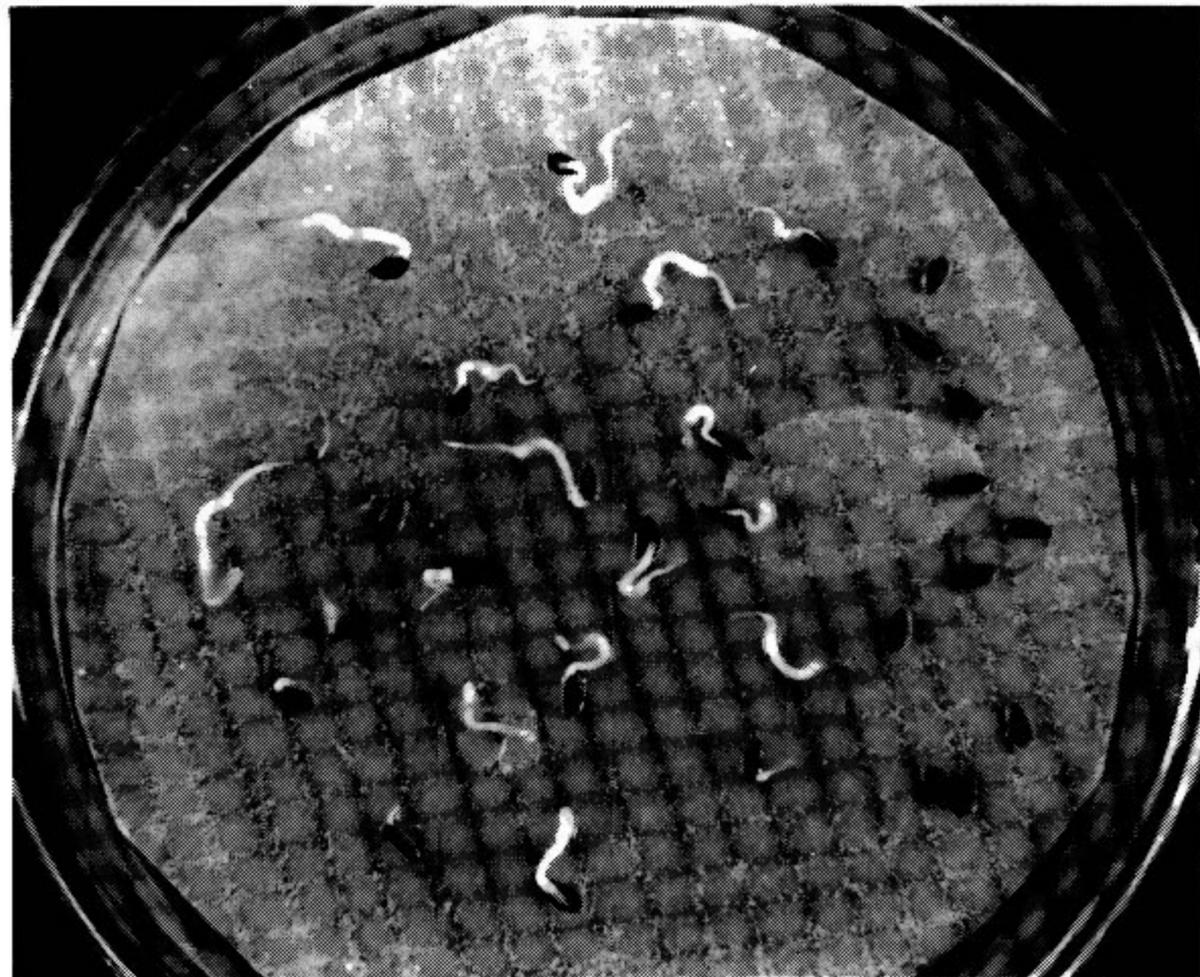
Agradecimientos

Al consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán por su apoyo económico. A la Lic. Adriana Elías por su colaboración en el tratamiento estadístico de los resultados. Al Dr. O. S. Giordano por suministrarnos una muestra pura de hymenin. A la Lic. M. Rodríguez de Sarmiento por su colaboración en el trabajo de microscopía.

