



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

Trabajo de Tesis de Magister en Plantas Medicinales

“Etnofarmacología gastrointestinal de plantas medicinales argentinas del género *Aloysia*, familia Verbenaceae: mecanismos de acción y relación con los principios activos”

---



Tesista: Lic. Farm. Andrea Berardi

Directora: Prof. Dra. Alicia E. Consolini

Año 2010

Berardi, Andrea Beatríz

Etnofarmacología gastrointestinal de plantas medicinales argentinas del género aloysia, familia verbenaceae : mecanismos de acción y relación con los principios activos.  
- 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2012.

E-Book.

ISBN 978-950-34-0861-2

1. Plantas Medicinales. 2. Angiospermas. 3. Tesis. I. Título  
CDD 580

Fecha de catalogación: 15/06/2012

***Dedico esta tesis:***

♥ *A mis hijos, por todo el tiempo que me acompañaron*

♥ *A mi amado esposo Carlos, por su paciencia y apoyo continuo*

♥ *A mi madre Beatriz Pindur, una farmacéutica de ley, que junto a mis abuelos me inculcaron el amor por la botica desde pequeña*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Facultad de Ciencias Exactas, por la posibilidad de realizar esta Tesis de Magister en Plantas Medicinales.*

*A la Dra Marta Nájera, que con su dulce voz me llevó por los caminos de los aromas, hechizos y leyendas de nuestra tierra*

*A la Dra Etile Spegazzini por tantos diálogos enriquecedores*

*A la Dra Kitty Volonté, siempre dispuesta y gentil, por su ayuda con los análisis de flavonoides*

*A Mary Rosella, por su paciencia en guiarme en las cromatografías en capa delgada, por su colaboración y su amabilidad*

*Al Dr Luis Bruno-Blanch, por su pasión y garra al enseñar, y por ser tan buena persona*

*Al Dr Jorge Ringuelet, por la calidez en sus clases*

*A los Ing Agr. Walter Abedini, Sandra Sharry y Cecilia Rivas, por brindarlo todo en sus clases*

*A la Dra Silvia Debenedetti, que con su energía me encaminó a tiempo*

*A María Inés Ragone y Germán de Farmacología, por las charlas, colaboración y buena onda recibidas*

*Finalmente, a mi directora y amiga, la Dra Alicia Consolini, quien me prestó toda su energía, una sonrisa permanente, mil palabras de aliento. Por tantas jornadas compartidas... todo mi cariño y agradecimiento*

# INDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Las plantas medicinales en terapéutica</b>	<b>8</b>
<b>1.2. La biodiversidad y el cultivo de plantas medicinales</b>	<b>10</b>
<b>1.3 Cultivo de plantas del género <i>Aloysia</i></b>	<b>15</b>
<b>1.4. Propiedades terapéuticas y fitoquímicas de las plantas del género <i>Aloysia</i></b>	<b>18</b>
<b>1.5 Bases para el estudio de las propiedades antiespasmódicas</b>	<b>25</b>
<b>1.6 Hipótesis de trabajo</b>	<b>26</b>
<b>1.7 Objetivos de la tesis</b>	<b>26</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Material vegetal utilizado</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Preparación de los extractos</b>	<b>28</b>
<b>2.3. Preparación de las tinturas</b>	<b>28</b>
<b>2.4 Animales</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Preparado biológico</b>	<b>28</b>
<b>2.6. Estudio de la actividad antiespasmódica</b>	<b>29</b>
<b>2.7. Soluciones empleadas y curvas dosis-respuesta</b>	<b>30</b>
<b>2.8. Protocolos farmacológicos y cálculo de parámetros</b>	<b>30</b>
<b>2.9. Estudios fitoquímicos</b>	<b>33</b>
<b>2.9.1- Determinación del contenido total de flavonoides</b>	<b>33</b>
<b>2.9.2- Determinación de la presencia de vitexina e isovitexina por HPLC</b>	<b>34</b>
<b>2.9.3- Perfil de flavonoides por cromatografía en capa delgada (CCD)</b>	<b>35</b>
<b>2.9.4- Determinación de la presencia de terpenos como (-) carvona por CCD</b>	<b>35</b>
<b>2.10- Métodos estadísticos</b>	<b>36</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>3.0 Estudios farmacológicos</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Efectos antiespasmódicos de los extractos acuosos</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Efectos antiespasmódicos de las tinturas madres</b>	<b>41</b>
<b>3.3. Efectos sobre la contractura tónica producida por despolarización</b>	<b>43</b>
<b>3.4. Efectos sobre la contractura tónica producida por acetilcolina</b>	<b>44</b>
<b>3.5. Efectos sobre los canales de K<sup>+</sup> en la CDR de acetilcolina</b>	<b>46</b>
<b>3.6. Evaluación de la posible liberación de dopamina</b>	<b>48</b>
<b>3.7. Efectos sobre el influjo a través de canales de Ca<sup>2+</sup></b>	<b>49</b>
<b>3.8. Efectos antiespasmódicos de (-) carvona</b>	<b>52</b>
<b>3.9. Estudios fitoquímicos</b>	<b>54</b>
<b>3.9.1 Determinación del contenido total de flavonoides</b>	<b>54</b>
<b>3.9.2 Determinación de la presencia de vitexina e isovitexina</b>	<b>55</b>
<b>3.9.3- Caracterización de la presencia de flavonoides por cromatografía en capa delgada (CCD)</b>	<b>57</b>
<b>3.9.4- Determinación de la presencia de terpenos como (-) carvona por CCD</b>	<b>60</b>

<b>DISCUSION</b>	<b>62</b>
<b>4.1 Efectos sobre la CDR de Ach</b>	<b>63</b>
<b>4.2- Efectos relajantes de la contractura tónica</b>	<b>64</b>
<b>4.3 Mecanismos de acción</b>	<b>65</b>
<b>4.4 Efectos de (-)-carvona</b>	<b>67</b>
<b>4.5 Estudios fitoquímicos</b>	<b>68</b>
<b>4.5 Conclusiones</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>72</b>



*Aloysia polystachya* (burrito)



*Aloysia gratissima* (palo amarillo)

## RESUMEN

Esta tesis avala experimentalmente el uso popular de “burrito” (*Aloysia polystachya*) y de “palo amarillo” (*A. gratissima*) (Verbenaceae) como digestivos antiespasmódicos. Los efectos espasmolíticos de los extractos acuosos (EA) y tinturas (T) de estas dos especies de *Aloysia* se estudiaron en ileons y duodenos aislados de rata. Ambos EA inhibieron no-competitivamente las curvas dosis-respuesta (CDR) de acetilcolina (Ach) y la CDR de  $\text{Ca}^{+2}$  en medio de alta  $[\text{K}^+]_o$ , así como lo hicieron las tinturas. Ambas T de *A. polystachya* y *A. gratissima* inhibieron respectivamente la CDR-Ach a la CI50 de  $3.15 \pm 0.57$  y  $6.46 \pm 2.28$  mg hojas/ml). La actividad antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$  de ambas T se produjo con CI50 respectivamente similares a las que inhibieron la CDR-Ach, y fue potenciada por la despolarización producida por el bloqueante de los canales de  $\text{K}^+$ , TEA 10 mM. El efecto de T de *A. polystachya* no involucró la liberación de dopamina con efecto en receptores D2, pues no fue bloqueado por 10  $\mu\text{M}$  metoclopramida. Además, las T relajaron en modo concentración-dependiente a la contractura tónica producida por alta  $[\text{K}^+]_o$ . En pruebas fitoquímicas se detectó la presencia de flavonoides, y por TLC monoterpenos como (-)-carvona en las hojas. Por HPLC se descartó la presencia de los flavonoides vitexina e isovitexina, que habían sido identificados en *A. citriodora*. El monoterpeno (-)-carvona que fue caracterizado por otros como un componente del aceite esencial de *A. polystachya* también inhibió no-competitivamente la CDR-Ach ( $\text{pD}'_2$  of  $4.0 \pm 0.1$ ) y la CDR- $\text{Ca}^{+2}$  ( $\text{pD}'_2$  of  $3.86 \pm 0.19$ ), sugiriendo que el bloqueo del influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  es el mecanismo principal del efecto antagonista de la DRC-Ach. Los resultados sugieren que el efecto antiespasmódico de *A. polystachya* y *A. gratissima* es explicado mayormente por un bloqueo no-competitivo del influjo de  $\text{Ca}^{+2}$ , y por la presencia de flavonoides y componentes de la esencia como (-)-carvone, la cual relaja el músculo liso por reducir el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$ .

# **INTRODUCCION**



## **1.1 Las plantas medicinales en terapéutica**

En los sistemas de salud de los países subdesarrollados o en desarrollo, las plantas representan una alternativa terapéutica de diversas afecciones del ser humano y animales. La OMS, estimó que más del 80 % de la población mundial usa la medicina tradicional para cubrir sus necesidades en la atención primaria, con el empleo de extractos de plantas o sus principios activos. Algunas plantas medicinales empleadas en países del primer mundo cuentan con estudios farmacológicos que avalan su uso y determinan sus mecanismos de acción, estando sus monografías incorporadas en diversas farmacopeas, en la OEA y en la Comisión E europea (Capasso y col. 2003, WHO 1999). Sin embargo, en nuestro país se utilizan más frecuentemente plantas autóctonas, que cuentan con menor cantidad de estudios farmacológicos experimentales y clínicos, de manera que hay poca bibliografía disponible (Soraru y Bandoni 1978, Gupta 1995, Marzocca 1997, Lahitte y col. 1998, Alonso y Desmarchelier 2005).

La mitad o más de los fitofármacos que se utilizan en el mundo se solicitan sin prescripción médica. Un estudio reciente realizado en la provincia de Buenos Aires mostró que durante el período de un año se dispensaron 43608 plantas medicinales en 260 farmacias, representadas por un 80.1 % de drogas crudas de herboristería y un 19.9 % de fitoterápicos. Se observa que sólo un 3.5 % de las hierbas medicinales fueron prescritas por el médico, correspondiendo en su mayoría a malva, manzanilla y tilo (Consolini y col. 2007). Dolencias como las de índole gastrointestinal, circulatorias periféricas, obesidad, eczemas, ansiedad e insomnio, tos y gripe, entre otras, suelen ser tratadas con fitoterápicos generalmente por automedicación. Otras dolencias crónicas pueden requerir el uso de tisanas como coadyuvantes, por ejemplo para regular la presión arterial, la glucemia, la colesterolemia. Así, la popularidad que logró la medicina natural para tratar ciertas enfermedades ha

estimulado el uso de muchas especies sobre todo herbáceas, para su recolección o cultivo bajo condiciones estandarizadas.

El otro aspecto es la utilización de las plantas medicinales como fuente de nuevos y novedosos principios activos para tratar enfermedades en las que se dispone de escaso arsenal terapéutico. Muchos programas actualmente trabajan en busca de compuestos de origen vegetal con acción anti-sida y anti-cáncer. Especialmente India, África y Sudamérica, son las principales fuentes de productos vegetales patentables y poseen el conocimiento etnoterapéutico ancestral de la medicina ayurvédica por ejemplo. Compuestos como carotenoides, alcaloides, bases nitrogenadas, tienen importancia farmacéutica. (Arvelija, 2010). También sigue siendo promisorio y de alta competencia la obtención de nuevas moléculas de vegetales para su uso en cosmética y perfumería. Un factor que ha provocado cambio en el uso de plantas útiles y en la programación de sus cultivos es la necesidad de las industrias químicas, farmacéuticas, alimenticias etc., las cuales demandan algunas especies para la extracción de alcaloides, pigmentos orgánicos, saponinas u otros tipos de sustancias orgánicas. Si una especie en particular abunda, eso lleva a que el precio al que se vende en el mercado nacional e internacional disminuya. Por ende el productor (si la especie es cultivada) no verá incentivos para continuar con su explotación, y por lo tanto, continuará con la búsqueda de nuevas opciones. Eventualmente, terminará por decidir cultivar lo que sus proveedores le invitan a sembrar, lo que conlleva al abandono, a la erosión genética de la especie, y a la producción de monocultivos.

En los países en desarrollo, donde las hierbas son producidas en pequeños establecimientos y la mano de obra familiar se ocupa desde la siembra hasta el embalaje final, se carece de tecnología y soporte por parte de sus municipios, para poder ofrecer un material con mayor valor agregado. En nuestro país, el INTA y otros organismos no gubernamentales, y particulares, aproximadamente hace dos décadas están facilitando la tarea en zonas rurales,

con reuniones periódicas, haciendo cursos de emprendimientos y proveyendo el material de trabajo en muchos casos, así como la importante labor de las cooperativas zonales, para incentivar al productor, a implementar sencillos y medianos cambios en su labor cotidiana para que su unidad de trabajo se torne más rentable y diversificada. La producción en el mercado mundial se comercializa generalmente sin procesamiento alguno (cerca del 80 %), y el resto, se comercializa molida, mezclada, como aceite esencial u oleoresina, para la industria de la alimentación, farmacéutica, cosmética, etc.

### **1.2. La biodiversidad y el cultivo de plantas medicinales:**

Muchas de las especies medicinales por encontrarse en estado silvestre y/o como malezas a orillas de caminos, dentro del monte, como árboles secundarios del bosque, no tienen una verdadera presión de crecimiento. Por el contrario, los cambios del ambiente causados por la acción del hombre han favorecido su destrucción. Sin embargo algunas plantas como las que crecen dentro del bosque primario, en las áreas vírgenes o fronteras agrícolas, si se encuentran seriamente amenazadas por la destrucción del hombre en búsqueda de áreas de cultivos o de expansión de la ganadería y/o explotación maderera.

El uso de plantas medicinales en la vida cotidiana popular, hace que en muchos hogares, en el interior de nuestro país, en países limítrofes como Brasil, Paraguay, se promueva el cultivo casero de un gran número de especies medicinales, siendo en la mayoría de los casos el principal propósito para su cultivo, el ornamental (por ejemplo el *Equisetum* o cola de caballo). Ciertas instituciones buscan el acceso a la biodiversidad tropical, con el principal propósito de desarrollar productos patentables y lucrativos, dando escasa importancia a la conservación. Bajo los actuales acuerdos cada vez que los pueblos indígenas comparten información o materiales genéticos, pierden el control sobre dichos recursos, sin

ser compensados por ello. Las revistas científicas internacionales solicitan a los autores que se declare el conocimiento aborigen, a modo de protección de derechos y de la biodiversidad.

Los científicos, en el ámbito mundial, han señalado que una medida para salvaguardar el futuro del planeta y sus recursos naturales es la conservación de la biodiversidad; esta preocupación es causada por la acelerada extinción de especies y ecosistemas en todo el planeta, así como el creciente valor económico de los materiales genéticos naturales con fines farmacológicos, alimentarios, industriales, etc. En América Latina y el Caribe la pobreza de ingresos afecta a 110 millones de personas y sigue creciendo según el informe del PNUD (Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo), de 1997. En su informe de 1998 señala que en los últimos dos decenios América Latina y el Caribe perdieron 7 millones de hectáreas de bosques tropicales (Cano 2004).

La extinción de ecosistemas y especies en América latina es parte del proceso de degradación ambiental que sufre toda Latinoamérica, provocado por el uso inapropiado del territorio. Las causas principales de extinción de especies y ecosistemas tienen su origen en los estilos de desarrollo y los sistemas tecnológicos que se utilizan en el proceso de incorporación de los ecosistemas naturales al desarrollo de la sociedad. La progresiva urbanización del territorio implica un proceso de cambio de uso de la tierra. Esto trae como consecuencia, que sistemas productivos humanos simplificados transformen y sustituyan extensas superficies de ecosistemas naturales. Estos ecosistemas sufren modificaciones profundas en su estructura, composición y dinámica, perdiendo elementos de diversidad biológica y capacidad de regenerarse. Los principales factores que causan problemas en los sistemas de cultivo en el país son los siguientes: (Marelli, 2004):

- Falta de estudios más detallados sobre la flora autóctona y sus propiedades.
- Insuficientes políticas nacionales y territoriales en cuanto a la promoción sobre el uso y aprovechamiento de las especies medicinales.

- Falta de una cultura en cuanto al uso de estas especies, sobre todo del sector urbano.
- Falta de incentivos que permita promocionar estas especies y sus derivados.
- Destrucción y transformación de hábitats naturales, principalmente por la remoción de la cobertura vegetal en áreas protegidas.
- Establecimiento de agricultura y pastos, cuando se producen cambios de uso de la tierra de carácter temporal (cultivos migratorios) o permanentes (pastos para ganadería, urbanización), se modifican, provocando la desaparición y desplazamiento de especies. En la Región Central y Atlántica, se pierden anualmente 1.4 millones de hectáreas.
- Incendios forestales, extracción forestal excesiva, introducción de especies exóticas.
- Falta del conocimiento de la población hacia la importancia de conservar estos ecosistemas y recursos.

La suma de los efectos provocados por la destrucción del hábitat y el aprovechamiento directo de las especies constituyen el origen de la extinción y amenazas de los recursos genéticos. Los procesos de extinción no son fácilmente perceptibles a simple vista y solo atraen la atención del estado y la sociedad cuando afectan a especies de importancia económica, o cuando ya una región extensa demuestra un nivel de degradación tal, que la pérdida de los recursos genéticos es absoluta.

En definitiva, una estrategia, planeada con anticipación, una buena gestión de los organismos intervinientes, que siga el trabajo de cerca, cambiaría paulatinamente la condición de explotación de la flora, generando alternativas que otorguen mayor valor agregado para los productores y para la comunidad aledaña. Con un resultado positivo, al desarrollar la región, se lograría un importante cambio social, evitando la emigración y el desarraigo de los trabajadores y mejorando el desarrollo local.

La biotecnología es una herramienta poderosa que permite mejorar el cultivo de plantas medicinales y la producción de alimentos, de modo de favorecer el desarrollo de una

región, mejorando la calidad de vida, dando mayor valor agregado a un producto nacional y genuino, basándose en las necesidades de una comunidad. Así lo demuestran las siguientes opiniones:

“América latina y el Caribe, como región productora y exportadora de alimentos, debe transformarse en uno de los protagonistas en el campo de las ciencias de la vida y la biotecnología. El progreso ayudará a la investigación y evaluación de las aplicaciones potenciales, con el fin de cubrir los temas de seguridad medioambiental y las necesidades locales relacionadas con la reducción de la pobreza, la mejora en la seguridad alimentaria y aumento de la calidad nutricional”. (Izquierdo, 1998)

“En particular, la biotecnología permite lograr mejores drogas para tratamientos médicos diseñados a la medida de los requerimientos de pacientes individuales, o sea, medicina personalizada; nuevos productos agrícolas, de los tradicionales y convencionales, pero genéticamente transformados; nuevos procesos industriales y agroalimentarios; nuevos nutracéuticos.” (Cano, 2004)

El cultivo de una planta medicinal se recomienda cuando: existen pocas plantas nativas o éstas están dispersas, resulta inaccesible su recolección pues están en lugares de difícil acceso (áreas montañosas, boscosas, geográficamente accidentadas, ejemplares muy altos, etc.), se requiere mejorar el contenido de sus principios activos (aumentar la concentración de un principio activo, por ej: carvona, y disminuir las moléculas que posean efectos adversos, por ej: tuyona). Además, el cultivo es esencial cuando resulte indispensable hacer las labores a campo y organizar a los ejemplares en un área determinada, de fácil acceso y manejo por luminosidad, riego, protección del clima (mallas antigranizo u otro tipo de material más económico), protección de aves, insectos, parásitos, con desmalezado y raleo. Y

especialmente será deseable el cultivo cuando exista una demanda insatisfecha en el mercado, o se ponga en peligro de extinción la especie autóctona.

En definitiva, el cultivo en zonas delimitadas, permite un mejor y más rápido procesamiento de la planta recolectada, así como su secado y empaque. Establecer un cultivo de plantas medicinales puede involucrar la domesticación de las especies nativas de la región que tienen uso en la medicina popular, con una acción farmacológica comprobada por estudios científicos. También implica la introducción y aclimatación de plantas exóticas, con acción farmacológica comprobada, que pueden ser originarias de otras regiones del país u otros climas. En ambos casos, la experimentación agronómica, por biotecnología o directamente a campo, deberá acompañarse de un estudio fitoquímico, y de un estudio de mercado.

La calidad y productividad de un cultivo de plantas medicinales, son determinadas por factores genéticos, ontogénicos y ambientales. La genética cumple un papel fundamental, ya que individuos genéticamente inferiores no serían buenas fábricas de principios activos, aunque se mejore las condiciones de cultivo. El factor ontogénico es importante, ya que la edad y el desarrollo del ejemplar, incide directamente en la calidad y cantidad de moléculas activas. Por ejemplo, en hojas de *Digitalis lanata* el contenido de glicósidos cardiotónicos alcanza su máximo nivel cuando empieza a florecer, no antes ni después. Otro ejemplo puede ser las raíces de *Catharanthus roseus*, cuyo contenido en serpentina, aumenta rápidamente a los 5 meses de vida y baja abruptamente a los 9 meses, permaneciendo así hasta que muere. El factor ambiental puede modificar la producción de metabolitos secundarios pues influye directamente en la expresión de genes responsables de la misma, ya que pueden ser activados o desactivados según sean las condiciones climáticas, nutricionales, ataque de plagas, etc. (Sharapin, 2000).

La producción de plantas nativas selectas obtenidas mediante las técnicas de micropropagación, permite disponer de germoplasma nativo para rehabilitar ecosistemas degradados, conservar recursos genéticos y contar con materia prima de potencial uso industrial. Se puede aplicar diferentes técnicas de reproducción asexual para la producción masiva de especies medicinales y aromáticas, lo cual se propuso a través del CEPROVE con *Melissa* sp, *Hydrocotyle bonaerenses* (centella), *Lippia* sp., *Mentha* sp., *Aloysia* sp., *Pelargonium graveolens* (malvarosa). (Abedini y col .1999).

### **1.3 Cultivo de plantas del género *Aloysia***

En el caso de los géneros *Melisa* (diversas variedades) y *Aloysia* (cedrón, burrito y palo amarillo) es de interés su cultivo, ya que contienen esencia con contenido en terpenoides de demostrada actividad antiespasmódica (Millet 1981, De Souza y col. 2008). En el género *Aloysia* es de interés la obtención de ejemplares con mayor porcentaje de (-)-carvona, un monoterpeno presente en la esencia con demostrada actividad antiespasmódica (Werdin Gonzalez y col 2010). Por otra parte, es deseable obtener especímenes libres de tuyona, ya que este compuesto exhibe neurotoxicidad importante (De Souza y col. 2008). La cercanía taxonómica con el género *Lippia* también le da al género *Aloysia* la posibilidad de contener otros terpenos con actividad antiespasmódica (Pascual, 2001).

En Argentina se ha adquirido experiencia en el cultivo de cedrón, una Verbenácea, *Aloysia triphylla* o *A. citriodora*. Esta planta prospera en suelos de consistencia media, sueltos, permeables, profundos, con un pH entre 6.5 y 7.2, frescos pero no húmedos, pues el exceso de agua favorece la podredumbre de raíces. La exposición al norte resulta la más conveniente. El clima debería ser cálido a templado, si el frío es riguroso se suelen perder



kilos de hoja. Es importante tener una buena iluminación, ya que tiene influencia en la síntesis y acumulación de aceite esencial. La exposición a sombra provoca que la parte verde sea más grande pero pobre en principios activos. Una humedad relativa moderada favorece la cantidad de esencia, así como su secado y embalaje (Martinez Crovetto y col, 1981). Una región muy ventosa resulta desfavorable, ya que se incrementa el coeficiente de evaporación de aceites esenciales y baja la producción por unidad de superficie. Las plantas del género *Aloysia* se pueden propagar por división de matas, acodos o estacas. La multiplicación por semillas no se realiza debido al escaso poder germinativo. En cultivos comerciales el método preferido es por estacas. Se puede hacer enraizar en vivero o llevarlas a campo, plantándolas a unos 10 cm. entre sí en todo sentido, en tierra fértil, suelta y abonada. Ello puede realizarse en otoño, protegiendo a las estacas del frío con cobertura de paja u otros materiales, que se irán eliminando a medida que progrese el arraigue. El trasplante de estacas enraizadas puede hacerse al comienzo de la primavera. Previo trabajado del terreno, complementado con abono o material necesario para corregir las características físico-químicas. La plantación definitiva se realiza con espaciamiento. Deben tenerse en cuenta ciertos cuidados en el cultivo, como por ejemplo desmalezar frecuentemente y proteger contra vientos, fríos y heladas. Para el control de plaga, debe cuidarse de no dejar residuos tóxicos, debiendo efectuar la última aplicación de 25-30 días antes del corte o cosecha del material. Hay resultados comprobados con compuestos químicos para el control de malezas anuales sin afectar el cultivo. En cambio hay otras experiencias con compuestos químicos que si afectan al cultivo de “burrito” en Córdoba (Zumelzú y col, 2000).

Hasta el momento, en nuestro país se determinó la presencia de especies de *Aloysia* ricas en (-)-carvona en el Chaco (Aguado 2006), pero mayor frecuencia de aparición de especies pobres en (-)-carvona en el resto del país, por lo que es deseable mejorar los cultivos de *Aloysia*. Se trabajó a partir de ejemplares obtenidos por micropropagación del cultivo *in*

*in vitro* de un individuo de *Aloysia polystachya* sin tuyona, con resultados promisorios (Aguado, 2007). Se utilizó una técnica de regeneración *in vitro*, mediante el cultivo de hojas y segmentos nodales, conteniendo de 1 a 3 yemas axilares (Burdyn, 2006). En dicha técnica, los plantines se mantuvieron durante 6 a 8 semanas, bajo régimen luz/oscuridad, temperatura del aire 25-27/ 20-22 °C (según la etapa del ciclo diurno) y temperatura del sustrato de 22-25 °C, con un fotoperíodo de 14 hs. El aceite esencial obtenido de dichas plantas micropropagadas a partir de hojas demostró contener carvona, como componente principal. La tuyona no fue detectada en extractos hexánicos ni etanólicos, por lo que el estudio provee una técnica eficiente para obtener clones selectos de *Aloysia polystachya*. Es posible contar con ejemplares selectos y superiores en determinadas características, como resistencia a bajas temperaturas, aspecto fitosanitario, alto contenido en determinados principios activos, etc. Este método permite facilitar la simplificación de la tarea del productor, pudiendo administrarle plantas enraizadas y listas para establecer huertas selectas.

#### 1.4. Propiedades terapéuticas y fitoquímicas de las plantas del género *Aloysia*

Las especies que se estudiaron en esta tesis son arbustivas, ornamentales y aromáticas, usadas en medicina popular, como digestivas, eupépticas, formando parte de mezclas para el mate, y cuyo aceite obtenido por destilación de hojas, tallos y flores posee un moderado valor en el mercado de aceites esenciales, con finalidad medicinal, cosmética y perfumería. Sin embargo, hasta nuestros estudios no existían reportes bibliográficos que confirmaran su utilidad en el tratamiento de los trastornos gastrointestinales.

El origen del nombre científico *Aloysia* fue aplicado a este género en honor a María Luisa de Parma (1754-1819) reina de España por su matrimonio con Carlos IV. A este mismo género pertenece el “cedrón” o *Aloysia citriodora* Palau, una planta medicinal frecuentemente utilizada en nuestro país como antiespasmódico y digestivo, y como infusión aromática (Soraru y Bandoni 1978; Alonso y Desmarchelier, 2005). Taxonómicamente se discute si su género está emparentado con el género *Lippia* (Pascual y col. 2001). A este género pertenece la *Lippia alba* (Mill.) Brown, ampliamente utilizada en Europa por sus propiedades antiespasmódicas y vasodilatadoras. La actividad antiespasmódica de *Aloysia citriodora* Palau ha sido comprobada recientemente, así como se han estudiado su mecanismo de acción (Ragone y col. 2007) y sus efectos centrales y cardiovasculares (Ragone y col. 2010).

Recientemente, se ha reportado la actividad antiespasmódica y colerética del “incayuyo” (Gorzalczany y col. 2008), que pertenece al género *Lippia* (como *L. integrifolia* (Griseb.) que está taxonómicamente emparentado (Pascual y col. 2001) con el género *Aloysia*. Otra *Lippia*, *L. turbinata* Gris., Pl. Lorentz., conocida como poleo, también exhibe efectos antiespasmódicos.

Las características particulares reportadas para las dos especies de estudio en esta tesis son las siguientes:

**a) Nombre vulgar: palo amarillo**

Nombre científico: *Aloysia gratissima* Gillies & Hook Tronc *Aloysia lycioides* Cham.=  
*Lippia lycioides* (Champ.) Steud.= *Verbena gratissima* Gill. Et Hook

De todas las variedades existentes, las más populares son: *Aloysia gratissima* var. *angustifolia*, conocida como “cedrón del campo” y ubicada principalmente en el centro-noreste argentino; la *Aloysia gratissima* var. *chacoensis*, conocida como “poleo chaqueño” y oriunda del Paraguay y centro-norte argentino; y la *Aloysia gratissima* var. *gratissima*, conocida como “poleo del campo”, es la que se encuentra en mayor proporción (Ricciardi y col., 2002; Pensiero y col., 2009).

Es un arbusto de follaje aromático, de 1 a 3 metros de altura y follaje persistente, con flores blancas o teñidas de violeta que caen en racimo, de fuerte aroma a vainilla, con gargantas amarillas, atractivas para mariposas y abejas. En verano se destaca por la suave fragancia de sus flores. En nuestro país florece desde setiembre hasta febrero (Alonso y Desmarchelier 2005). El palo amarillo vive en zonas serranas y en las cumbres de las quebradas. Su área de dispersión abarca América del Sur, desde México hasta Argentina. En nuestro país habita desde La Pampa hacia arriba en todas las provincias, de acuerdo a las citas documentadas en el SIB (Sistema de Información de Biodiversidad), que depende de la Administración de Parques Nacionales. Las partes de la planta usadas en terapéutica son las hojas, tallos tiernos y flores, bajo la forma de infusión.

Para obtener hojas secas, conviene cosechar cuando la planta está en pre-floración, por ejemplo de mediados a fin de la primavera en la provincia de Córdoba. Se cortan las ramas con hojas y se las acondiciona para el secado o destilado. Para obtener la esencia, se recolecta cuando la planta está en franca floración, cuando el 50 % de las flores están abiertas, lo que ocurre a fin de primavera o principios del verano (Fester, 1961).

En la composición química de *A. gratissima* se describe la presencia de alfa-pineno, 1,8-cineol, limoneno, sabineno, pineno, bisaboleno y copaenol en las hojas; y en flores, mentona, terpenos monocíclicos como sabineno, cetonas monoterpénicas como pulegona, limoneno, y alcoholes sesquiterpénicos (espatulenol y viridiflorol) en las flores, que diferencian a esta especie de otras de la misma familia. Es destacable el alto contenido de cariofileno, que va variando en cantidad respecto del estado vegetativo de la planta. Con el aumento del mismo desde el otoño hacia el verano, se observa también un aumento en la cantidad de tuyonas desde el otoño a la primavera, así como la reducción del pineno en el mismo período. Este aumento se observa frecuentemente en plantas donde a medida que avanza el desarrollo foliar aumenta el contenido de componentes oxigenados a expensas de los terpenos. Así por ejemplo, el cariofileno y del germacreno D disminuyen hacia la primavera (floración), lo que podría significar que los mismos serían precursores de otros constituyentes. No se descarta la posible acción tóxica debido a la presencia de germacreno, cuya estructura, por oxidación da origen a una serie de compuestos de tipo lactona que producen reacciones alérgicas o citotóxicas (Ricciardi, 2002). En el aceite esencial obtenido de flores hay sabineno, globulol, cariofileno y epóxido de cariofileno (Soler y col., 1986). También se destaca la presencia de tuyona, reconocida como tóxico nervioso, la cual se incrementa en la floración. Así, las variaciones estacionales de los constituyentes mayoritarios, modifican las aplicaciones farmacológicas de la especie. (Ricciardi y col, 2002; Pensiero y col., 2009, Ricciardi y col 2000).

Hasta la fecha se han atribuido a *Aloysia gratissima* las siguientes propiedades farmacológicas en base a su uso popular, no siempre comprobadas: antiespasmódico estomacal (cedrón del monte, poleo del campo y poleo chaqueño) (Ricciardi y col., 2002), efectivo en dolores, diarreas y depresión (Schuamback y col, 2007), digestiva, emenagoga, diaforética, antitusiva y sedante (Ricciardi y col. 2010), antioxidante comparable a rutina

(Nunes da Silva, 2008), antimicrobiana (aceite esencial), fungicida (Benzi y col. 2009; Hister y col, 2009), antiviral (García y col, 2003). Tiene también importancia como especie melífera (Sersic y col., 2006) y para el control de la varroa, en colmenares que provoca la *Varroa destructor* (Santos, y col , 2009).

#### **b) Nombre vulgar: burrito**

Nombre científico: *Aloysia polystachya* Griseb & Moldenke

Esta planta también es conocida como “té del burro”, “poleo riojano”, “poleo de Castilla”, “hierba de burro”, “té burro”.

Se trata de un arbusto, de 1 a 3 m de altura; flores pequeñas, blanquecinas, muy aromáticas. Geográficamente está distribuida en Argentina, Bolivia y Paraguay. En nuestro país, crece naturalmente en las provincias del noroeste hasta 1000 metros de altura, en Catamarca, Córdoba, San Juan, La Rioja, San Luis, Salta, Jujuy y norte de Santa Fé (Alonso y Desmarchelier 2005).

Esta planta se encuentra muy arraigada en el uso popular, puede hallarse tanto en forma silvestre como domesticada en casas y jardines. Se adapta fácilmente a los cambios de suelo. La especie cultivada permite realizar dos cosechas anuales, seleccionándose el 50 % de floración, como momento apropiado (Ringuelet, 2004).

En su composición química se ha reportado que es una planta rica en cinc, cobre y calcio, vitaminas B1 y B2, y (-)-carvona. Algunas variedades contienen tuyona, lo cual la limita en su uso por ser un componente neurotóxico. En general las plantas originarias del noroeste argentino contienen tuyonas, y las del noreste son más ricas en carvona, principio activo responsable al menos en parte de la acción farmacológica (Aguado y col, 2006). La

presencia de carvona en el aceite esencial parece conferirle propiedades eupépticas y carminativas, siendo el constituyente principal del aceite esencial de alcaravea (*Carum carvi* L.), una especie reconocida como carminativa (Nuñez y col. 2003).

Entre las propiedades farmacológicas atribuidas a *Aloysia polystachya* se destaca su uso como eupéptico o digestivo (Alonso y Desmarchelier 2005), aunque no hay estudios farmacológicos que lo confirmen hasta el desarrollo de esta tesis. En cambio, se ha comprobado experimentalmente en estudios preclínicos el efecto ansiolítico del extracto hidroalcohólico (Mora y col., 2005; Hellion-Ibarrola y col 2006) y un importante efecto antidepressivo en el test de natación forzada con dosis únicas de 1, 10 y 100 mg/kg (Hellion-Ibarrola y col, 2008; Almeida y col 2009). El efecto ansiolítico de aumento de locomoción fue similar al exhibido por diazepam 1 mg/kg, y se observaron componentes fenólicos y terpenos en la fracción acetato de etilo, por TLC (Hellion-Ibarrola y col, 2008). Almeida y col (2009) evaluaron la composición química y el efecto del aceite esencial sobre un modelo de ansiedad en ratones, el laberinto en cruz elevada. Por cromatografía gas-líquido se cuantificaron los terpenos presentes en el aceite esencial, y se evaluó la esencia intraperitonealmente a dosis de 5, 10 y 100 mg/kg, y de tuyoona 4.1 mg/kg. Se encontró que la dosis i.p. de 100 mg/kg de aceite esencial de burrito produjo convulsiones seguido de muerte en el 100 % de los casos, evidenciando una acción excitatoria sobre el SNC, la dosis de 10 mg/kg no produjo muerte pero sí episodios de convulsiones tónico-clónicas que provocaron una marcada disminución en la actividad locomotora. La dosis de 5 mg/kg, no produjo convulsiones ni cambios en la actividad locomotora pero disminuyó en un 60 % la permanencia en brazos abiertos indicando un marcado efecto ansiogénico, similar al encontrado con dosis de 4.1 mg/kg de tuyoona, lo cual indicaría que el efecto ansiogénico sería debido al componente mayoritario (Almeira y col. 2009).