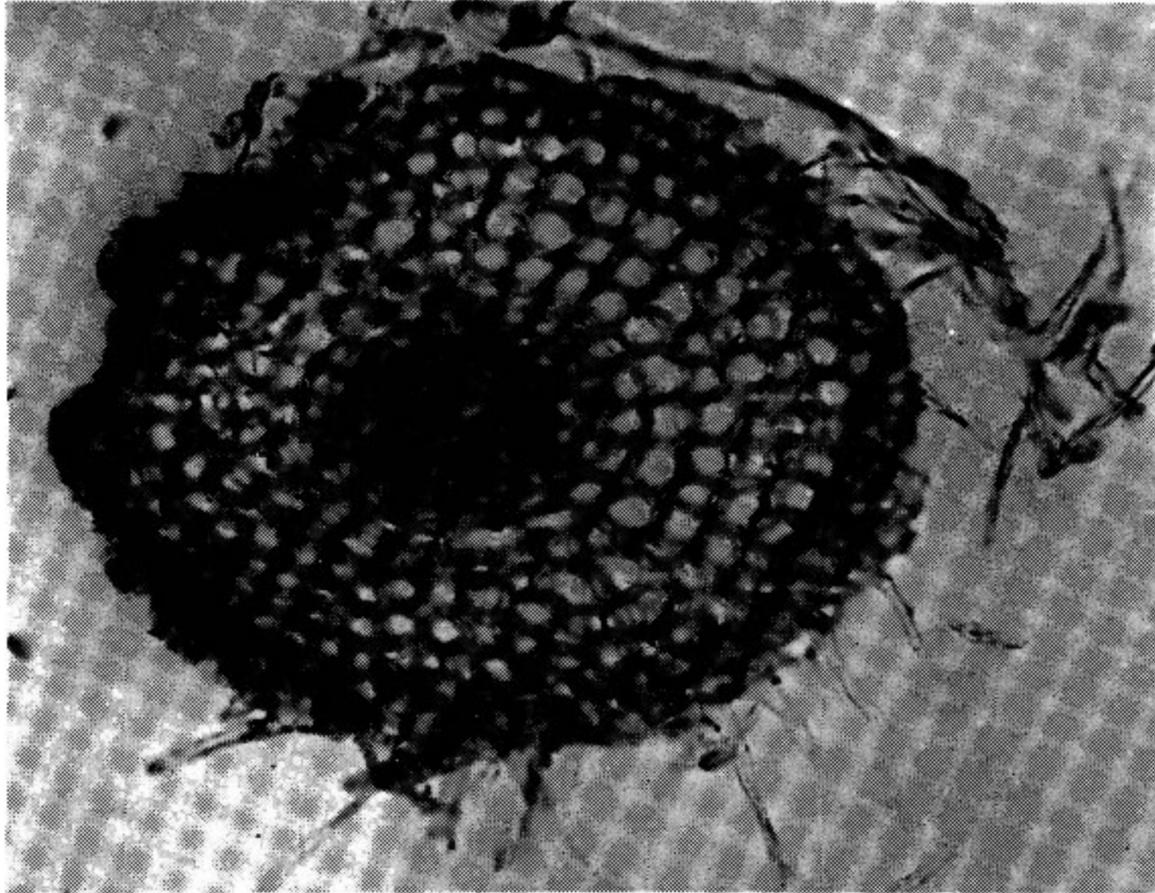
FOTOGRAFIAS



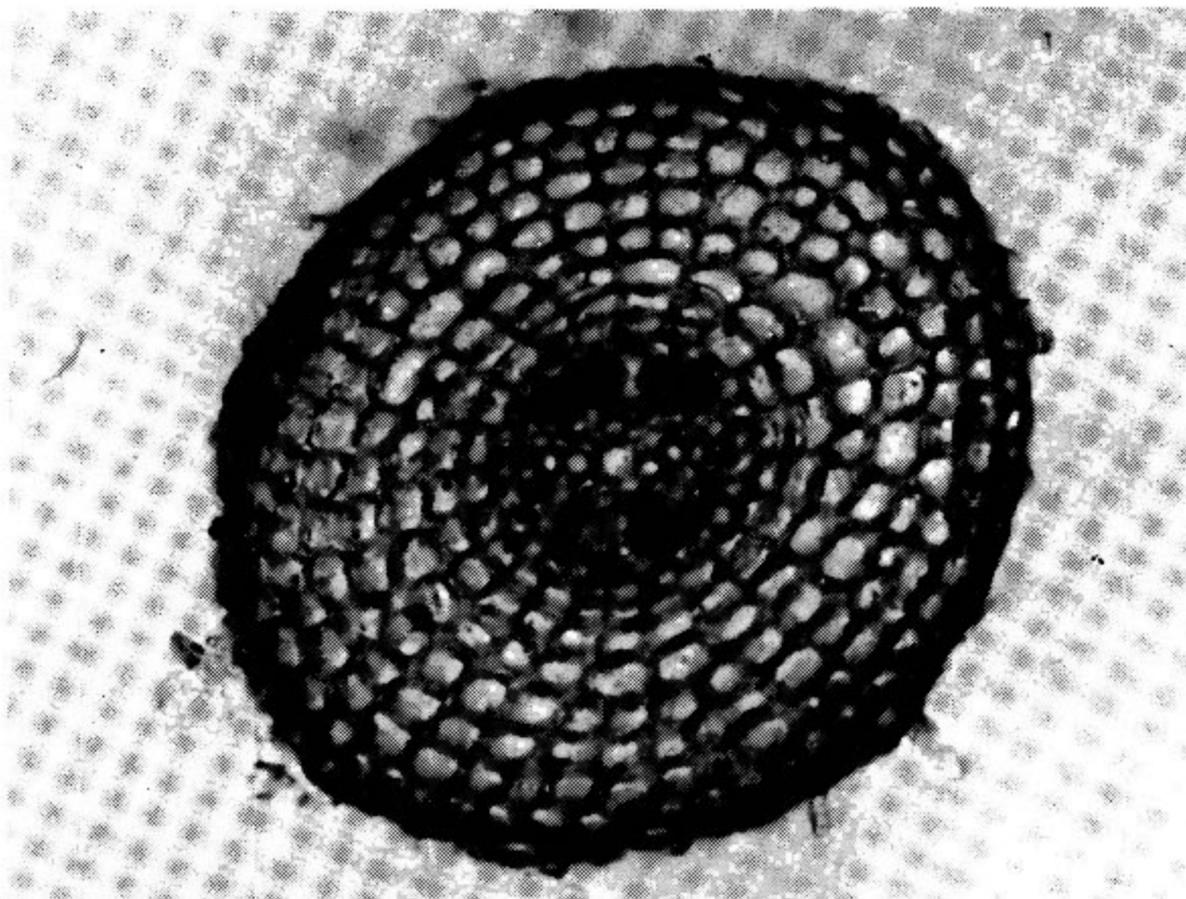
Fotografía N°1:
Caja de Petri con
plántulas de *L. sativa*
del experimento
testigo a las 96 hs.



Fotografía N° 2:
Plántulas
afectadas por 1200 ppm
del Compuesto 10
a las 96 hs.