Además, el aceite esencial de *Aloysia polystachya* posee propiedades de aplicación agronómica, tales como acción repelente del aceite esencial contra *Aedes aegypti* (Gleiser, 2010), insecticida y repelente sobre el gorgojo *Rhizopertha dominica* en granos como trigo y arroz almacenados (Benzi y col, 2009), actividad ovicida, tóxico de contacto y repelente del aceite esencial sobre la chinche verde *Nezara viridula*, que es una importante plaga de cultivos comerciales como la soja (Werdin González y col, 2010). Con resultados excelentes, el aceite logra la mortalidad de todas las larvas después de 2 a 48 horas de exposición, dependiendo de la concentración utilizada, explicándose la penetración de los componentes biocidas vía tegumento y sistema respiratorio. Esto prueba una actividad biológica potencial, de efecto insecticida y repelente del aceite esencial. Se ha descrito entre sus componentes la presencia de (-) carvona en un 83% en *A. polystachya* (Werdin González y col. 2010). A este monoterpeno también se le ha adjudicado el efecto antiespasmódico de *Mentha genous* (de Sousa y col. 2008; Goncalves y col. 2008).

**c) Actividades encontradas en otras especies de *Aloysia*:**

El “cedrón” (*Aloysia citriodora* Palau) demostró tener un efecto espasmolítico en duodeno de rata aislado extracto inhibió no competitivamente la curva dosis-respuesta de Ach y la de  $Ca^{2+}$  en alto potasio (Ragone y col, 2007). Además potenció la inhibición no competitiva de papaverina, siendo la relajación inhibida no competitivamente por azul de metileno y antagonizada competitivamente por TEA, lo que sugiere que el mecanismo antagonista no-competitivo depende de la activación de la guanilatociclasa y de canales de  $K^+$ . Por HPLC, se identificaron dos flavonoides en el extracto acuoso, vitexina e isovitexina, de los cuales la vitexina es parcialmente responsable del efecto pues inhibe no competitivamente a la Ach. La isovitexina no posee actividad inhibitoria o relajante en duodenos. También *Aloysia*



*citriodora* exhibió leve efecto hipotensor, inotropismo negativo y un importante efecto sedante de tipo benzodiazepina (Ragone y col. 2010).

De un total de 29 plantas medicinales usadas tradicionalmente en Brasil, se destacó la acción antimicrobiana del aceite esencial de cedrón, con una actividad inhibitoria moderada a fuerte y promisorio sobre *Escherichia coli* (Duarte y col. 2007) y actividad anti *Candida albicans* (Duarte y col. 2005). La infusión de cedrón demostró actividad protectora sobre el daño inducido por cisplatino (acción antígenotóxica, antioxidante, barredora de radicales libres) (Zamorano-Ponce y col. 2004).

Otra especie, *Aloysia virgata*. Permitió aislar dos diterpenos identificados espectralmente, que inhibieron competitivamente el receptor benzodiazepínico al administrarlos intraperitonealmente en ratones. El comportamiento fue observado en el test de laberinto en cruz elevada, en actividad locomotora y número de transiciones luz/oscuridad, así como la cantidad de entradas en las ramas abiertas (Wasowski y Marder, 2010).

### ***1.5 Bases para el estudio de las propiedades antiespasmódicas:***

El duodeno y el íleon de rata constituyen un modelo adecuado para estudiar los efectos gastrointestinales espasmógenos y antiespasmódicos de drogas y extractos. El intestino tiene receptores muscarínicos (M1 y M3) y permite estudiar los efectos y mecanismos antiespasmódicos directos en el músculo o la estimulación colinérgica (Karamenderes y Apaydin 2003; Emendorfer y col., 2005). Otros neurotransmisores liberados en el plexo de Auerbach y Meissner que tienen receptores en el intestino delgado de rata son: dopamina actuando en D1 y D2 para generar un efecto relajante, serotonina actuando en los poco abundantes receptores 5-HT<sub>2</sub> dando un leve efecto constrictor, encefalinas y endorfinas actuando en receptores  $\mu$  presinápticos para inhibir in vivo la liberación de otros neurotransmisores.

## 1.6 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Es frecuente encontrar la presencia común de componentes entre plantas de la misma familia o el mismo género, dado que ellas poseen similares mecanismos de defensa activados por los mismos metabolitos secundarios. Por lo tanto, se hipotetizó que otras plantas del género *Aloysia* como *A. polystachya* (Griseb.) conocida como “burrito”, y *A. gratissima* (Gill. et Hook) de nombre vulgar “palo amarillo” tendrían la misma actividad que *A. citriodora* Palau (“cedrón”) y asociada a un mecanismo de acción y principios activos similares.

## 1.7 OBJETIVOS DE ESTA TESIS

- a) Evaluar la actividad antiespasmódica de dos plantas de la familia Verbenaceae, *Aloysia polystachya* (Griseb.) conocida popularmente como “burrito”, y *A. gratissima* (Gill. et Hook) de nombre vulgar “palo amarillo”.
- b) Estudiar el mecanismo de acción farmacológico de dichas plantas, tanto bajo la forma de extracto crudo acuoso como de tintura madre (ambas formas de uso etnofarmacológico) y comparar sus potencias.
- c) Correlacionar dicha actividad con un perfil fitoquímico comparativo con el de *Aloysia citriodora* Palau (“cedrón”) y comparar las actividades farmacológicas de los extractos con las de algunos de los principios activos.

# **MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. Material vegetal utilizado:**

Las respectivas drogas herbáceas compuestas por hojas y tallos desecados de *Aloysia polystachya* Griseb. (nombre vulgar: “burrito”), y de *A. gratisima*, Gill. et Hook (nombre vulgar “palo amarillo”) fueron provenientes de envases de herboristería, y autenticados por la Dra. Etile Spegazzini en el Museo Carlos Spegazzini (LPE) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

### **2.2. Preparación de los extractos:**

Se obtuvieron los respectivos extractos acuosos como decocción al 20% de hojas secas de la droga herbácea. Se filtraron y se liofilizaron los respectivos extractos acuosos, obteniendo un rendimiento de 9 a 10% p/p. Los extractos se diluyeron en agua a diversas concentraciones (desde 300 a 10 mg droga cruda por ml) para administrar en la solución Tyrode de las cubas en dilución 1/100. Las concentraciones de los EA se aumentaron mientras las soluciones madres del liofilizado hubieran resultado una solución, evitando obtener suspensiones. Por ello, la máxima concentración de EA ensayada en las CDR fue de 3 mg liofilizado/ml (solución madre: 300 mg/ml) para *A. polystachya* y 1 mg liofilizado/ml (solución madre: 100 mg/ml) para *A. gratissima* (Figs. 1 y 2).

### **2.3. Preparación de las tinturas:**

Se maceraron 200 g de hojas secas de las respectivas drogas herbáceas en 1 litro de alcohol de 70° durante varios días. Se filtraron y conservaron las respectivas tinturas madres (TM) (que equivalen a 200 mg droga cruda por ml). La respectiva TM se concentró por evaporación (a 600 mg droga por ml) o se diluyó a diversas concentraciones (60, 20 y 6 mg droga por ml) en agua para administrar en la solución Tyrode de las cubas en dilución 1/100. Concentraciones mayores en curvas de relajación se obtuvieron por repetidos agregados

acumulativos de estas soluciones madres. Se efectuó un control o blanco de actividad con etanol de 70°.

#### ***2.4. Animales:***

El manejo de animales de experimentación se realizó bajo los principios y normas internacionales (publicación del NIH #85-23 revisado en 1985). Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 200-250 g. mantenidas en el bioterio de la cátedra de Farmacología bajo condiciones controladas de 12 hs luz-12 hs noche, con 12 horas de ayuno y agua ad libitum. Los animales anestesiados con éter etílico bajo campana se sacrificaron y se aislaron rápidamente los duodenos e íleons, los cuales se colocaron en solución Tyrode con burbujeo de aire.

#### ***2.5. Preparado biológico:***

Los duodenos y los íleons se montaron en 4 cubas de doble camisa termostalizadas a 37°C y conteniendo 20 ml de solución Tyrode y burbujeo constante de aire. Fueron sujetos longitudinalmente manteniendo el tubo intestinal abierto para facilitar la circulación de solución y la oxigenación en el interior mucoso. Se sujetaron por un extremo a un soporte fijo y por el otro mediante hilo de cirujía a un transductor de fuerza isométrico (WPI Instruments, USA) acoplado a un amplificador de 4 canales (TBM4M, Instruments, USA) para la adquisición en computadora mediante tarjeta A/D Eagle (USA).

#### ***2.6. Estudio de la actividad antiespasmódica:***

Se utilizaron condiciones experimentales previamente empleadas (Ragone y col. 2007) con metodologías “in vitro” de duodeno o íleon de rata aislado y sumergido en solución Tyrode a 37°C, burbujeado con aire. Se registró el grado de tensión longitudinal del tubo

intestinal (Shamsa y col. 1999; Nocerino y col., 2002). Las respuestas a agonistas y los efectos de extractos y TM no difirieron significativamente entre ambas porciones de intestino.

La actividad antiespasmódica se evaluó en estudios *ex vivo* mediante curvas dosis-respuesta (CDR) del agonista acetilcolina (ACh), en ausencia y presencia de diversas concentraciones de los extractos o TM de la respectiva planta medicinal.

Para evaluar los mecanismos de acción, se efectuaron diversos protocolos en base a CDR de acetilcolina, o de calcio en medio despolarizante de alta  $[K^+]$  (40 mM). Se utilizaron fármacos selectivos, para interferir con los mecanismos a dilucidar: tetraetilamonio (Sigma) a concentraciones de 40 mM (produce bloqueo no selectivo de canales de  $K^+$  y despolarización con elevada contractura tónica mantenida), 10 mM (produce bloqueo no selectivo de canales de  $K^+$  y despolarización con contracción fásica que vuelve al tono basal, facilitando la realización de una CDR posterior), y 1 mM (produce bloqueo selectivo de canales de  $K^+$ -dependientes de  $Ca^{2+}$  pero no de los  $K_v$ ) ((Zhao y col. 2009). Se usó metoclopramida (Novartis) como bloqueante de los receptores D2 de dopamina. Se estudió el efecto de (-)-carvona (Sigma) en las CDR de ACh y  $Ca^{2+}$

### ***2.7. Soluciones empleadas y curvas dosis-respuesta:***

Tyrode (en mM): 150 NaCl, 2.7 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 12 NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na, 1.8 CaCl<sub>2</sub>. El burbujeo se efectuó con aire, y se desarrolla un pH de 8.2 que es considerado el óptimo para el intestino aislado (Livingston 1970).

Tyrode-0Ca: igual composición que el Tyrode sin agregado de CaCl<sub>2</sub>.

Tyrode-0Ca-40 mM  $K^+$ : se agregó 0.6 ml de solución de KCl 10% en cada cuba de 20 ml de Tyrode-0Ca. Esta intervención elevó la osmolaridad del medio desde 341.6 a 411.2. Sin embargo, la respuesta fásica y tónica obtenida por despolarización del tejido no fue diferente a la encontrada por reemplazo de la solución Tyrode por una solución Tyrode-40 mM K

isoosmótica (resultados previos no publicados). Se prefirió la intervención hiperosmótica de  $K^+$  40 mM para utilizar menores cantidades de liofilizado evitando el re-agregado en el cambio de medio en cada CDR.

CDR de Ach: se agregaron sucesivamente y de modo acumulativo 0.2 ml de Ach de las siguientes soluciones: 1, 2, 7, 20, 70, 200, 700 y 1000  $\mu\text{g/ml}$  en 20 ml de Tyrode (dilución 1/100).

CDR de Ca: se agregaron sucesivamente y de modo acumulativo 0.2 ml de soluciones de  $\text{CaCl}_2$  a concentraciones de: 0.88, 1.85, 5.3, 18.5, 53, 185 y 530  $\text{mg/ml}$ , en 20 ml de Tyrode-0Ca (dilución 1/100).

### ***2.8. Protocolos farmacológicos y cálculo de parámetros:***

a) CDR de Ach: en cada preparado se efectuaron 2 CDR control (sin pretratamiento), seguido de las sucesivas CDR de Ach con el previo agregado (5 a 10 min antes) de una concentración única del EA, TM o droga en estudio (en orden creciente de concentración de la droga). En los experimentos de CDR de TM, se realizó un tercer control con el previo agregado de 0.2 ml de etanol 70% previo a realizar las CDR con TM, el cual después de una transitoria relajación del tejido, no resultó diferente a la segunda CDR control. Todas las CDR se analizaron referidas al 100% del efecto máximo ( $E_{\text{max}}$ ) obtenido en la segunda CDR control (más estable). Al finalizar cada CDR se efectuaron 3 lavados consecutivos (reemplazos del Tyrode) y se esperó 5-10 minutos de estabilización.

b) CDR de  $\text{Ca}^{2+}$  en medio de Tyrode-0- $\text{Ca}^{2+}$ -40 mM  $K^+$  : en los preparados estabilizados en medio de Tyrode con  $\text{Ca}^{2+}$  se reemplazó el medio por Tyrode-0- $\text{Ca}^{2+}$  y se efectuaron 2 CDR control (sin pretratamiento) agregando 0.6 ml KCl 10% para llevar a 40 mM  $K^+$ . A continuación, en cada preparado se efectuaron las sucesivas CDR de  $\text{Ca}^{2+}$  con el previo agregado (5 a 10 min antes de agregar el  $K^+$ ) de una concentración única del EA, TM o droga

en estudio (cuando hubo varias CDR se hicieron sucesivamente en orden creciente de concentración). En los experimentos de CDR de TM, se realizó un tercer control con el previo agregado de 0.2 ml de etanol 70% previo a realizar las CDR con TM, el cual después de una transitoria relajación del tejido, no resultó diferente a la segunda CDR control (ver Fig 3). Todas las CDR se analizaron referidas al 100% del efecto máximo ( $E_{max}$ ) obtenido en la segunda CDR control (más estable), excepto la de TM 2 mg/ml que se comparó con el  $E_{max}$  de la CDR de su vehículo (etanol 70%); mientras las otras soluciones madre se diluyeron con agua. Al finalizar cada CDR se efectuaron 3 lavados consecutivos (reemplazos del Tyrode-0  $Ca^{2+}$ ) y se esperó 5-10 minutos de estabilización.

c) Curvas de relajación: se efectuaron CDR del EA o TM sobre la contractura tónica obtenida por el respectivo agregado de 40 mM  $K^+$  o 10  $\mu$ g/ml Ach, ambos en medio con  $Ca^{2+}$ . Las CDR se obtuvieron por el agregado de concentraciones crecientes del EA o TM, según se indica en las respectivas figuras en la sección Resultados. Cuando se evaluaron los efectos de drogas para bloquear el efecto relajante de los EA o TM, las mismos fueron agregados 5-10 minutos antes de provocar la contractura y permanecieron en el medio durante la CDR relajante.

En las CDR de Ach y de  $Ca^{2+}$ , se calcularon los  $pD_2 = -\log CE_{50}$  (Molar) del agonista, y se efectuaron curvas de inhibición del respectivo EA y TM, a partir de las cuales se extrapoló la concentración inhibitoria 50% ( $CI_{50}$ ). Estas curvas de inhibición se obtuvieron graficando los %E obtenidos en las sucesivas CDR de un experimento, a una dada concentración del agonista (aquella que desencadena el  $E_{max}$ ) por el agregado de las sucesivas concentraciones del antagonista (EA o TM) en función de ésta. La  $CI_{50}$  se obtuvo por extrapolación de estas curvas de inhibición al 50% del E. Las curvas de inhibición calculadas se muestran en cada figura después de las respectivas CDR



En los compuestos puros que produjeron inhibición no competitiva de la CDR de agonista o de calcio se pudo estimar la afinidad por el sitio de unión mediante el cálculo del  $pD'2 = -\log [B'] + \log [(E_A - E_{AB'_{max}})/(E_A - E_{AB'}) - 1]$ , donde B' es la concentración del antagonista no-competitivo (molar), y  $E_A$ ,  $E_{AB'}$  and  $E_{AB'_{max}}$  son respectivamente los máximos efectos del agonista en ausencia (A) y presencia del antagonista (B') y de su máxima concentración (B'max) (Van der Brink, 1977; Kenakin, 1984).

## **2.9. Estudios fitoquímicos:**

### **2.9.1- Determinación del contenido total de flavonoides:**

Se determinó el contenido de flavonoides totales, expresados como hesperidina, en las partes aéreas de *A. polystachya* y *A. gratissima*, según una adaptación del método de Kostennikova modificado por G. Méndez (Gutiérrez Gaitén y col., 2000).

#### **2.9.1.1. Preparación de la Solución muestra:**

- a) El material vegetal (1 g de las partes aéreas desecadas de cada especie) se extrajo a reflujo durante 2 h con 20 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  al 10% y 20 ml de etanol (EtOH) 50°
- b) Se enfrió y se filtró, lavando el marco con 30 ml de EtOH 50°
- c) El filtrado se evaporó a baño de María hasta la mitad de su volumen y se enfrió 30 min sobre baño de hielo.
- d) El precipitado obtenido se filtró y lavó con agua destilada enfriada a 10°C (4 x 10 ml).
- e) El precipitado obtenido, así como el residuo que quedó en el recipiente usado en el paso (c), se redisolviéron en EtOH 96° previamente calentado a 50°C, transfiriendo la solución a un matraz aforado de 100 ml y completando a volumen con EtOH 96°.
- f) 5 ml de esta solución se diluyeron a 100 ml (dilución 1:20) y se leyó la Absorbancia a longitud de onda ( $\lambda$ ) de 285 nm ( $A_{285}$ ) en un espectrofotómetro UV-VIS ThermoSprectonic, modelo Helios  $\beta$

#### **2.9.1.2. Soluciones patrón y blanco:**

La solución patrón se preparó disolviendo 2 mg de hesperidina (Sigma) en 50 ml de EtOH 50° (concentración final: 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). La solución blanco fue EtOH 50°

**2.9.1.3. Determinación de los espectros UV:** a las soluciones hidroalcohólicas de hesperidina y soluciones extractivas de burrito y palo amarillo, se les efectuó un espectro UV en el rango de  $\lambda$  200-400 nm a fin de determinar la  $\lambda$  max de trabajo.