Fotografía N° 3:
Corte transversal
de radícula no afectada



Fotografía N°4:
Corte transversal
de radícula afectada

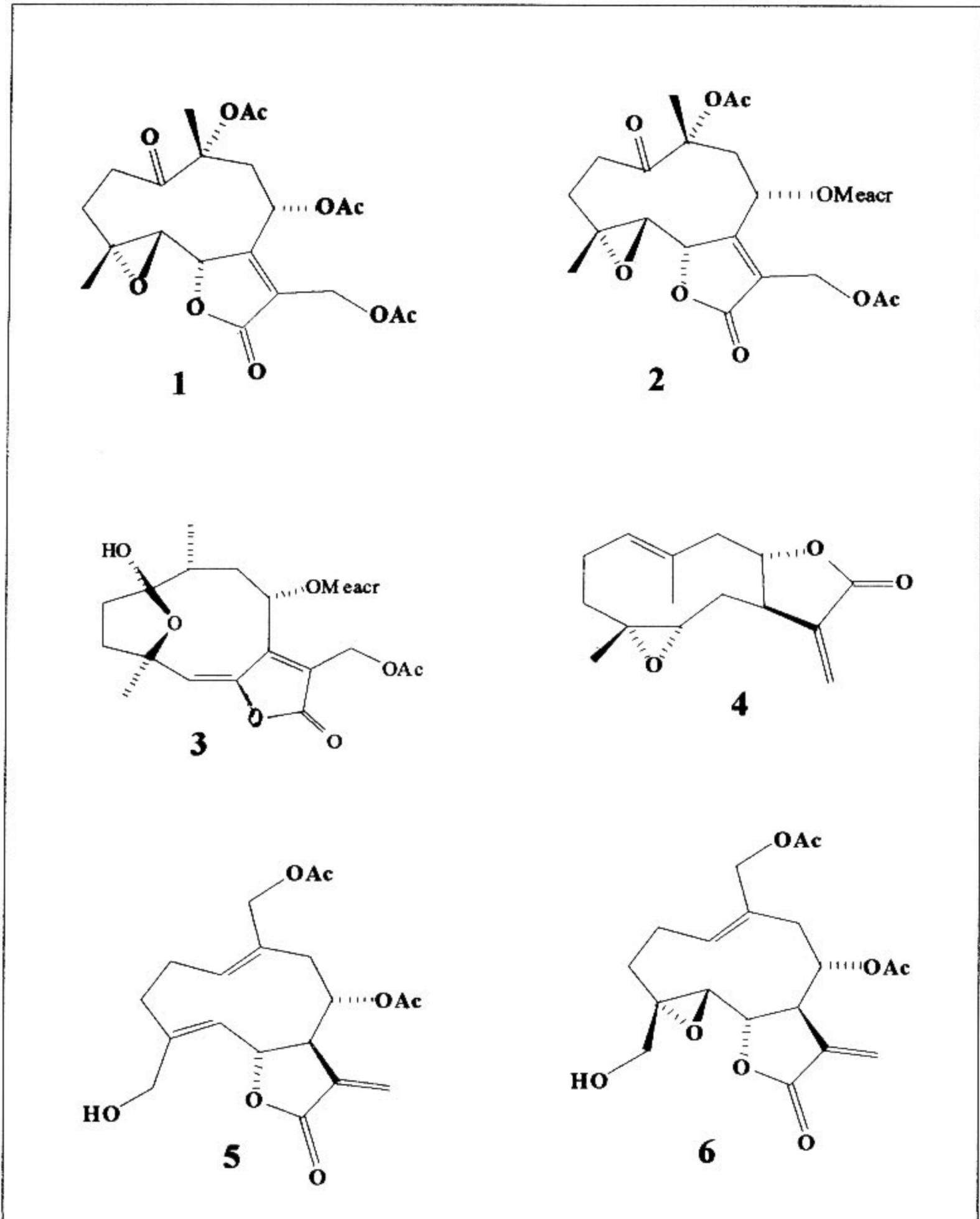


Tabla 1: Compuestos estudiados

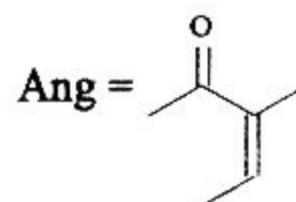
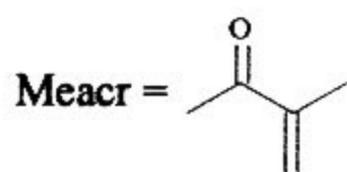
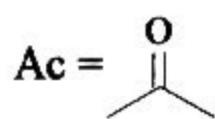
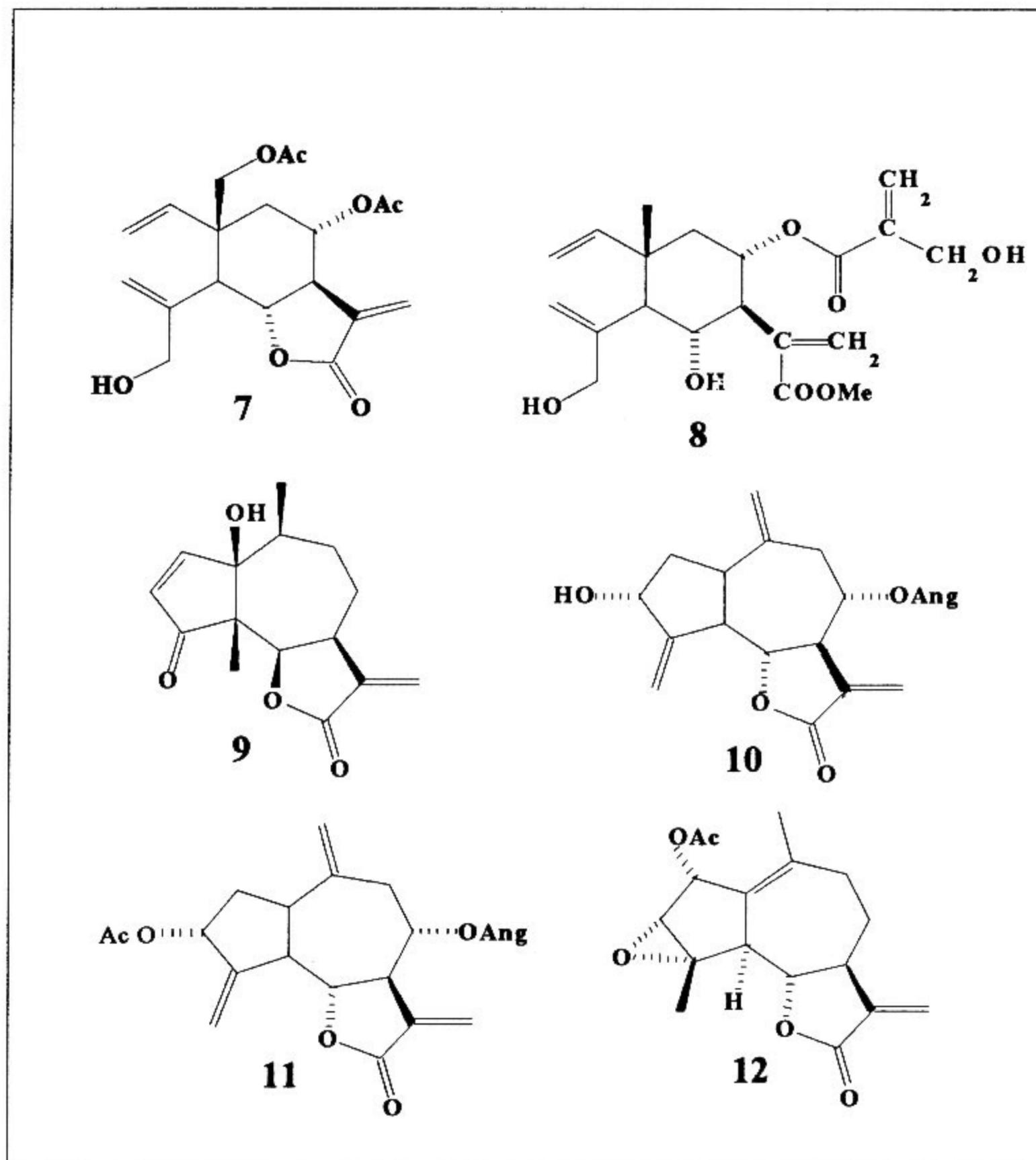