#### **2.9.1.4 Cálculo de los resultados**

Las concentraciones se obtuvieron aplicando la formula:

$$C_m = \frac{C_h \times A_m}{A_h}$$

Donde:

C<sub>m</sub>: concentración en la solución muestra, en µg/ml

C<sub>h</sub>: concentración de la solución de hesperidina en µg/ml

A<sub>m</sub>: absorbancia de la solución muestra a 285 nm

A<sub>h</sub>: absorbancia de la solución de hesperidina a 285 nm

A partir de este dato, y considerando las diluciones realizadas, se obtuvo el % de flavonoides totales, expresados como hesperidina (g flavonoides totales/100 g de vegetal)

### **2.9.2- Determinación de la presencia de vitexina e isovitexina por HPLC:**

El extracto acuoso crudo de ambas plantas fue analizado por HPLC para obtener el perfil cromatográfico y compararlo con los estándares de vitexina e isovitexina, como se había efectuado previamente con *Aloysia citriodora* Palau o cedrón (Ragone y col. 2007).

Se utilizó un cromatógrafo Gilson SAS, Villiers-Le-Bel, France, con un detector UV y un inyector de loop fijo para 20 µl (Rheodyne, Cotati, CA, USA). El análisis se realizó usando el siguiente sistema cromatográfico: una columna en fase reversa Lichrocart RP 18 de 250 mm x 4 mm de diámetro interno, con tamaño de partícula de 5 µm, a temperatura ambiente (25°C) y modo de elución isocrático. La fase móvil fue: isopropanol : tetrahidrofurano : agua (5 : 15 : 85) a pH 4.33; el flujo de elución fue 1.0 ml/min y la longitud de onda de detección UV fue 336 nm. Las muestras se prepararon a partir del extracto liofilizado con fase móvil a una concentración de 700 µg/mL, filtrada e inyectada por triplicado en el sistema de HPLC. Los siguientes compuestos se usaron como estándares: isovitexina y vitexina, en una concentración de 20 µg/ml en fase móvil. Con el objeto de validar el sistema cromatografico se inyectó también extrato de cedrón (*A. citriodora*) que posee vitexina e isovitexina y poner la cita (Ragone y col., 2007).

### **2.9.3- Perfil de flavonoides por cromatografía en capa delgada (CCD):**

La presencia de flavonoides fue evaluada por CCD, en placas de silicagel F 254 Merck 0,25 mm y diversas fases móviles, para preparar varios sistemas cromatográficos:

- 4) Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>/MeOH 95:5
- 5) Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>/MeOH 99:1
- 6) AcEtilo/MeOH/H<sub>2</sub>O 100:17:10
- 7) AcEtilo/Acido formico/Acido acetico/H<sub>2</sub>O 100:11:11:26 (fase superior)

Se utilizó solución metanólica 1% de quercetina (Q, Sigma) como testigo. La detección de manchas del flavonoide en las CCD se llevó a cabo bajo luz UV (254 y 366 nm) con y sin ayuda de vapores de amoníaco, y con pulverización con reactivo de productos naturales (solución metanólica al 1% de ácido 2-amino etil difenil bórico) y observación al visible y al UV.

Se sembraron las soluciones extractivas metanólicas 10% de las partes aéreas secas y molidas de *A. pachystachya* “Burrito” (B) y *A. gratissima* “palo amarillo” (PA), y las soluciones extractivas acuosas (decocción) 20% de las partes aéreas secas y molidas de ambas plantas.

### **2.9.4- Determinación de la presencia de terpenos como (-) carvona por CCD:**

Se efectuaron varias CCD del extracto hexánico de *Aloysia* spp.. Para ello, se utilizó como fase estacionaria: silicagel F 254 Merck 0.25 mm, y como fase móvil los siguientes sistemas:

- 1) Tolueno/Acetato de etilo 7:3
- 2) Tolueno/Acetato de etilo 96:4
- 3) Tolueno/acetato de etilo 9:1

Las muestras fueron soluciones extractivas hexánicas al 10% de las partes aéreas secas y molidas de *A. pachystachya* “Burrito” (B) y *A. gratissima* “palo amarillo” (PA), y como testigo se empleó solución en diclorometano al 1% de (-)carvona (Sigma) (Ca). El revelado se

efectuó por observación UV a  $\lambda$  de 254 y 366, y se realizó pulverización con anisaldehído sulfúrico y calor a 110°C durante 5 minutos.

### **2.10- Métodos estadísticos:**

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  ESM (n: número de experimentos) y las varias CDR consecutivas de un mismo protocolo se compararon por ANOVA de dos vías, considerando las variaciones en  $-\log[\text{agonista}]$  y en el efecto (E%). En cada análisis se aplicaron los varios tests a posteriori de Bonferroni para cada comparación pareada de las CDR tratadas con la curva control del agonista. En todos los casos se consideró un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Los análisis estadísticos se efectuaron mediante el programa Prisma 4.0.

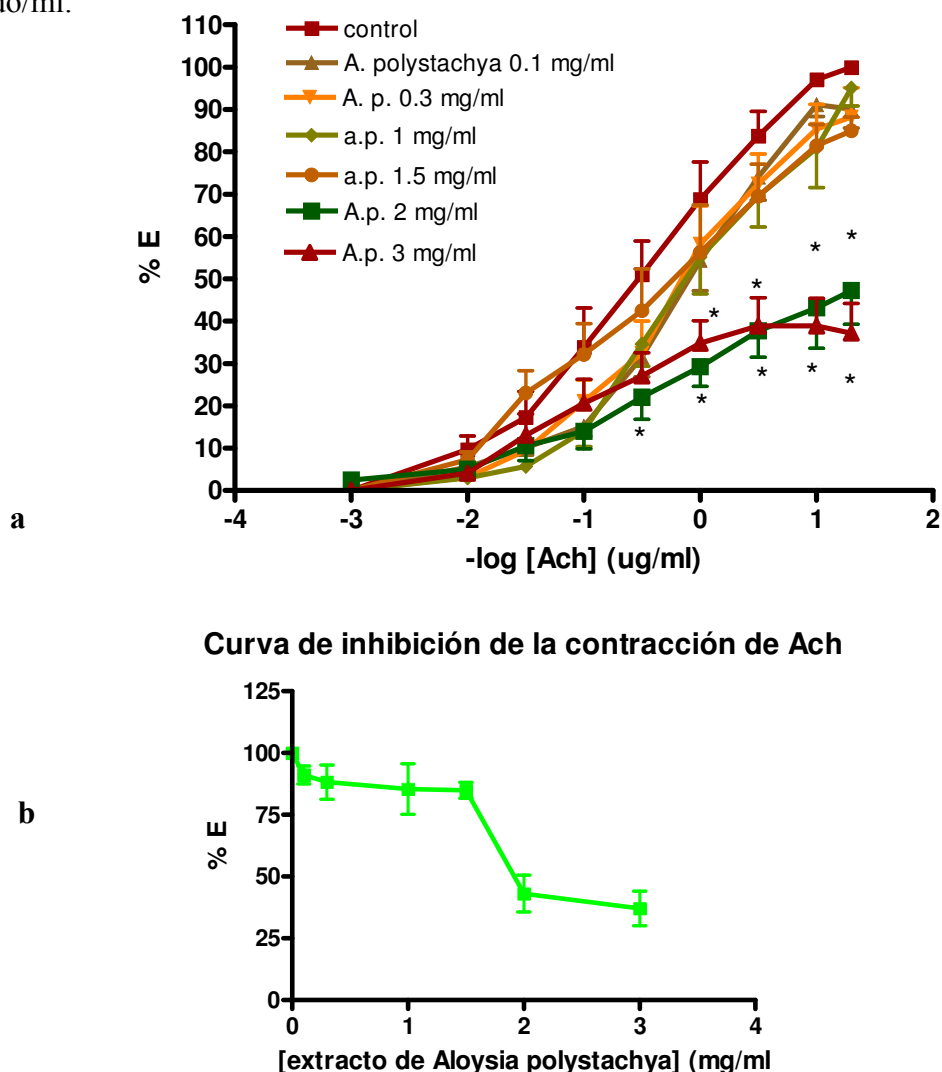
# **RESULTADOS**

### 3.0 Estudios farmacológicos:

#### 3.1. Efectos antiespasmódicos de los extractos acuosos:

##### 3.1.1. De *A. polystachya* (burrito):

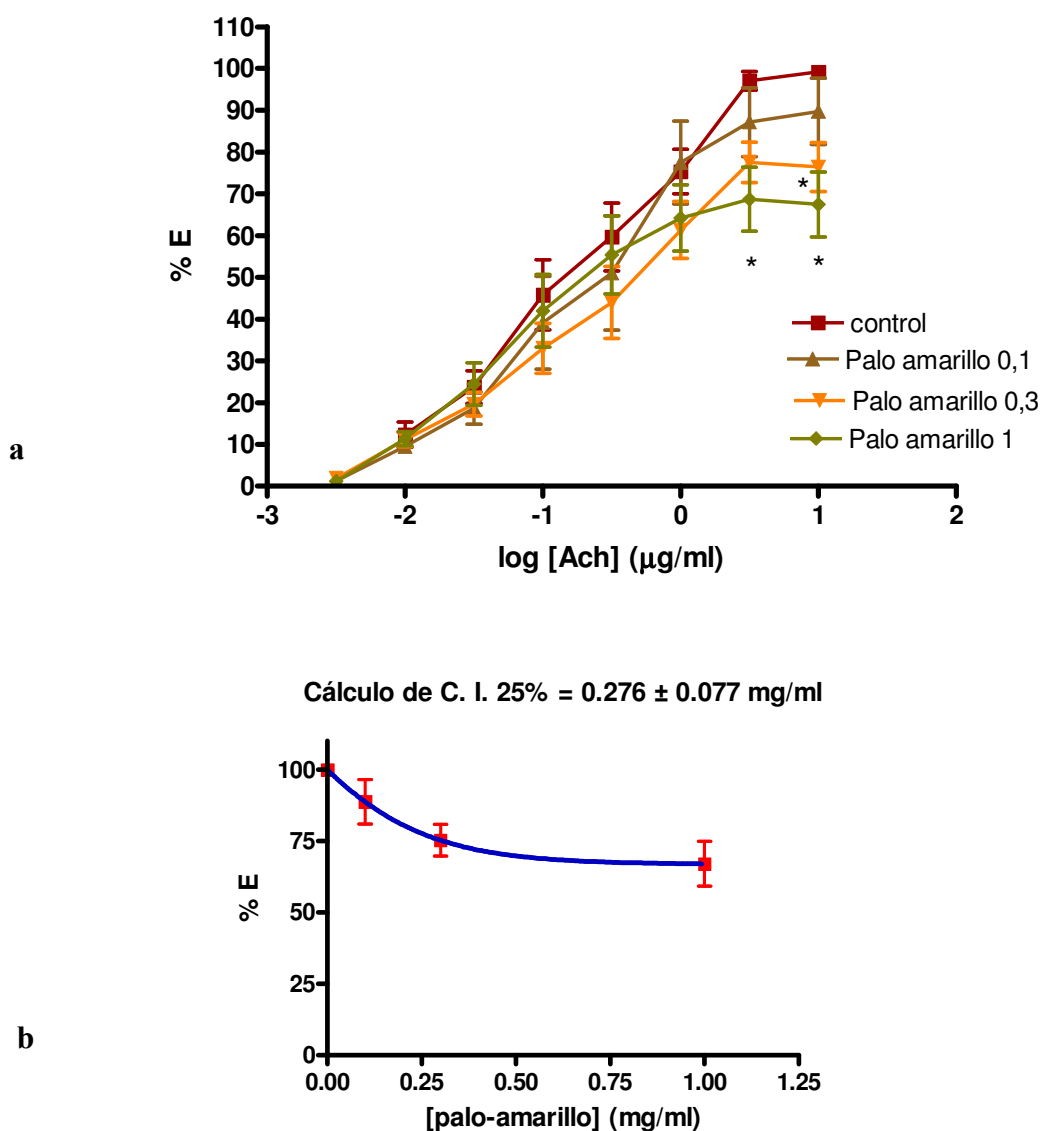
El EA-A *polystachya* inhibió en forma no-competitiva la CDR de Ach a las concentraciones de 2 y 3 mg droga por ml de cuba, siendo NS a las menores concentraciones de 0.1 a 1.5 mg/ml (Figura 1). La CDR de Ach desarrolló un  $pD_2 = -\log CE_{50} = 5.77 \pm 0.13$  (n=9). La concentración inhibitoria al 50% (CI50) de burrito resultó de  $1.8 \pm 0.27$  mg liofilizado/ml.



**Figura 1:** Curva dosis-respuesta de Ach en ausencia y presencia de varias concentraciones (en mg liofilizado/ml cuba) del extracto acuoso de *Aloysia polystachya* (burrito) (a) y cálculo de la CI50 (n=9) (b), de  $1.8 \pm 0.27$  mg liof/ml. ANOVA de 2 vías: por tratamiento:  $F = 28.77$ ,  $df 6$ ,  $p < 0.0001$ , por dosis:  $F = 161.3$ ,  $p < 0.0001$ , post-tests:  $*p < 0.05$  vs control

### 3.1.2. De *A. gratissima* (palo amarillo):

El EA-*A.gratissima* inhibió en forma no-competitiva la CDR de Ach a las concentraciones de 0.3 y 1 mg liofilizado/ml de cuba, hasta un  $67.5 \pm 17.8\%$  del Emax (n=12) (Figura 2). La concentración inhibitoria al 25% (CI25) de palo amarillo resultó de  $0.276 \pm 0.077$  mg liofilizado/ml.



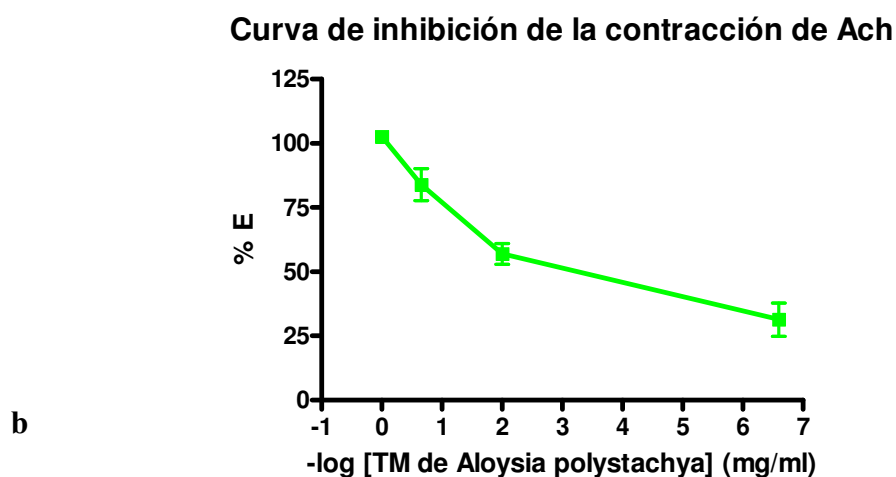
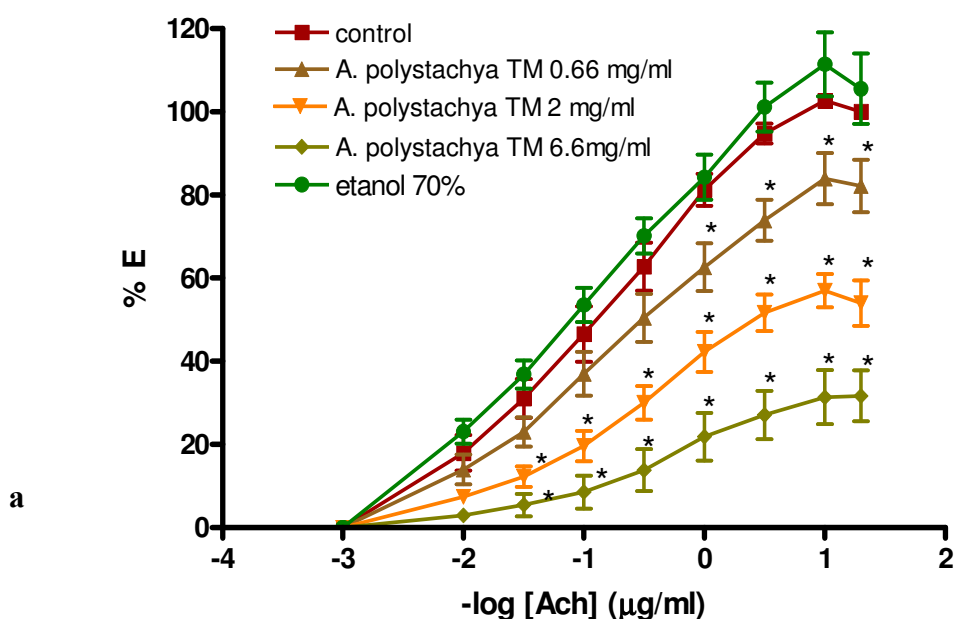
**Figura 2:** Curva dosis-respuesta de Ach en ausencia y presencia de varias concentraciones (en mg liofilizado/ml cuba) del extracto acuoso de *Aloysia gratissima* (palo amarillo) (a) y cálculo de la CI25 (\* $p < 0.05$  vs CDR-control, n= 12) (b). ANOVA de 2 vías: por tratamiento:  $F = 25.84$ ,  $df 3$ ,  $p < 0.001$ , por dosis:  $F = 863$ ,  $p < 0.001$ , post-tests: \* $p < 0.05$  vs control



### 3.2. Efectos antiespasmódicos de las tinturas madres:

#### 3.2.1. De *A. polystachya* (burrito):

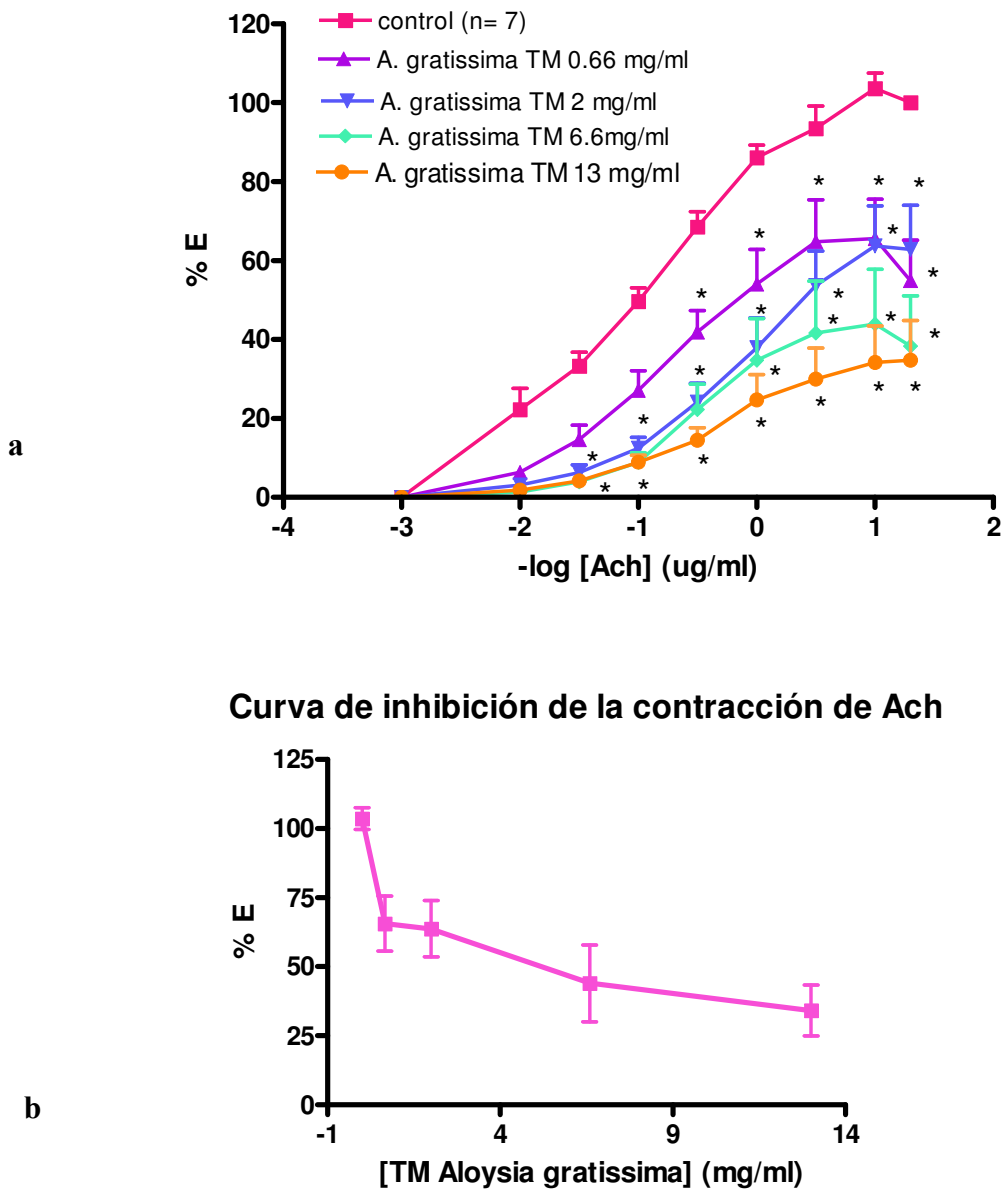
La tintura madre TM-*A polystachya* inhibió en forma no-competitiva la CDR de Ach en el rango de concentraciones de 0.66 a 6 mg droga por ml de cuba, en forma más drástica que el EA hasta un  $31.7 \pm 6.1\%$  (n=8) (Figura 3). La concentración inhibitoria al 50% (CI50) de burrito resultó de  $3.15 \pm 0.57$  mg droga/ml.



**Figura 3:** Curva dosis-respuesta de Ach en ausencia y presencia de varias concentraciones (en mg droga/ml cuba) de la tintura madre de *Aloysia polystachya* (burrito) (a) y cálculo de la CI50 (n=8) (b), de  $3.15 \pm 0.57$  mg droga/ml. ANOVA de 2 vías: por tratamiento:  $F= 181.3$ ,  $df 4$ ,  $p < 0.0001$ , por dosis:  $F: 192.9$ ,  $df 8$ ,  $p < 0.0001$ , post-tests:  $*p < 0.01$  vs control

### 3.2.2. De *A. gratissima* (palo amarillo):

La tintura madre TM-*A.gratissima* inhibió en forma no-competitiva la CDR de Ach en el rango de concentraciones de 0.66 a 13 mg droga por ml de cuba, hasta un  $67.5 \pm 17.8\%$  del  $E_{max}$  (n=12) (Figura 4). La concentración inhibitoria al 50% (CI50) de palo amarillo resultó de  $6.46 \pm 2.28$  mg droga/ml.



**Figura 4:** Curva dosis-respuesta de Ach en ausencia y presencia de varias concentraciones (en mg droga/ml cuba) de la tintura madre de *Aloysia gratissima* (palo amarillo)(a) y cálculo de la CI50 (n= 7) (b), ver parámetros en el texto. ANOVA de 2 vías: por tratamiento:  $F=61.32$ ,  $df 4$ ,  $p<0.0001$ , por dosis:  $F: 62.89$ ,  $p<0.0001$ , ,post-tests:  $*p<0.05$  vs CDR-control

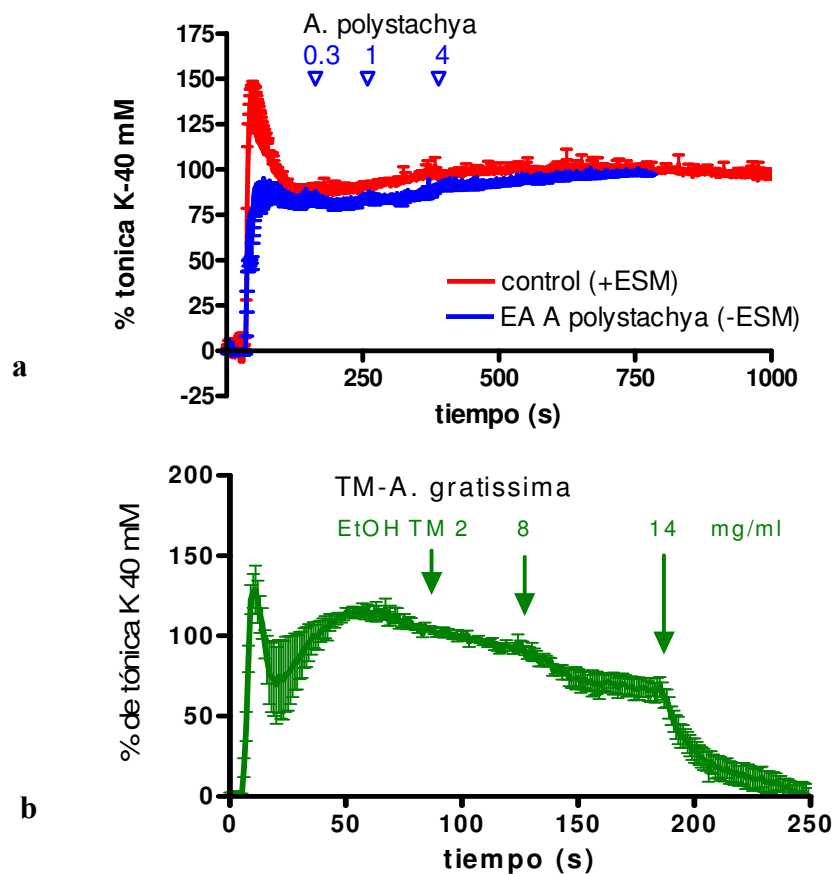
### 3.3. Efectos sobre la contractura tónica producida por despolarización:

#### 3.3.1- De *A. polystachya* (burrito):

El extracto acuoso *EA-A polystachya* no modificó la contractura tónica producida por la despolarización con Tyrode-40 mM  $K^+$  (Figura 5a). Se hipotetizó que el *EA-A polystachya* podría actuar mediante la activación de canales de  $K^+$ , efecto invisible en alta  $[K^+]$ .

#### 3.3.2. De *A. gratissima* (palo amarillo):

Dado que el *EA-A gratissima* había inhibido escasamente la CDR de Ach, se ensayó el efecto de la *TM-A.gratissima* sobre la contractura tónica producida por la despolarización con Tyrode-40 mM  $K^+$  encontrando que se produjo una relajación dependiente de la concentración (Figura 5 b). Se hipotetizó que la *TM-A.gratissima* podría inhibir canales de calcio.

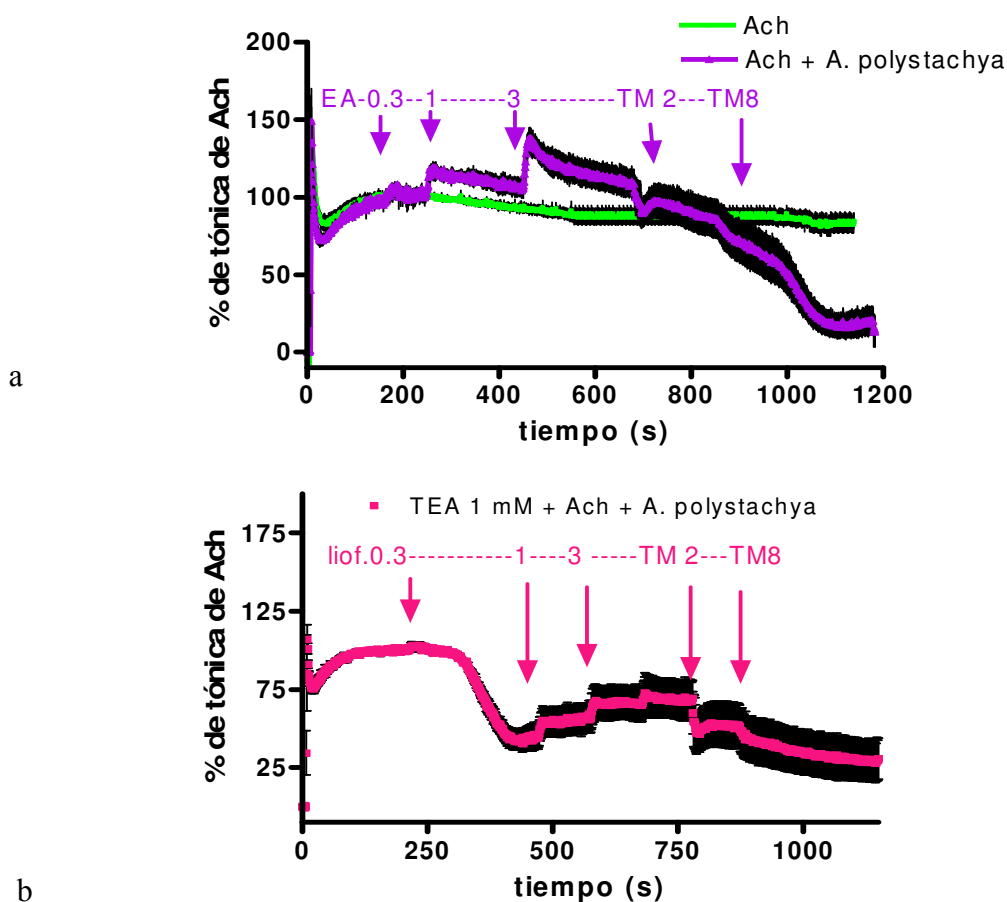


**Figura 5:** Efectos en la contractura de alta  $[K]$  como %E de la respuesta tónica máxima: a) del *EA-A polystachya* en 3 concentraciones (0.3, 1 y 4 mg liof/ml) sin efecto vs control sin EA ( $n=4$ ); b) del *TM-A gratissima* a 2, 8 y 14 mg/ml ( $n=4$ ), ambos resultados en media  $\pm$ ESM.

### 3.4. Efectos sobre la contractura tónica producida por acetilcolina:

#### 3.4.1- De *A. polystachya* (burrito):

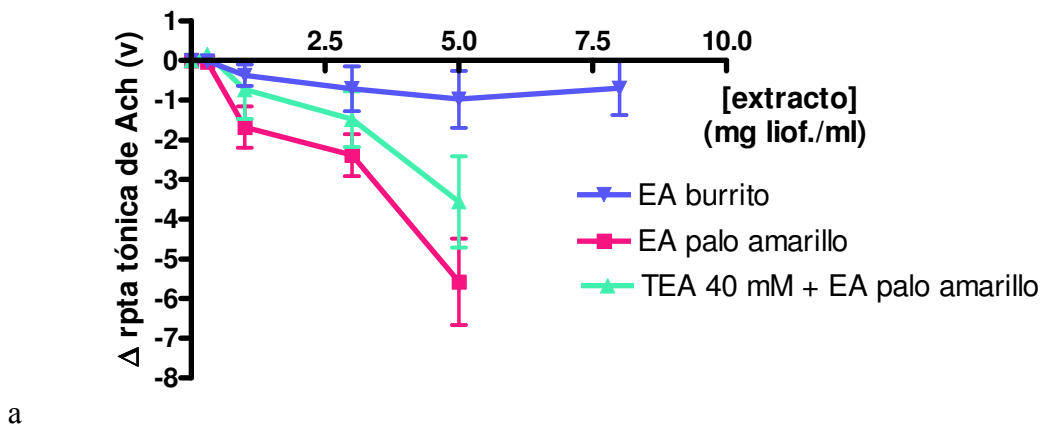
El EA-*A. polystachya* no modificó la contractura tónica producida por una dosis máxima (10  $\mu\text{g/ml}$ ) de Ach (a 0.3 mg/ml), o la contrajo en forma fásica (a 1 y 3 mg/ml). La TM relajó la contractura tónica de modo concentración-dependiente (Figura 6 a). El pretratamiento con tetraetilamonio (TEA) 1 mM (bloqueante de canales de  $\text{K}^+$  tipo  $\text{K}_{\text{Ca}}$  sin afectar los  $\text{K}_{\text{v}}$ ) generó una contracción que representó sólo el  $7.4 \pm 2\%$  de la posterior contractura tónica de Ach, y potenció la relajación del EA (Figura 6 b). Se hipotetizó que la despolarización provocada por TEA podría potenciar un efecto inhibitorio de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  por el EA-*A. polystachya* o liberar un neurotransmisor inhibitorio como dopamina (DA) de las neuronas intrínsecas al tejido.



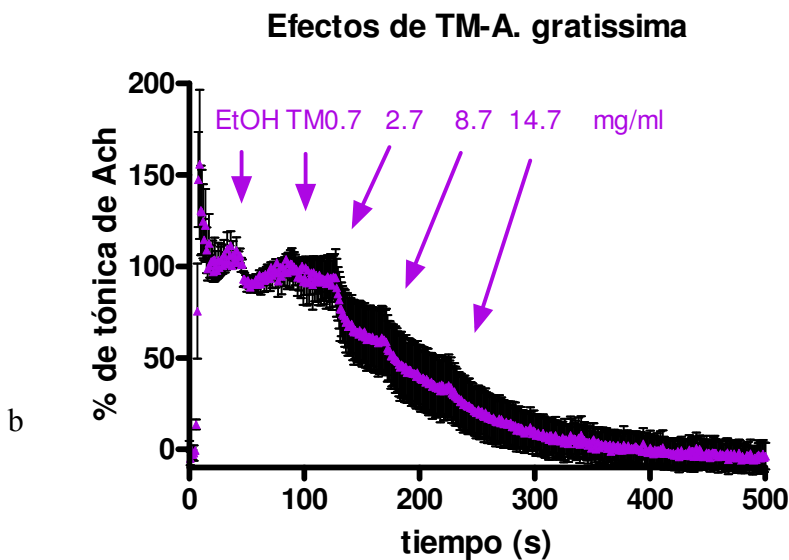
**Figura 6:** Efectos de EA y TM de *A. polystachya* en ausencia (a) y presencia (b) de TEA 1 mM ( $n=4$  en cada experimento). Notar las diferencias en el efecto del EA liofilizado 0.3 mg/ml.

### 3.4.2. De *A. gratissima* (palo amarillo):

El EA-*A. gratissima* relajó la contractura tónica producida por Ach a diferencia del EA de “burrito”, y dicho efecto no fue modificado por el pretratamiento con TEA 40 mM (bloqueante de todos los tipos de canales de K<sup>+</sup>, que generó una contractura tónica tan alta como la mantenida por el posterior agregado de Ach) (Figura 7 a).



a



b

**Figura 7:** Efectos sobre la contractura inducida por Ach de: (a) EA de burrito ( $n=4$ ) y palo amarillo en ausencia y presencia de 40 mM TEA ( $n=6$ ) medidos como cambios de la respuesta tónica, y (b) TM de palo amarillo en concentraciones crecientes (0.7 a 14.7 mg/ml) y su control de etanol 70%. Notar que EA-burrito no relajó, mientras que tanto EA como TM de palo amarillo relajaron la contractura de Ach. El efecto de EA no fue inhibido por TEA 40 mM ( $p=0.51$ , NS).

### 3.5. Efectos sobre los canales de $K^+$ en la CDR de acetilcolina:

Para dilucidar si los TM-*A. polystachya* y *A. gratissima* actúan promoviendo la apertura de los canales de  $K^+$ , se evaluaron sus respectivos efectos en ausencia y presencia del bloqueante TEA 10 mM sobre la CDR de Ach. TEA generó una contractura fásica que relajó a los 10 min, previo a las CDR de Ach (Fig.8).