Tabla 1: Compuestos estudiados (Continuación)

Compuesto	200 ppm	400 ppm	600 ppm	1200 ppm
1	97	98	97	83
2	107	102	108	101
3	88	79	91	85
4	98	103	119	119
5	120	110	118	104
6	93	105	104	101
7	89	91	86	100
8	115	118	108	103
9	94	98	89	87
10	101	103	95	97
11	74	89	95	77
12	98	105	100	100

Tabla 2: Porcentajes de germinación con respecto al testigo tomado como 100%

Compuesto	200 ppm	400 ppm	600 ppm	1200 ppm
1	96	86	81	62
2	118	117	100	76
3	62	49	46	12
4	73	61	61	40
5	127	74	68	61
6	87	75	56	42
7	80	80	56	43
8	64	48	32	77
9	94	87	81	55
10	82	96	69	47
11	55	83	72	51
12	103	57	91	71

Tabla 3: Porcentajes de mediana de la longitud de radícula con respecto al testigo tomado como 100%

Bibliografía

- 1 Picman, A.K., (1986). **Biochem. System, Ecol.**, **14**: 255.
- 2 Fischer, N., Wiedenhamer, J. y Bradow, J., (1989). **J. Chem. Ecol.**, **15**: 1785.
- 3 Bardón, A., Catalán, C.A.N., Gutiérrez, A. y Herz, W. (1988). **Phytochemistry**, **27**: 2989.
- 4 Catalán, C.A.N., de Iglesias, D.I.A., Kavka, J., Sosa V. y Herz, W., (1986). **J.Nat.Prod.**, **49**: 351.
- 5 Resultados de nuestro laboratorio aún no publicados.
- 6 Resultados de nuestro laboratorio aún no publicados.
- 7 Cuenca, M. del R., Borkosky, S., Catalán, C.A.N., Goedken, V., Díaz, J. y Herz, W., (1993). **Phytochemistry**, **32**: 1509.
- 8 Cardona, L. Bardón, A., García, B. y Pedro, J.R., (1993). **Phytochemistry**, **33**: 1457.
- 9 Giordano, O.S., Guerreiro, E., Pestchanker M.J., Guzmán, J., Pastor, D. y Guardia, T., (1990). **J.Nat.Prod.**, **53**: 803.
- 10 Bardón, A., Catalán, C.A.N., Gutierrez, A. y Herz, W., (1990). **Phytochemistry**, **29**: 1219.
- 11 Gutiérrez, A.N. de, Sigstad, E., Catalán, C.A.N., Gutierrez, A. y Herz, W., (1990). **Phytochemistry**, **29**: 1219.
- 12 Cuenca, M. del R., Catalán, C.A.N. y Kokke, W.C.M.C., (1990). **J.Nat.Prod.**, **53**: 686.
- 13 Kato, T., Tsunakawa, M., Sasaki, N., Aizawa, H., Fujita, K., Kitahara, Y., y Takahashni, N., (1977). **Phytochemistry**, **16**: 45.
- 14 Putnam, A.R., (1983). **Chemical & Engineering News**, Abril 4: 34-35.
- 15 Fischer, N., Wiedenhamer, J.D., Riopel, J., Quijano, L., and Menelaou, M.A., (1990). **Phytochemistry**, **29**: 2479.
- 16 Macías, F., Galindo, J.C. and Massanet, G., (1992). **Phytochemistry**, **31**: 1969.
- 17 Alarcón, M.C.B., Callegari Lopes, J.L. y Herz W., (1990). **Planta Med.**, **56**: 271.
- 18 Burnett, W., Jones, S., Mabry, T.J. and Padolina, W., (1974). **Biochem. System. Ecol.**, **2**: 25.
- 19 Pettit, G., Herlad, D., Cragg, G. Rideout, J. and Brown, P., (1990). **J.Nat. Prod.**, **53**: 382.
- 20 Kupchan, S.M., Eakin, M.A. y Thomas, A.M., (1971). **J. Med. Chem.**, **14**: 1147.
- 21 Cowall, P.L., Cassady, J.M., Chancg, Ch. y Kozlowski, J.F., (1981). **J. Org. Chem.**, **46**: 1108.
- 22 Bohlmann, F., Brindöpke, G. y Rastogui, R.C., (1978). **Phytochemistry**, **17**: 475.
- 23 Hubert, T., Okunade, A., Wiemer, D., (1987), **Phytochemistry**, **26**: 1751.
- 24 Lee, K.H., Ibuka, T., Wu, R.Y., and Geissman, T.A., (1977). **Phytochemistry**, **16**: 1177.
- 25 Siegel, S. (1970). En: **Diseño experimental no paramétrico**, Trillas, México.

ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA DE PLANTAS MEDICINALES ARGENTINAS MEDIANTE EL BIOENSAYO DE *ARTEMIA SALINA* LEACH.

ELENA R. MONGELLI* JORGE D. COUSSIO** Y GRACIELA N. CICCIA*

*Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología.

** Cátedra de Farmacognosia, IQUIMEFA (CONICET).

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Junín 956 (1113) Buenos Aires. República Argentina.

Resumen:

Se efectuó el screening de los extractos acuosos de 19 plantas medicinales argentinas mediante el empleo del bioensayo de citotoxicidad de *Artemia salina* con el objeto de estudiar su toxicidad aguda.

La concentración de 10000 µg de extracto/ml de solución resultó ser el límite superior de concentración sensible para discernir entre extractos acuosos tóxicos y no tóxicos para este crustáceo.

STUDY ON THE ACUTE TOXICITY OF ARGENTINE MEDICINAL PLANTS USING THE *ARTEMIA SALINA* LEACH. BIOASSAY

Summary:

Screening of the aqueous extracts of 19 Argentine medicinal plants has been carried out using the *Artemia salina* cytotoxicity bioassay in order to study their acute toxicity. The concentration of 10000 µg of extract/ml of solution demonstrated to be the upper concentration limit sensitive to distinguish toxic and non toxic aqueous extracts to this crustacean.

Introducción

Aproximadamente 950 especies vegetales de la flora argentina figuran en la literatura

Palabras claves: Toxicidad aguda, *Artemia salina*, citotoxicidad, plantas medicinales argentinas, bioensayo.

Key words: Acute toxicity, *Artemia salina*, cytotoxicity, Argentine medicinal plants, bioassay.

por sus propiedades medicinales o tóxicas⁽¹⁻¹⁷⁾. Entre estas, la mayoría ha sido usada empíricamente por pobladores rurales e indígenas, principalmente bajo la forma de infusiones o decocciones. Debido al creciente interés del mundo occidental por los productos naturales actualmente los habitantes de las ciudades también emplean muchas de las plantas de la medicina folclórica como medicamentos herbarios.

El presente trabajo tiene por objeto el estudio de toxicidad aguda de extractos acuosos de plantas medicinales argentinas mediante el uso del ensayo de citotoxicidad de *Artemia salina* en microplaca. Este método fue elegido debido a que es relativamente rápido, económico, reproducible, y utiliza un gran número de organismos que permiten una buena evaluación estadística⁽¹⁸⁾. Además, la modificación en microplaca propuesta por Solís y colaboradores⁽¹⁹⁾ permite la disminución de la cantidad de material analizado y el procesamiento de un mayor número de muestras y diluciones en menos tiempo que el método original en viales⁽²⁰⁾. Este bioensayo ha sido ampliamente usado en screenings fitoquímicos para detectar bioactividad general y guiar el fraccionamiento⁽²¹⁻²⁴⁾, como primer paso para detectar actividad antitumoral y pesticida⁽²⁵⁻²⁸⁾ y para predecir toxicidad aguda de extractos vegetales y compuestos puros en humanos^(29,30).

Materiales y métodos

Material vegetal

Se recolectaron las plantas en sus hábitats naturales en la República Argentina. La identificación taxonómica fue llevada a cabo por botánicos del Museo de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, donde se depositaron muestras del material recolectado.

Preparación del extracto acuoso

El extracto acuoso fue preparado de la siguiente manera: Se preparó una infusión con 100 ml de agua hirviendo y 5 g de material vegetal seco y pulverizado. Se mantuvo la mezcla en reposo durante 20 minutos. Posteriormente la preparación fue filtrada y se obtuvo el extracto acuoso por liofilización.

Preparación de las muestras

Se disolvieron 10 mg de extracto en 5 ml de agua de mar artificial. Se preparó el agua de mar artificial disolviendo 3,8 g de sal marina («Marinemix», Wiegandt, Alemania) en 100 ml de agua destilada (Solución A). 100 µl y 1000 µl de esta solución se diluyeron 10 veces con agua de mar artificial (soluciones B y C).

Ensayo de citotoxicidad de *Artemia salina* en microplaca

Todas las soluciones de los extractos se testearon a niveles de concentración de

100, 1000 y 10000 µg/ml, dispensando 100 µl, por sextuplicado, en una microplaca de 96 pocillos («Kartell», Milán, Italia). Los huevos de *Artemia* («S y S», Buenos Aires, Argentina) se adquirieron en un comercio especializado en veterinaria y se incubaron en agua de mar artificial a temperatura ambiente. Luego de 48 hs. se recolectaron los nauplios. Se agregaron 100 µl de una suspensión que contenían de 10 a 15 nauplios a cada pocillo de la microplaca, la que se tapó e incubó a temperatura ambiente por 24hs. Luego de este período se contaron los nauplios muertos en cada pocillo utilizando un microscopio binocular («E. Lentz Wetzlar», 10X). Finalmente, se agregaron 100 µl de metanol a cada pocillo, y, luego de 30 minutos se contó el número total de nauplios. Se empleó berberina («Sigma», St. Louis, USA) como control positivo. Para calcular la concentración de extracto que mata al 50 % de los nauplios en 24 horas (LC50) y el intervalo de confianza del 95%, se utilizó el método estadístico probit descrito por Finney⁽³¹⁾.

Resultados

Dado que las especies vegetales en estudio (Tabla 1) se usan en la medicina popular principalmente como infusiones, en el presente trabajo se analizó la citotoxicidad de los correspondientes extractos acuosos. Se empleó para ello el bioensayo de *Artemia salina* (Ver Materiales y métodos), utilizando como parámetro de toxicidad la concentración letal 50 (LC50) menor o igual a 1000 µg/ml, propuesta por el método original tanto para los extractos acuosos como orgánicos⁽²⁰⁾. En estas condiciones de ensayo ninguno de los extractos testeados resultó tóxico. En este sentido, Abertenethy y col.⁽³²⁾ encontraron una correlación positiva entre la solubilidad en agua de varios compuestos y la toxicidad aguda hacia los crustáceos *Artemia salina* Leach. y *Daphnia magna* Strauss.: a mayor solubilidad en agua, mayor LC50 y, por lo tanto, menor toxicidad. Así, estos autores concluyen que la toxicidad aguda de muchos compuestos químicos hacia los crustáceos es influida primariamente por la forma en que se particionan las sustancias entre el agua y el organismo. En otras palabras, los compuestos extraídos por un solvente orgánico poseen mayor probabilidad de ser tóxicos que los extraídos por el agua. De esta forma, con el límite de citotoxicidad fijado como LC50 <1000 µg/ml para todo tipo de extracto, los extractos acuosos tienen, frente a los orgánicos, muy baja posibilidad de ser detectados como tóxicos.

Basándonos en estos resultados, y con el objeto de discriminar entre extractos acuosos citotóxicos y no citotóxicos se modificaron las condiciones experimentales aumentando en un orden de magnitud la concentración máxima a analizar. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. Como puede observarse, 8 de los 19 extractos ensayados resultaron tóxicos para la *Artemia*: *Aristolochia triangularis*, *Terminalia triflora*, *Achyrocline flaccida*, *Baccharis coridifolia*, *B. grisebachii*, *Phyllanthus sellowianus*, *Satureja parvifolia* y *Balbisia calycina*.

Estos resultados coinciden con la toxicidad informada para *Aristolochia triangularis* y *Baccharis coridifolia*⁽³³⁾. Con respecto a la primera, es interesante señalar que contiene ácido aristolóquico, que es uno de los más potentes carcinógenos conocidos⁽³⁴⁾. Además, las especies del género *Aristolochia* integran una lista de hierbas que no se pueden

importar en Australia para uso terapéutico⁽³⁵⁾. Asimismo, cabe consignar que la *Baccharis coridifolia* se encuentra descripta dentro de las especies tóxicas para el ganado en Sudamérica⁽³⁶⁾.

De acuerdo con estos hallazgos, se considera más apropiado 10000 µg/ml como límite de concentración superior para el screening de extractos acuosos con el fin de detectar toxicidad aguda.

Dado que *Achyrocline flaccida*, *Phyllanthus sellowianus*, *Satureja parvifolia* y *Balbisia calycina*, son especies vegetales actualmente comercializadas en el mercado argentino como medicamentos herbarios, sería interesante encarar un estudio más exhaustivo sobre la toxicidad aguda y crónica de estas plantas en modelos animales.

Conclusiones

El límite de 1000 µg/ml para discernir entre extractos activos y no activos en el ensayo de *Artemia salina* propuesto por Meyer y col.⁽²⁰⁾ para todo tipo de extracto vegetal, no resultó satisfactorio para el screening primario de citotoxicidad de extractos acuosos. Si se tiene en cuenta que este bioensayo es útil para predecir toxicidad aguda de extractos vegetales y compuestos puros en humanos^(29,30), se considera que 10000 µg/ml sería el límite máximo de concentración sensible para diferenciar extractos acuosos tóxicos y no tóxicos.

Bibliografía

1. Parodi, D. (1881). **Ensayo de Botánica Médica Comparada**. Tesis doctoral. Facultad Nacional de Ciencias Medicas, Imprenta Pablo Coni, Buenos Aires: 16-103.
2. Hieronymus, J. (1882). **Plantae diaphoricae florum argentinae**. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba, Tomo IV, Buenos Aires: 207-531.
3. Rojas Acosta, N. (1905). **Plantas medicinales del Chaco Austral**. Imprenta Gadola, Buenos Aires: 3-31.
4. Domínguez, J.A. (1928). **Contribuciones a la Materia Médica Argentina**. Trabajos del Instituto de Botánica y Farmacología 44, Talleres SA Casa Jacobo Peuser, Buenos Aires: 80-413.
5. Bandoni, A. L. y col. (1972). Survey of Argentine medicinal plants: Folklore and phytochemical screening. **J. of Nat. Prod.** 35: 69-80.
6. Amorín, J.L. (1980). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (primera parte). **Revista de Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología** 3: 7-25.
7. Amorín, J.L. (1980). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (segunda parte) **Revista de Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología** 3: 95-112.