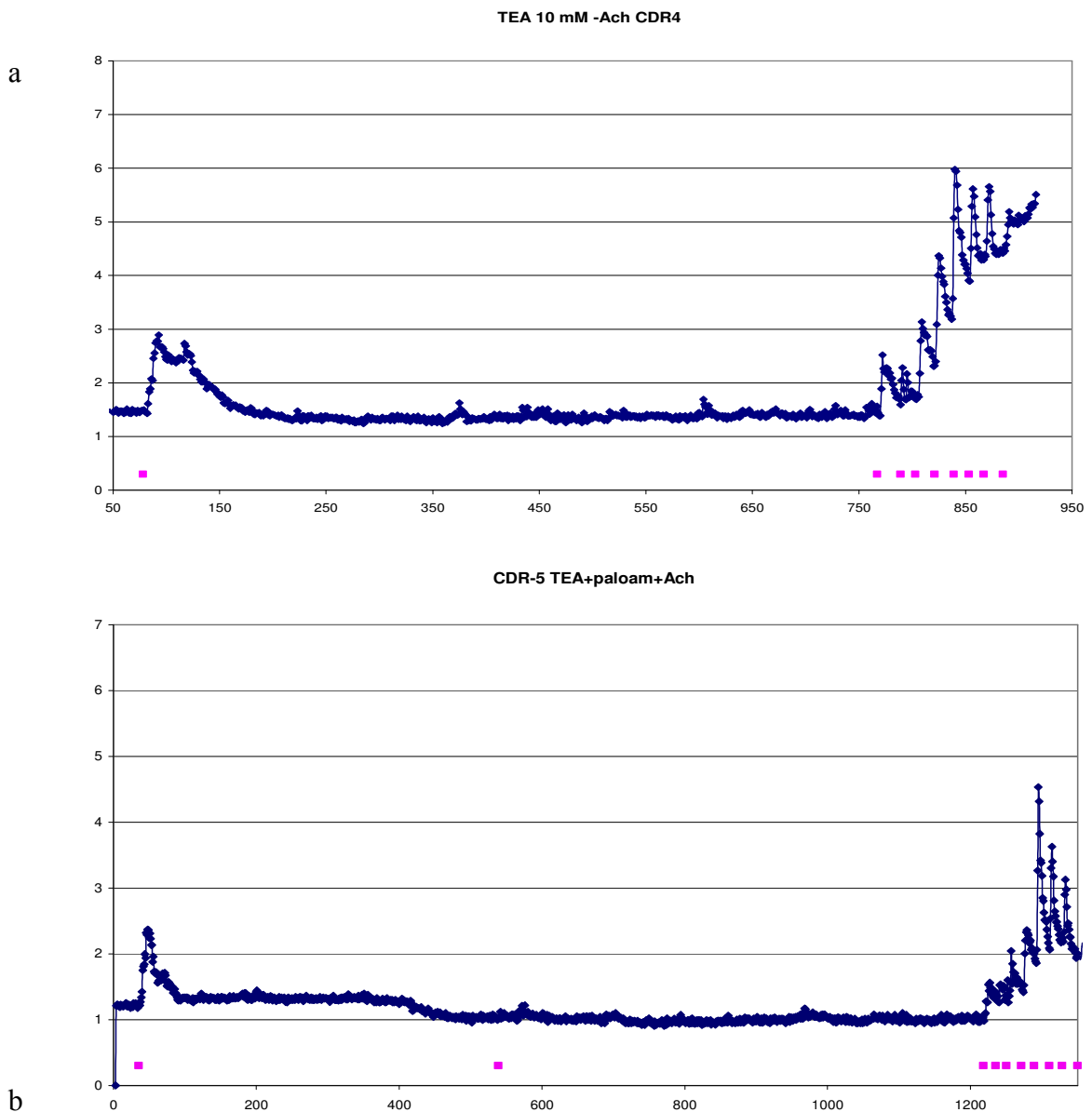


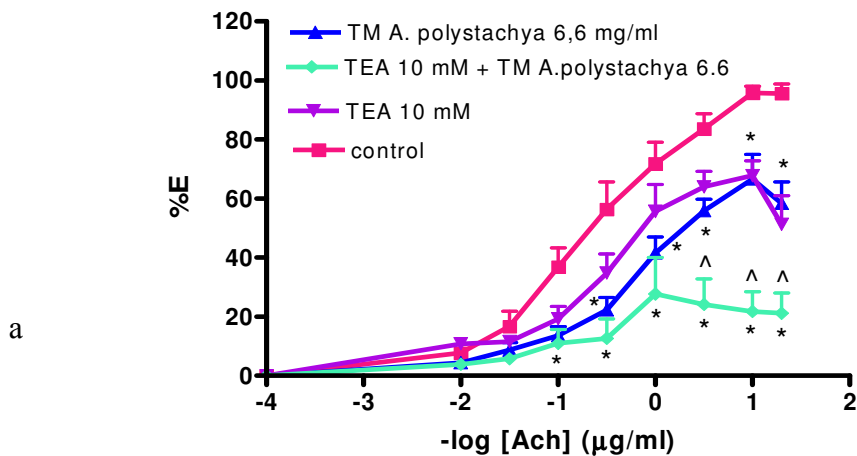
Figura 8: Registros obtenidos por el agregado de TEA 10 mM (contracción fásica inicial) seguido a los 10 minutos por la CDR de Ach (a) o el agregado de TM-*A.gratissima* 6 y la CDR Ach (b. Los puntos rosa indican el agregado de TEA, TM y finalmente la Ach acumulativa

### 3.5.1- De *A. polystachya* (burrito):

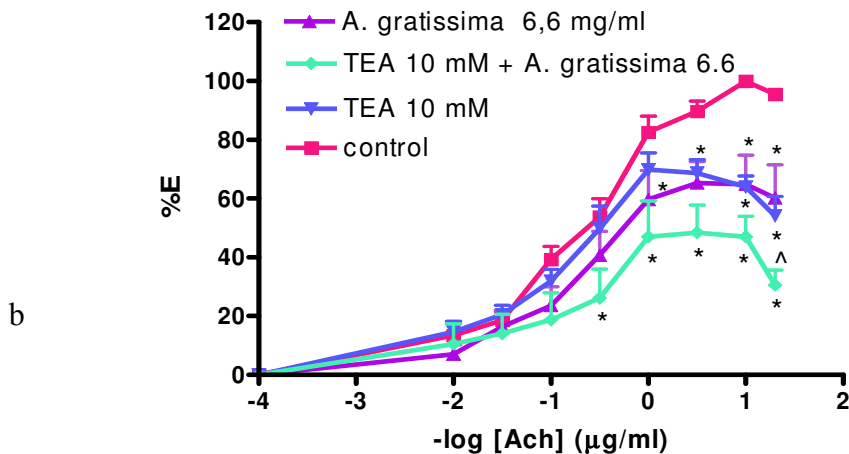
La TM-*A. polystachya* en presencia de TEA potenció su antagonismo no-competitivo de la Ach, en lugar de la esperada inhibición del mismo por TEA (Fig 9a), sugiriendo que no activa los canales de K<sup>+</sup>.

### 3.5.2. De *A. gratissima* (palo amarillo):

La inhibición de la CDR de Ach por TM-*A. gratissima* tampoco fue reducida por la presencia de TEA 10 mM (Figura 8 b y 9b)



ANOVA 2 vías: trtto: F: 69.5,  $p < 0.0001$   
 \*  $p < 0.05$  vs C, ^  $p < 0.05$  vs TM A. polystachya



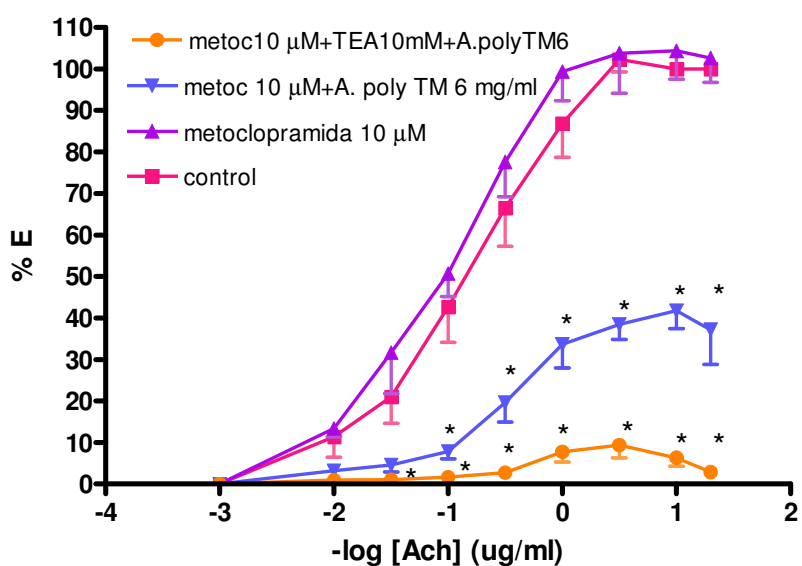
ANOVA 2 vías: trtto: F: 42.86,  $p < 0.0001$   
 \*  $p < 0.05$  vs C, ^  $p < 0.05$  vs A. gratissima

Figura 9: Efectos del TM de burrito (a) y de palo amarillo (b) a 6.6 mg/ml, en ausencia y presencia de TEA 10 mM sobre las CDR de acetilcolina. \*  $p < 0.05$  vs CDR-control, ^  $p < 0.05$  vs TM ( $n = 4$  exptos en c/TM, se ven datos de ANOVA de 2 vías por tratamiento).

### 3.6. Evaluación de la posible liberación de dopamina:

#### 3.6.1- De *A. polystachya* (burrito):

Para evaluar si la potenciación del efecto de TM-*A. polystachya* por TEA es debido a una relajación por liberación de dopamina (DA) que pudo ser estimulada por el bloqueo de los canales de K<sup>+</sup> de las terminales autonómicas, se estudió la TM-*A. polystachya* 6mg/ml en las CDR-Ach en ausencia y presencia de metoclopramida 10 μM (Metoc, antagonista D2) y/o TEA 10 mM. La Figura 10 muestra que metoclopramida no alteró por sí misma la CDR de Ach, pero potenció el bloqueo por TM-*A. polystachya* al reducir el Emax desde el 67 ± 8 % (Fig. 9 a) al 42 ± 4 % (Fig. 10). También potenció el bloqueo de TEA+ TM-*A. polystachya* al reducir el Emax desde el 24 ± 8 % (Fig. 9 a) al 9 ± 3 % (Fig. 10).



ANOVA 2 vias: trtto: F: 368,  $p < 0.0001$ , \* $p < 0.05$  vs control

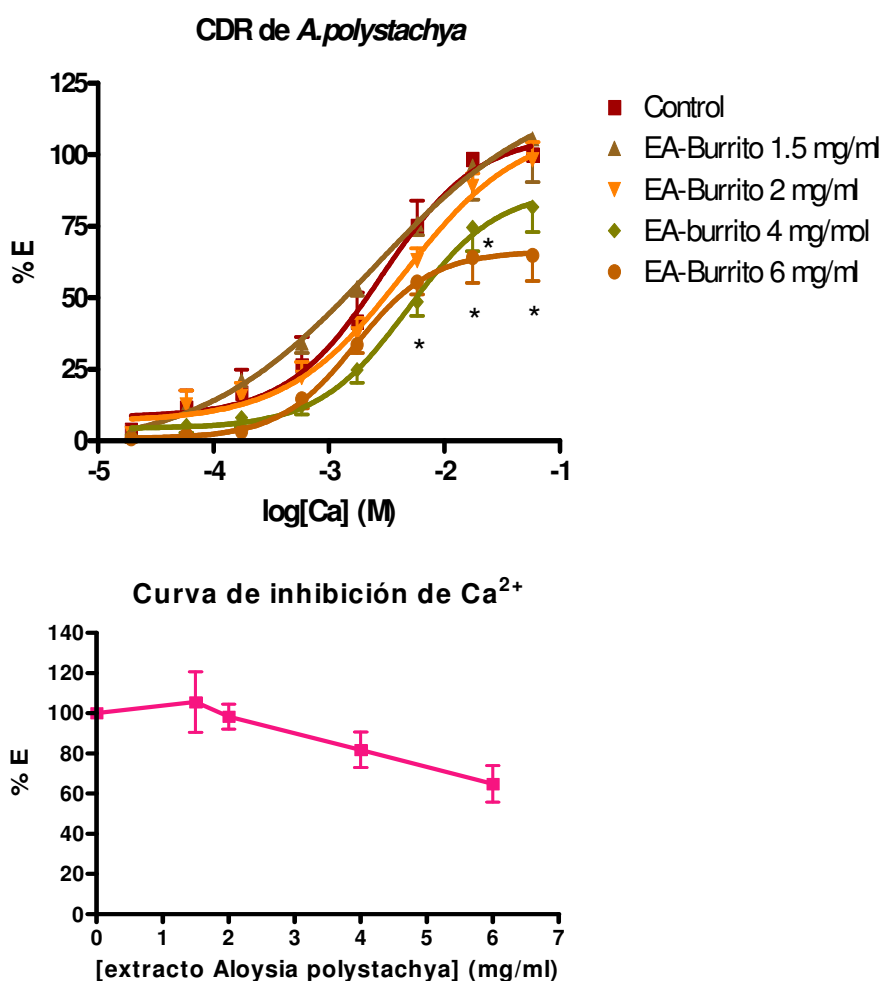
Figura 10: Efecto de la TM-*A. polystachya* (6 mg/ml) sobre las CDR de acetilcolina en el intestino de rata aislada \*  $P < 0.05$  en todas las CDR vs. control en tests a posteriori (n=4).



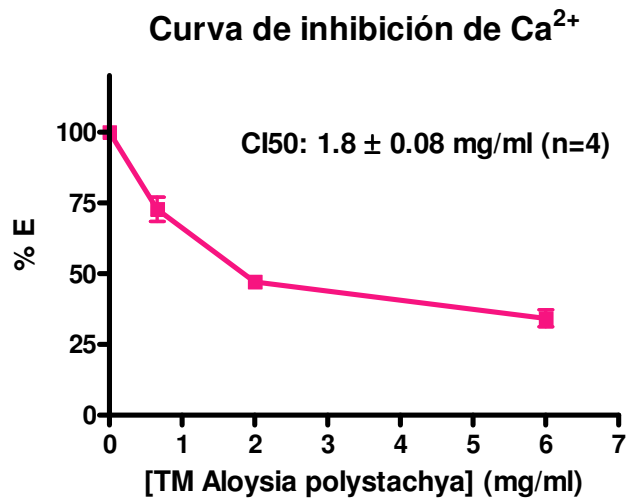
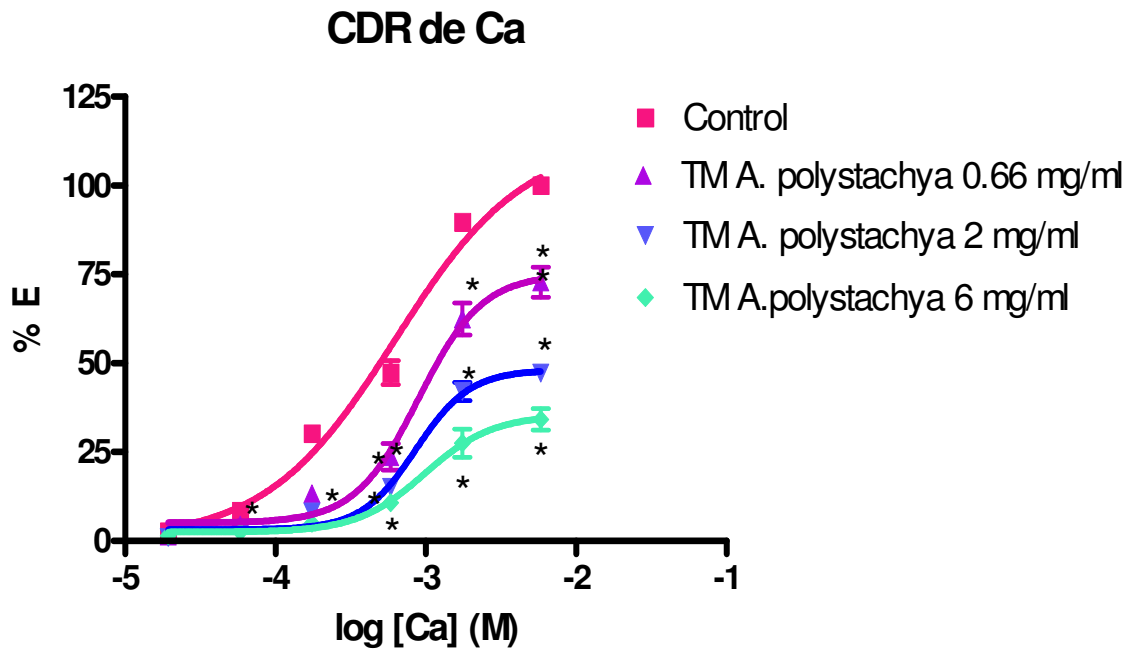
### 3.7. Efectos sobre el influjo a través de canales de $\text{Ca}^{2+}$ :

#### 3.7.1- De *A. polystachya* (burrito):

Para dilucidar si *A. polystachya* actúa inhibiendo el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula muscular lisa intestinal, se realizaron CDR de  $\text{Ca}^{2+}$  en medio despolarizante de alta  $[\text{K}^+]$  o y sin  $\text{Ca}^{2+}$ . Las Figuras 11 y 12 muestran que tanto el EA como la TM inhibieron la CDR de  $\text{Ca}^{2+}$  en forma no competitiva, aunque la TM lo hizo en mayor grado, con  $\text{CI}_{50}$  de  $1.8 \pm 0.08$  mg/ml.