8. Ratera, E.L. y Ratera, M. O. (1980). **Plantas de la flora Argentina empleadas en Medicina Popular**. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 57-190.
9. Toursarkissian, M. (1980). **Plantas medicinales de la Argentina: sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica**. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 1-178.
10. Martínez Crovetto, R. (1981). **Plantas utilizadas en Medicina en el Noroeste de Corrientes**. Ministerio de Cultura de la Nación, Tucumán: 13-125.
11. Vuoto, P.M. (1981). Plantas útiles de los toba-taksek. **Entregas del Instituto Tilcara** (Tilcara, Jujuy, Argentina) 1: 12-76.
12. Amorín, J. L. y Rossow, Ricardo A. (1989). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (primera parte) **Dominguezia** 1: 31-40.
13. Amorín, J. L. y Rossow, Ricardo A. (1990). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (segunda parte) **Dominguezia** 1: 28-33.
14. Amorín, J. L. y Rossow, Ricardo A. (1991). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (tercera parte) **Dominguezia** 1: 54-63.
15. Amorín, J. L. y Rossow, Ricardo A. (1992). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (cuarta parte) **Dominguezia** 1: 35-40.
16. Iharlegui, L. y Hurrell, J. (1992). Asteraceae de interés etnobotánico de los Departamentos de Santa Victoria e Iruya (Salta, Argentina). **Ecognición** 3: 3-18.
17. Base de datos del IQUIMEFA (CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires.
18. Mc Laughlin, J. L., Chang, Ch-J. y Smith, D. L. (1991). **Studies in natural products chemistry**, vol. 9, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 383-409.
19. Solís, P. N. y col. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Medica** 59: 250-252.
20. Meyer, B.N. y col. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. **Planta Medica** 45: 31-34.
21. Del Rayo Camacho y col. (1991). Pinoembrine: a bioactive flavonone from *Teloxys graveolens*. **J. of Ethnopharmacol.** 31, 383-389.
22. Fatope, M.O., Ibrahim, H. y Takeda Y. (1993). Screening of higher plants reputed as pesticides using Brine shrimp Lethality Assay. **In. J. of Pharmacognosy** 31: 250-254.
23. González, A. y col. (1993). Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **J. of Ethnopharmacol.** 39: 217-220.
24. Mousa, O. y col. (1994). Bioactivity of certain Egyptian Ficus species. **J. of Ethnopharmacol.** 41: 71-76.
25. Mikolajczak, K. L., Mc Laughlin, J. L. y Rupprecht, J. K. (1988). U.S. Patent No. 4, 721, 728; Enero 26.
26. Mikolajczak, K. L., Mc Laughlin, J. L. y Rupprecht, J. K. (1989). U.S. Patent No. 4, 855, 319; Agosto 8.
27. Mc Laughlin, J. L. (1992). **Methods in Plant Biochemistry**, vol. 6, Academic Press, New York, 1-32.
28. Mc Laughlin, J. L. y Hui, Y-H. (1993). U.S. Patent No 5, 229, 419; Julio 20.

29. Calleja, M.C. y Persoone, G. (1992). Cyst-based toxicity test IV. The potential of ecotoxicological test for the prediction of acute toxicity in man as evaluated on the first ten chemicals of the MEIC programme. **ATLA** 20: 396-405.
30. Noamesi, B. K. y col. (1994). Antiulcerative properties and acute toxicity of some African medicinal plants extracts. **J. of Ethnopharmacol.** 42: 13-18.
31. Finney, D. (1971). **Probit Analysis**. Cambridge University Press, Cambridge.
32. Abernethy, S. y col. (1986). Acute lethal toxicity of hydrocarbons and chlorinated hydrocarbons to two planktonic crustaceans: the key role of organism-water partitioning. **Aquatic Toxicol.** 8: 163-174.
33. Ragonese, A.E. y Milano, V. A. (1984). Vegetales y sustancias tóxicas de la Argentina. **Encicl. Argent. Agric. Jard.** 2(8-2): 92-97; 317-322.
34. De Smet, P. A.G.M. (1992). **Adverse effects of herbal drugs**. Springer-Verlag, Berlin vol 1: 84-85.
35. Anonymous. (1988). Guidelines for importers of therapeutic substances into Australia. Dept. of Community, Services and Health, Canberra.
36. Gallo, G.G. (1979). **Plantas tóxicas para el ganado en el Cono Sur de América**. EUDEBA, Buenos Aires: 103-108.
37. Parker, J. (1949). **Mil plantas medicinales**. Biblioteca nueva, Buenos Aires: 170.
38. Boelcke, O. (1992). **Plantas vasculares de la Argentina. Nativas y exóticas**. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 208.
39. Zardini, E. M. (1984). Etnobotánica de Compuestas argentinas con especial referencia a su uso farmacológico. **Acta Farmacéutica Bonaerense** 3: 77-99.
40. Giberti, G. (1983). Herbal folk medicine in Northwestern Argentine (Compositae) **J. of Ethnopharmacol.** 7: 321-341.
41. Burgstaller, J. (1984). **700 Hierbas Medicinales**. Librería Hachette, Buenos Aires: 130.
42. Soraru, S. B. y Bandoni, A. L. (1978). **Plantas de la Medicina Popular Argentina**. Albatros, Buenos Aires: 53.
43. Alonso Paz, E., Bassagoda, M. J. y Ferreira, F. (1992). **Yuyos. Uso racional de las plantas medicinales**. Fin de Siglo, Montevideo: 92.
44. Moreno Azorero, R. 1975. **Obstetricia y Ginecología Latinoamericana**, set-oct: 17.

Tabla 1. Datos etnobotánicos de las plantas estudiadas.

Familia, nombre botánico	Nombre vulgar	Parte usada ^a	Uso popular	Ref.
ARISTOLOCHIACEAE <i>Aristolochia triangularis</i> Cham. et Schlecth.	Mil hombres.	C.	Antiséptica. Antirreumática. Emenagoga. Antídoto. Abortiva.	8, 9, 37,38.
COMBRETACEAE <i>Terminalia triflora</i> (Griseb.) Lillo.	Lanza amarilla.	H.	Tintórea.	38.
COMPOSITAE <i>Achyrocline flaccida</i> (Weinm.) DC.	Marcela hembra.	PA.	Antiespasmódica. Tónica. Antihelmíntica. Febrífuga.	5.
<i>Ambrosia tenuifolia</i> Spr.	Altamisa, ajeno del campo.	PA.	Antitusiva. Abortiva. Anticoncep. Antirreumática. Antineurálgica.	39.
<i>Baccharis coridifolia</i> DC.	Romerillo, mío-mío.	PA.	Antiinflamatoria uso externo. Tratamiento de las bicheras de los caballos. En sahumerio, quemada junto con azufre, para tratar el moquillo de los caballos.	5,10, 39.
<i>Baccharis grisebachii</i> Hieron.	Quinchamal, lancha.	PA.	Tratamiento de heridas. Antirreumática.	39,40.
<i>Eupatorium arnotianum</i> Griseb.	Clavel, uoué.	PA.	Antespasmódica.	16.
<i>Eupatorium buniifolium</i> H. et A.	Romero, romerillo colorado, romerillo.	PA.	Antiséptica. Hepatoprotectora.	3,41.
<i>Eupatorium candolleanum</i> H. et A.	Iyagaelta'a, tabaco del monte.	PA.	Purgante.	11.
<i>Eupatorium christianum</i> Bak.	Hoja de la Virgen.	PA.	Tratamiento de enferm. renales.	39.
<i>Eupatorium hecatanthum</i> (DC.) Bak.	Uoué.	PA.	Analgesica. Antitusiva. Antiespasmódica.	11.
<i>Eupatorium laevigatum</i> Lam.	Doctorcito. Caá-hú.	PA.	Emenagoga. Tintórea.	39.
<i>Eupatorium macrocephalum</i> Less.	Illa ka'ik.	PA.	Antitusiva. Digestiva. Abortiva.	39.
<i>Gamochaeta simplicicaulis</i> Cabr.	Plan-kachú.	PA.	Contra la viruela, el sarampión y la varicela. Uso externo: lavado de granos y llagas.	5.
EUPHORBIACEAE <i>Phyllanthus sellowianus</i> Mueller Arg.	Sarandí blanco, sará- morotí.	C.	Antidiabética. Purgante. Diurética. Antiséptica. Antihipertensiva.	42,43.
LABIATAE <i>Satureja parvifolia</i> (Phil.) Epl.	Muña-muña.	PE.	Afrodisíaca. Digestiva.Emenagoga. Tratamiento del apunamiento.	2, 9.
<i>Satureja odora</i> (Griseb.) Epl.	Muña-muña	H.	Digestiva.	9.
LEDOCARPACEAE <i>Balbisia calycina</i> (Gris.) AT.Hunziker et Ariza.	Té andino.	PA.	Carminativa. Digestiva. Antiácida.	41.
POLYPODIACEAE <i>Campyloneuron phyllitidis</i> (L.) Presl.	Calaguala.	H.	Abortiva.Reguladora de la fertilidad	44.