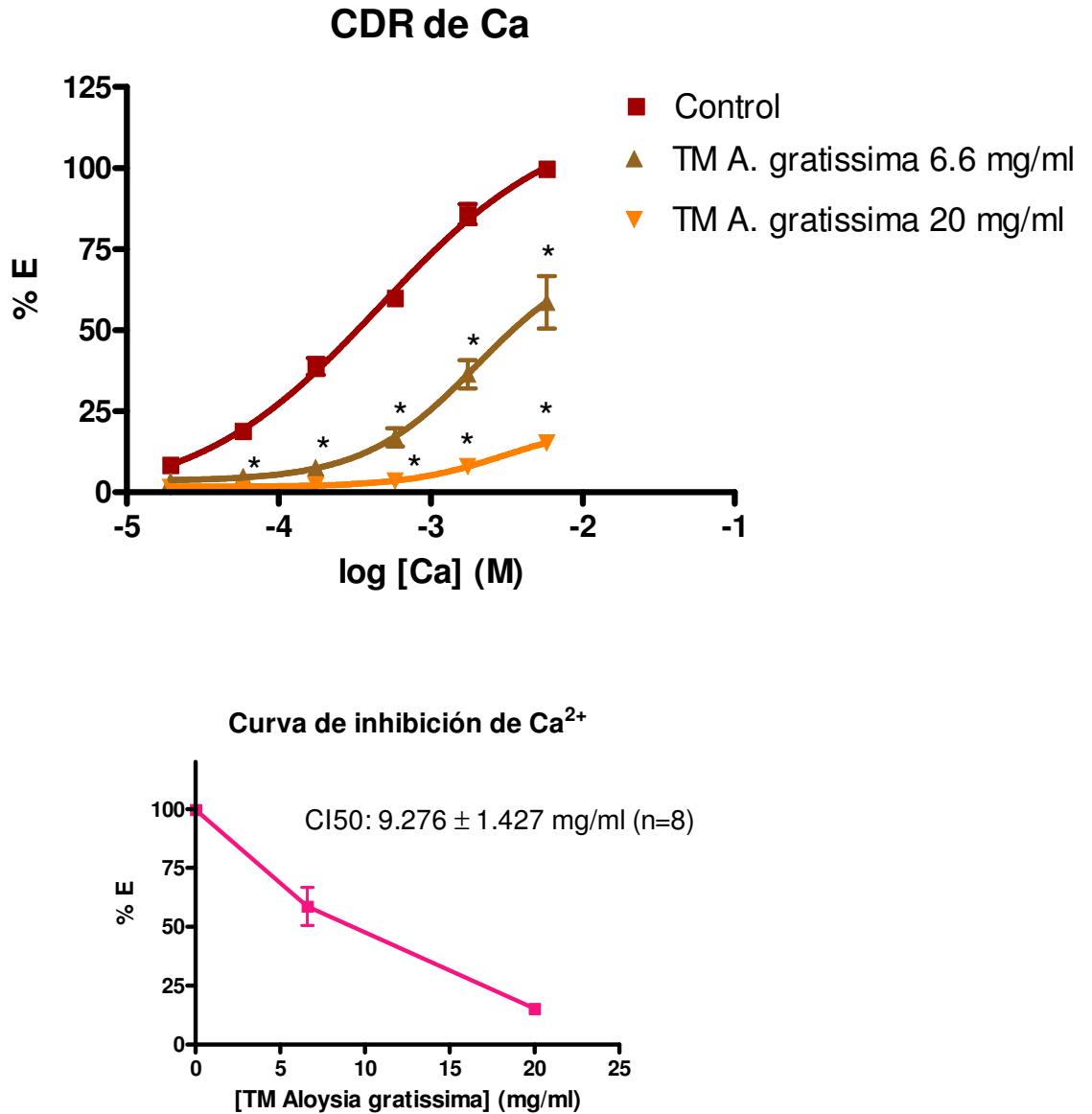
**Figura 11:** Curva dosis-respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia y presencia de varias concentraciones (en mg liofiliz/ml cuba) del extracto acuoso de *Aloysia polystachya* (burrito) (a) y curva de inhibición donde se observa que el efecto se reduce sólo hasta el  $65 \pm 9\%$  no pudiéndose calcular la  $\text{CI}_{50}$  (b),  $\text{pD}_{2\text{Ca}}$ :  $2.79 \pm 0.10$ ,  $n=7$ . ANOVA de 2 vías: por tratamiento:  $F= 14.24$ ,  $df 4$ ,  $p<0.0001$ , por dosis:  $F: 143$ ,  $p<0.0001$ , post-tests:  $*p<0.05$  vs control)



**Figura 12:** Curva dosis-respuesta de Ca<sup>2+</sup> en ausencia y presencia de varias concentraciones (en mg droga/ml cuba) de la tintura madre de *Aloysia polystachya* (burrito) (a) y curva de inhibición de donde se calculó la CI50 (b), n= 4. ANOVA de 2 vías: por tratamiento: F= 258.9, df 3, p<0.0001, por dosis: F: 577,df 5, p<0.0001, post-tests: \*p<0.05 vs control)

### 3.7.2. De *A. gratissima* (palo amarillo):

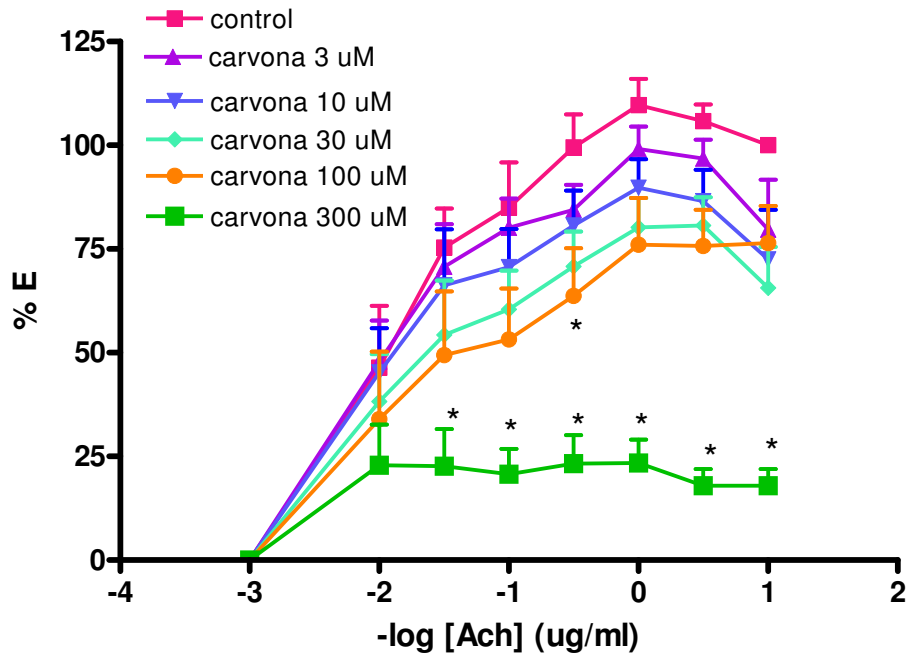
La Figura 13 muestra que la TM de *A. gratissima* inhibió la CDR de  $\text{Ca}^{2+}$  en forma no competitiva, con  $\text{CI}_{50}$  de  $9.3 \pm 1.4$  mg/ml.



**Figura 13:** Curva dosis-respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia y presencia de varias concentraciones (en mg droga/ml cuba) de la tintura madre de *Aloysia gratissima* (palo amarillo) (a) y curva de inhibición de donde se calculó la  $\text{CI}_{50}$  (b), n= 4. ANOVA de 2 vías: por tratamiento:  $F=449.3$ ,  $df\ 2$ ,  $p<0.0001$ , por dosis:  $F: 175.4$ ,  $df\ 5$ ,  $p<0.0001$ , post-tests:  $*p<0.05$  vs control

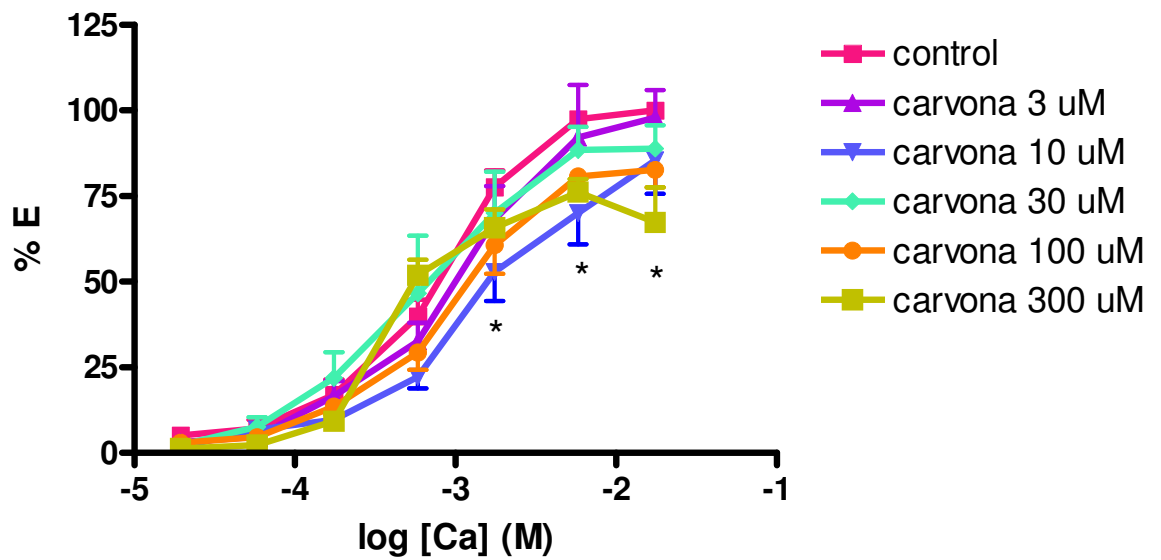
### 3.8. Efectos antiespasmódicos de (-) carvona:

Puesto que se ha descrito entre sus componentes la presencia de (-) carvona en *A. polystachya* (Weridin González et al. 2010), se evaluaron los efectos antiespasmódicos de este compuesto. La Figura 14 muestra que (-)-carvona (Sigma) desarrolló un efecto antiespasmódico asociado a la inhibición no-competitiva de la Ach, determinando la afinidad de (-) carvona por su propio sitio receptor con un  $pD'2 = -\log [\text{carvona}] (\text{Molar}) = 4.002 \pm 0.117$  ( $n = 20$ ). Por otra parte, (-)-carvona inhibió en menor medida la CDR de  $\text{Ca}^{2+}$  de modo no-competitivo, con un  $pD'2$  de  $3.86 \pm 0.19$  ( $n = 18$ ) (Fig. 15).



$pD'2$  carvona:  $4.002 \pm 0.117$  ( $n = 20$ )

**Figura 14:** Efectos de (-)-carvona sobre la CDR de Ach. Se indica la afinidad como  $pD'2$  de carvona. ANOVA de dos vías: por tratamiento:  $F: 43.23, df 5, p < 0.0001$ , por concentración:  $F: 52.58, df 7, p < 0.0001$ , \* $p < 0.05$  vs control por tests a posteriori.



**pD'2 carvona:  $3.86 \pm 0.19$  (n=18)**

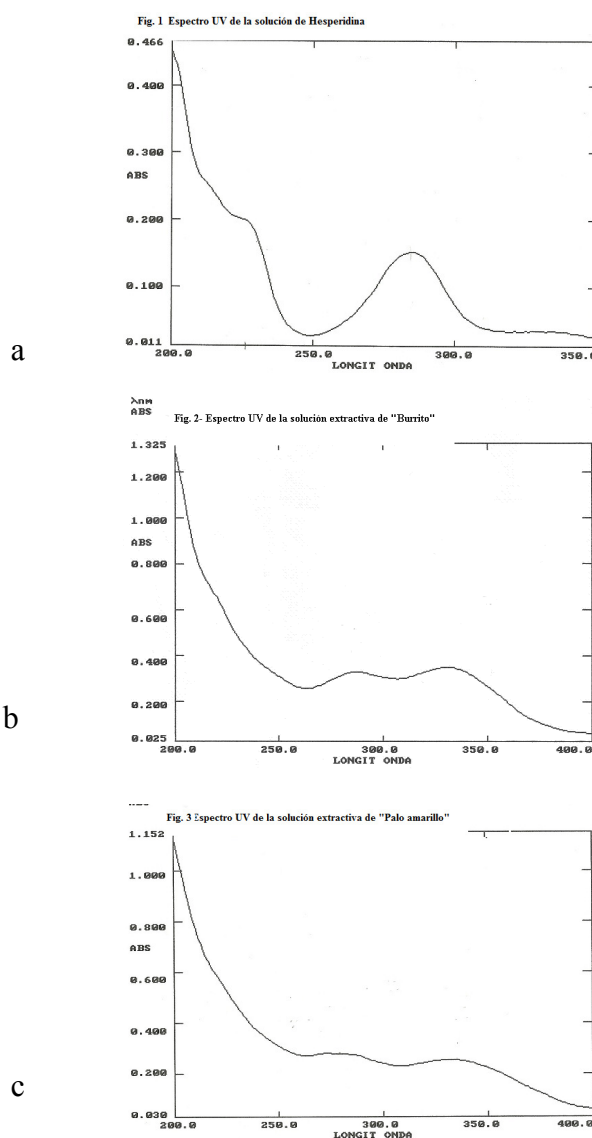
**Figura 15:** Efectos de (-)-carvona sobre la CDR de  $Ca^{2+}$  en 40 mM K. Se indica la afinidad como pD'2 de carvona. ANOVA de dos vías: por tratamiento:  $F: 4.702, df 5, p=0.0006$ , por concentración:  $F: 195.1, df 7, p<0.0001$ , \* $p<0.05$  vs control por tests a posteriori.

### 3.9. Estudios fitoquímicos:

#### 3.9.1- Determinación del contenido total de flavonoides:

##### 3.9.1.1 Espectro UV de la solución de hesperidina y soluciones extractivas

En el rango de trabajo, la hesperidina exhibió un máximo a  $\lambda = 285$  nm con un “hombro” a  $\lambda = 230$  nm (ver Fig. 16a). La soluciones extractivas de burrito y de palo amarillo presentaron en el rango considerado, dos máximos a  $\lambda 285$  nm y  $\lambda 330$  nm (Fig. 16 b y c), razón por la cual se seleccionó la  $\lambda 285$  para hacer la lectura.



**Figura 16:** Espectro UV de la solución patrón de hesperidina (Sigma) (a), de la solución extractiva de *A. polystachya* (burrito) (b) y de *A. gratisima* (palo amarillo) (c).

### 3.9.1.2 Contenido de flavonoides totales

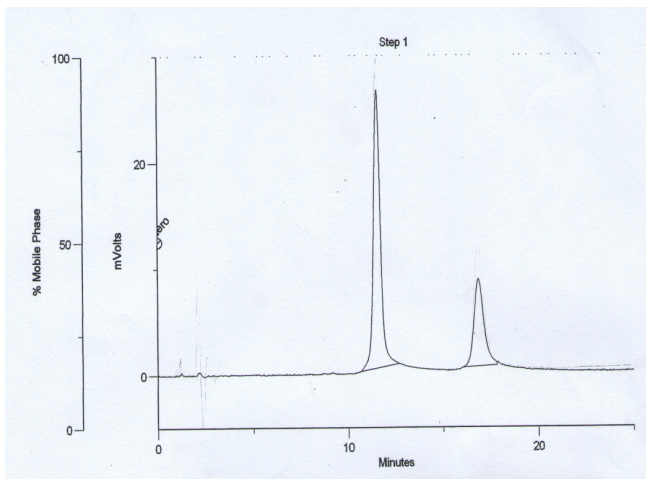
Los datos de absorbancia de las soluciones de hesperidina y de las diluciones ensayadas, así como el resultado en porcentaje, se presentan en la tabla 1

	Solución Hesperidina (40 µg/ml)	Soluciones extractivas	
		Burrito	Palo Amarillo
Absorbancia a 285 nm	0.627	0.330	0.277
Concentración en la dilución 1:20 (µg/ml)	---	21	17.67
% Flavonoides totales en el vegetal (g flavonoides/100 g vegetal)	---	4.2 %	3.53%

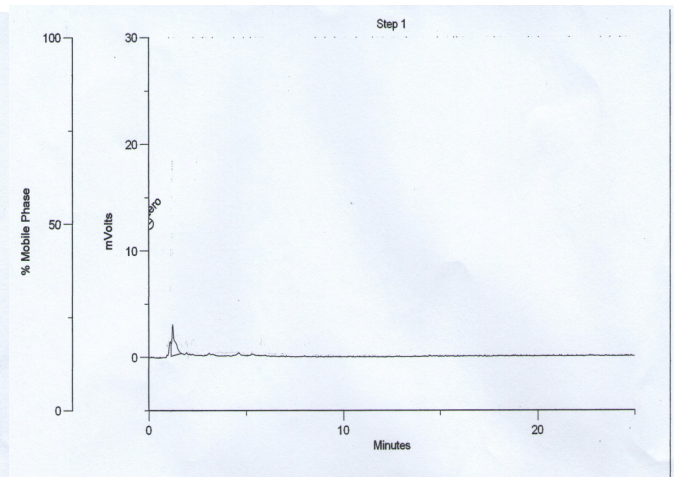
Tabla 1: Datos de absorbancia y cálculo del contenido de flavonoides totales expresados como hesperidina

### 3.9.2 Determinación de la presencia de vitexina e isovitexina:

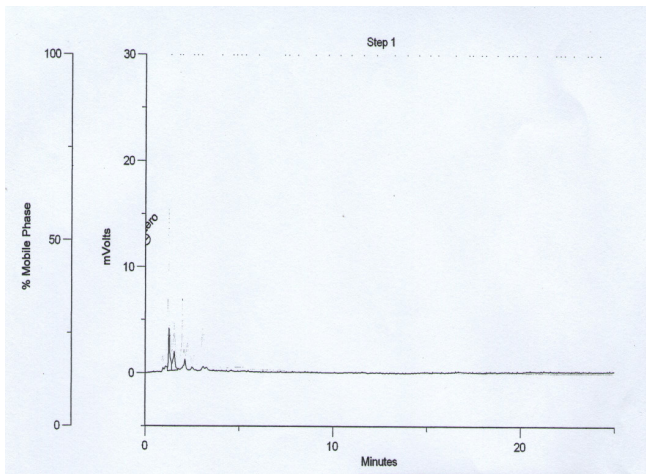
El extracto acuoso crudo de ambas plantas fue analizado por HPLC para obtener el perfil cromatográfico y compararlo con los estándares de vitexina e isovitexina. La Figura 17 muestra el cromatograma obtenido. Pueden apreciarse que los picos y tiempos de retención característicos de los estándares vitexina (tR 11.51 min) e isovitexina (tR 16.85 min) presentes en el “cedrón” no aparecieron en el cromatograma de los extractos de *A. polystachya* ni *A. gratissima*.



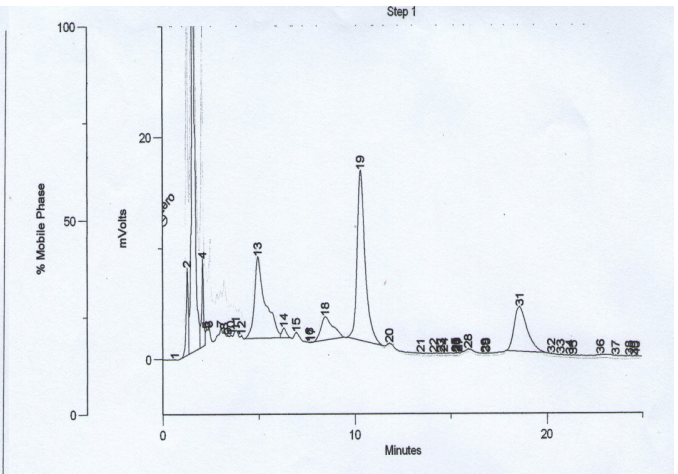
A



B



C



D

Figura 17: Cromatogramas obtenidos por HPLC para una solución con los estándares de vitexina e isovitexina (A), y con los extractos acuosos liofilizados de burrito (B), palo amarillo (C) y cedrón (D), respectivamente.