^a Parte usada: C, corteza; H, hojas; PA, parte aérea; PE, planta entera.

Tabla 2. LC50 e intervalo de confianza del 95 % ($\mu\text{g/ml}$) de los extractos acuosos testados a 10000, 1000 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

Planta (Familia, nombre botánico)	LC50 e intervalo de confianza del 95 % ($\mu\text{g/ml}$)
ARISTOLOCHIACEAE <i>Aristolochia triangularis</i>	3309 (3901-2713)
COMBRETACEAE <i>Terminalia triflora</i>	6094 (7232-5323)
COMPOSITAE <i>Achyrocline flaccida</i>	4917 (5905-4045)
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	>10000
<i>Baccharis coridifolia</i>	4173 (4830-3394)
<i>Baccharis grisebachii</i>	2288 (2938-1627)
<i>Eupatorium amottianum</i>	>10000
<i>Eupatorium buniifolium</i>	>10000
<i>Eupatorium candolleanum</i>	>10000
<i>Eupatorium christeanum</i>	>10000
<i>Eupatorium hecathantum</i>	>10000
<i>Eupatorium laevigatum</i>	>10000
<i>Eupatorium macrocephalum</i>	>10000
<i>Gamochoeta simplicicaulis</i>	>10000
EUPHORBIACEAE <i>Phyllanthus sellowianus</i>	3490 (4160-2641)
LABIATAE <i>Satureja parvifolia</i>	3235 (3712-2764)
<i>Satureja odora</i>	>10000
LEDOCARPACEAE <i>Balbisia calycina</i>	8002 (13119-5987)
POLYPODIACEAE <i>Campyloneuron phyllitidis</i>	>10000

EL ACIDO LACTICO: VERSATILIDAD DE UN REACTIVO

ALBERTO M. STCHIGEL y ALBERTO A. GURNI

Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.
Junín 956, 4° P. (1113) Buenos Aires.

LACTIC ACID, ITS VERSATILITY AS A REAGENT FOR MEDICINAL PLANT QUALITY CONTROL

Summary:

Lactic acid has been used in histological methods as clarificant for a long time. Its use is proposed now to make materials transparent and to achieve disintegration of tissues.

El ácido láctico se emplea desde hace mucho tiempo en técnicas de histología vegetal. Interviene en la composición de distintas fórmulas utilizadas como clarificantes^(1,2). La solución acuosa al 5% es empleada con ese fin en el análisis de drogas en polvo.

En esta comunicación se proponen otras posibles aplicaciones del ácido láctico en el ámbito del control de calidad de las plantas medicinales:

- a) Como agente diafanizante: Se prepara una solución al 50% en agua. El material vegetal se lleva a ebullición en esa solución hasta que se evapore el agua (reducción del volumen a la mitad).
Se lava y observa al microscopio. En esas condiciones, el material se vuelve transparente como para permitir la visualización de epidermis y cristales. Se puede emplear esta técnica para el análisis de flores.
- b) Como agente disociante leve: El material se hierve en ácido láctico puro hasta que el líquido toma color pardusco, pero aún se mantiene límpido. Se lava. Se termina de disgregar entre porta y cubreobjetos. Tiene las mismas aplicaciones que otros reactivos empleados con ese fin.
- c) Como agente disociante fuerte: El material se hierve en ácido láctico puro hasta que el líquido adquiere color pardo oscuro y se enturbia. Se lava con agua destilada y se hierve con solución de KOH 10% durante 10 minutos. Se lava y se termina de disgregar entre porta y cubreobjetos. El método tiene las mismas aplicaciones y alcances de otros agentes disociadores fuertes.

Conclusiones

Estas metodologías resultan de utilidad como alternativa de las técnicas que se emplean tradicionalmente para la resolución de problemas analíticos relacionados con vegetales. Un inconveniente que se presenta es que los cistolitos se disuelven por acción del ácido láctico, por lo cual estos métodos no serán empleados cuando se trata de visualizarlos.

Bibliografía

1. D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). **Manual de técnicas en Histología Vegetal**. . Hemisferio Sur. Buenos Aires: 74.
2. World Health Organization (1990). **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**. WHO/PHARM/92.559: 79.
3. Gurni, A.A. (1988). **Guía de Trabajos Prácticos de Farmacobotánica**.. Centro de Estudiantes de Farmacia y Bioquímica: 22.