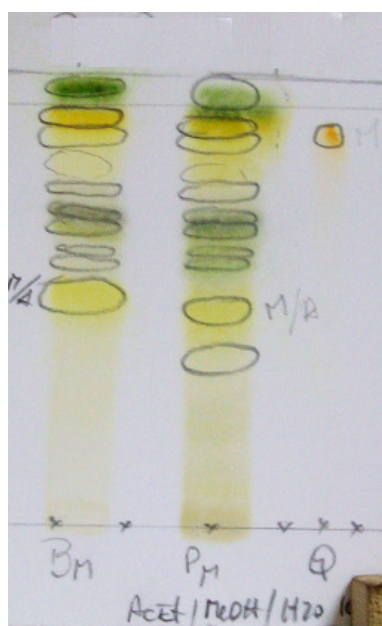
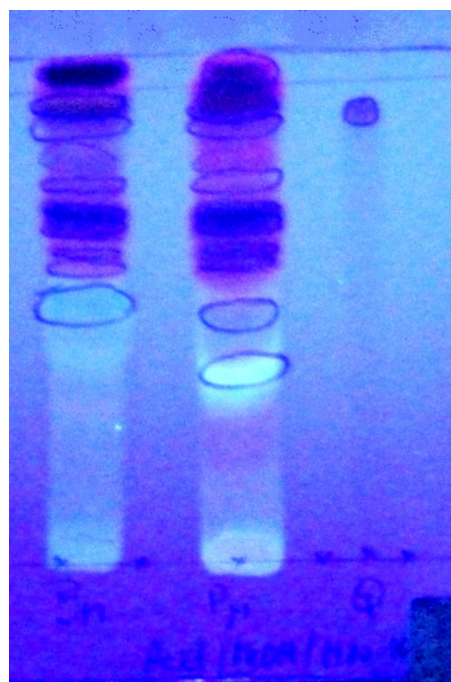
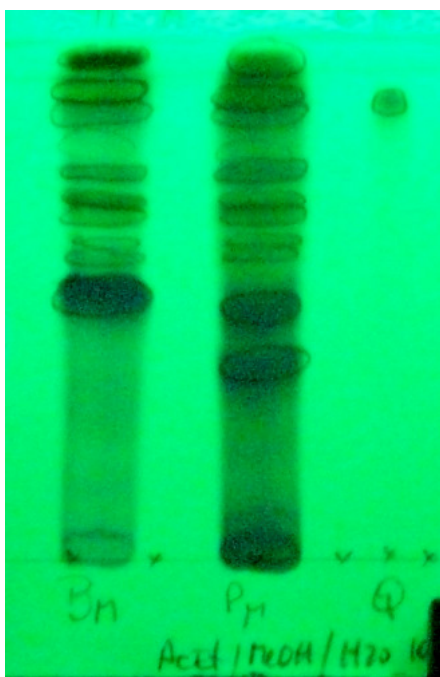
### ***3.9.3- Caracterización de la presencia de flavonoides por cromatografía en capa***

#### ***delgada (CCD):***

Las figuras 18 a 20 y las tablas 1 y 2 muestran los resultados de la aplicación de CCD a los extractos metanólicos y etanólicos de las dos plantas. Se efectuaron con el fin de caracterizar sustancias de naturaleza polifenólica, en especial flavonoides. De todos los sistemas cromatográficos ensayados y mencionados en el punto 2.9.3 de Métodos, el que presentó una mejor resolución fue el sistema 6 (ver figura 18). Puede observarse que los cromatogramas del extracto metanólico de ambas especies exhiben hasta 10 bandas comunes, entre Rf 0.50 y 1.00. El extracto metanólico de “palo amarillo” presenta una banda extra a Rf 0.40 de intensa fluorescencia celeste. Según Wagner y Bladt (1995) esta fluorescencia es típica de los extractos con flavonoides conteniendo ácidos fenil-carboxílicos como el ácido cafeico o el clorogénico. El revelado con un derivado del ácido bórico permite apreciar, entre otras, hasta 4 bandas de color amarillo-naranja (Rf: 0.50; 0.80; 0.85 y 0.90) características de distintos flavonoles y flavonas y sus glicósidos, siendo la más destacada la de Rf 0.50. La banda de Rf 0.90 es coincidente con el testigo del flavonol quercetina. En este tipo de sistema cromatográfico, los aglucones flavonoides se desarrollan en la parte superior de la placa (Rf 0.80 a 1.00) en tanto los glicósidos se ubican hacia la zona media.

Las CCD de las decocciones efectuadas en el sistema 6 (Fig. 19) permite apreciar la presencia en la decocción de “burrito” de 3 bandas muy débiles (Rf 0.45; 0.60 y 0.80) que se corresponden con las del extracto metanólico, en tanto que para la decocción de “palo amarillo” sólo aparecen dos (Rf 0.45 y 0.80).

La CCD en el sistema 6 en presencia de hesperidina como testigo (Fig. 20) muestra una banda cuyo Rf es coincidente con el testigo, para la decocción de “palo amarillo”. Esta situación se repitió al hacer la comparación con una tintura de “palo amarillo”.



**Fig 18. CCD de los extractos metanólicos de *Aloysia* spp.**

Fase móvil: AcEtilo/MeOH/H<sub>2</sub>O 100:17:10

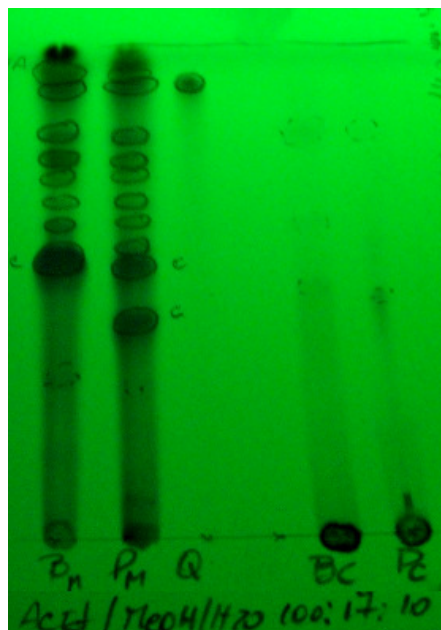
B: "Burrito"

PA: "Palo amarillo"

Q: quercetina

Revelado: Observación UV 254, 366,  
reactivo de Productos Naturales + calor

110°C 5 min



**Fig 19. CCD de los extractos metanólicos y decocciones de *Aloysia* spp.**

*FM: AcEtilo/MeOH/H<sub>2</sub>O 100:17:10*

*BM: "Burrito" sol. Metanólica*

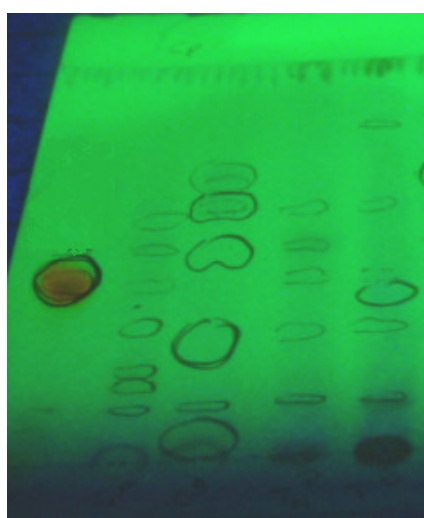
*BC: "Burrito" decocción*

*PM: "Palo amarillo" Sol. metanólica*

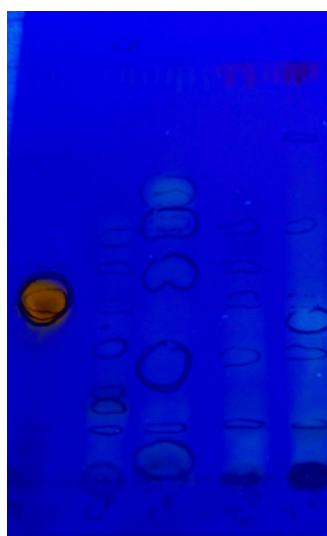
*PC "Palo amarillo" decocción*

*Q: quercetina*

*Revelado: Observación UV 254, 366, reactivo de Productos Naturales +calor 110°C 5 min*



H PC BC PT BT



H PC BC PT BT

**Fig 20. CCD de las decocciones de *Aloysia* spp. Comparación con las correspondientes tinturas**

*Fase móvil: AcEtilo/MeOH/H<sub>2</sub>O 100:17:10*

*BC: "Burrito" decocción BT: "Burrito" tintura*

*PC "Palo amarillo" decocción PT: "Palo amarillo" tintura*

*H: hesperidina*

*Revelado: Observación UV 254, 366*

### **3.9.4- Determinación de la presencia de terpenos como (-) carvona por CCD:**

Los cromatogramas en CCD del extractivo hexánico de las partes aéreas secas y molidas de las dos plantas en estudio se efectuaron con el fin de caracterizar sustancias de naturaleza terpenoide, en especial la cetona monoterpenica (-)-carvona. De todos los sistemas cromatográficos ensayados, los que tuvieron mejor resolución fueron los sistemas 2 y 3 descritos en el punto 2.9.4 de la sección Métodos. En la figura 21 se muestran los cromatogramas obtenidos con el sistema 2. Los perfiles cromatográficos en el sistema 2 son muy similares para ambas especies de *Aloysia* spp. Por observación al UV en  $\lambda$  254 se aprecian 6 bandas entre Rf 0 y 0.60 para ambas especies. Una de las bandas (Rf 0.40) coincide con la posición del testigo del monoterpeno (-)-carvona; al igual que otra banda que corre con el frente de solvente. Al UV en  $\lambda$  366 se destaca una banda de fluorescencia celeste (Rf 0.25), que no reacciona con anisaldehído sulfúrico. Por revelado con anisaldehído sulfúrico, se aprecian las 7 bandas antes mencionadas, destacándose por ser mas intensa la cuarta banda (Rf 0.30) con una coloración violácea. Según estas TLC, los extractos hexánicos de burrito y palo amarillo serían muy similares en cuanto a su composición en sustancias de naturaleza terpénica. El aldehído monoterpénico (-)-carvona formaría parte de las sustancias presentes en estas plantas.

En el sistema 3, cuyos cromatogramas pueden observarse en la fig. 22, se aprecia que los perfiles de ambos cromatogramas también son muy similares, a excepción de una débil banda a Rf 0.45 presente solamente en “burrito”. Para ambas especies, los cromatogramas presentan 7 bandas idénticas, 6 de ellas entre Rf 0 y 0.60 y una con baja resolución en este sistema, que corre con el frente de solvente. En ambos cromatogramas aparece a Rf 0.30 una banda fluorescente celeste al UV 366, que no reacciona con anisaldehído sulfúrico. También se aprecia a Rf 0.50 una banda de color rojo violáceo en presencia de anisaldehído sulfúrico, cuyo Rf y características son coincidentes con las del testigo de (-)-carvona.



B PA Ca



B PA Ca



B PA Ca

**Fig 21. CCD de los extractos hexánicos de *Aloysia* spp.**

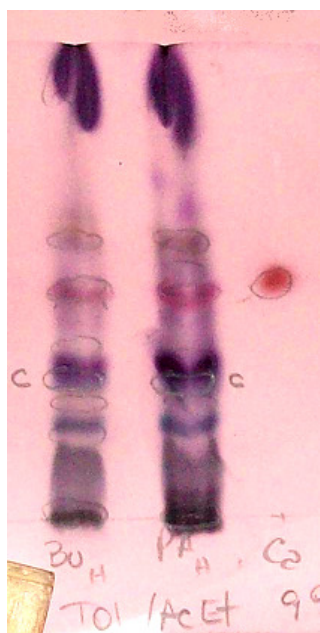
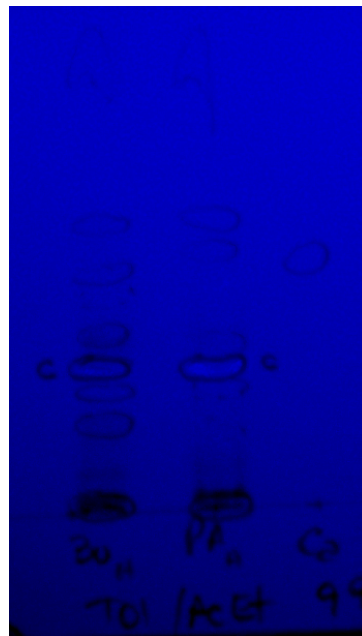
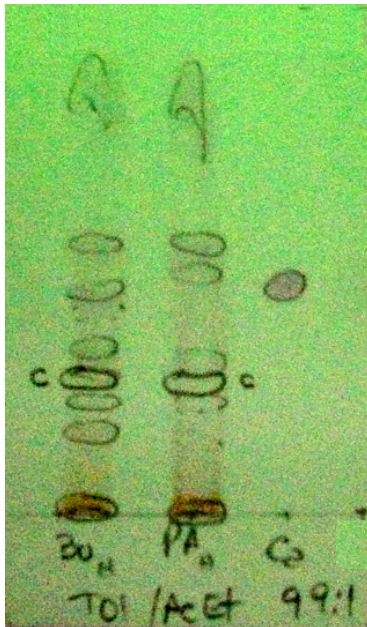
*Fase móvil: Tolueno/AcEtilo 96:4*

*B: "Burrito"*

*PA: "Palo amarillo"*

*Ca: Carvona*

*Revelado: Observación UV 254, 366,  
anisaldehido sulfurico +calor 110°C 5 min*



**Fig 22. CCD de los extractos hexánicos de *Aloysia* spp.**

FM: Tolueno/AcEtilo 99:1

B: "Burrito"

PA: "Palo amarillo"

Ca: Carvona

Revelado: Observación UV 254, 366,  
 anisaldehido sulfurico + calor 110°C 5 min

## **DISCUSSION**

La presente tesis valida el uso popular de “burrito” y “palo amarillo” como antiespasmódicos gastrointestinales, ya que demuestra que tanto los extractos acuosos como las tinturas de *Aloysia polystachya* y *Aloysia gratissima* antagonizan en forma no-competitiva las contracciones inducidas por acetilcolina.

#### **4.1 Efectos sobre la CDR de Ach:**

El EA de burrito (*Aloysia polystachya*) inhibió la CDR de Ach hasta alrededor de un 40% de su Emax. La CI50 resultó  $1.8 \pm 0.27$  mg liofilizado/ml y fue comparable a la encontrada con el EA de cedrón (*Aloysia citriodora*) que era de  $1.34 \pm 0.49$  mg liofil/ml (Ragone y col. 2007). En cambio, el EA de palo amarillo (*Aloysia gratissima*) generó menor grado de inhibición (hasta un 65% del Emax) aunque a una CI25 ( $0.276 \pm 0.077$  mg liof./ml) inferior a las CI50 de cedrón y burrito. Estos resultados sugieren que el extracto crudo acuoso de palo amarillo podría tener una menor actividad antiespasmódica que las otras dos especies de *Aloysia*.

Por otra parte, las tinturas madre obtenidas por maceración son una modalidad frecuente de preparación farmacéutica de las plantas medicinales, ya que permiten conservar un mayor contenido de esencias que las infusiones o decocciones. El estudio de las TM arrojó una potenciación del efecto antiespasmódico en comparación con los extractos acuosos obtenidos por decocción. Así la TM de *Aloysia polystachya* inhibió no-competitivamente la CDR de Ach hasta un 30% del Emax con una CI50 de  $3.15 \pm 0.57$  mg droga/ml. La TM de *Aloysia gratissima* también inhibió de modo no-competitivo la CDR de Ach, hasta un 67% del Emax con una CI50 de  $6.46 \pm 2.28$  mg droga/ml. Nuevamente con las TM, el palo amarillo demostró tener algo menor efecto que el burrito.

El antagonismo no-competitivo de la CDR de Ach demuestra que las plantas estudiadas no bloquean el receptor muscarínico en el que actúa la Ach, sino que interfieren en otro sitio



correspondiente a la cascada intracelular que se desencadena por activación de dicho receptor. En este sentido, se efectuaron los siguientes protocolos para dilucidar el posible mecanismo de acción.

#### **4.2- Efectos relajantes de la contractura tónica:**

El EA de *A. polystachya* no relajó la contractura tónica producida por 40 mM  $K^+$  (Fig. 5 a) ni por Ach (Fig. 6 a). Se hipotetizó que el EA de *A. polystachya* podría actuar mediante la activación de canales de  $K^+$ , ya que este mecanismo implica la hiperpolarización por aumento del eflujo de  $K^+$  celular, y se evita cuando la contractura es producida por la despolarización originada en medio de alta  $[K^+]$ . Sin embargo, la ausencia de relajación de la contractura tónica de Ach por el EA sugirió que el mecanismo inhibitorio debería ocurrir anticipadamente al desarrollo de la contracción, pues no se manifestó cuando la contractura estaba ya desarrollada. Por el contrario, apareció contractura fásica que no se vió en las CDR.

Por otra parte, la TM de *A. polystachya* provocó relajación de la contractura tónica de Ach, de modo dependiente de la concentración (Fig. 6 a). Esta diferencia con el EA sugirió que en el medio de etanol 70% se extraerían predominantemente los compuestos relajantes. La relajación de la contractura de Ach permitió hipotetizar que la TM podría activar a los canales de  $K^+$ , y para evaluarlo se realizó la misma curva relajante del TM en presencia de TEA 1 mM, una concentración más selectiva en la que sólo inhibe a los canales de  $K^+$ -dependientes de  $Ca^{2+}$  dejando activos a los otros canales de  $K^+$  voltaje-dependientes ( $K_v$ ) (Zhao y col. 2009). La Fig. 6 b muestra que no se inhibió la relajación, sugiriendo que la misma no es debida a la activación de canales de  $K^+$ -dependientes de  $Ca^{2+}$ . Por el contrario, la relajación se potenció, apareciendo ya con la menor concentración del EA

En el caso de *A. gratissima* tanto el EA como la TM relajaron la contractura de Ach (Fig.7) y el TM relajó la contractura tónica por alta  $[K^+]$  (Fig 5b). El efecto relajante del EA sobre Ach no fue afectado por el bloqueo de los canales de  $K^+$  con TEA a la concentración no-selectiva de 40

mM (Fig. 7 a). Estos resultados sugirieron que el EA de *A. gratissima* no activaría canales de  $K^+$ . Además, la TM generó una mayor relajación concentración-dependiente que el EA, por lo que se pensó que extraería mayor cantidad de principios activos. Por lo tanto, a pesar de las diferencias en los efectos de los EA sobre las CDR-Ach, las TM de ambas especies de *Aloysia* produjeron similar relajación de la contractura tónica de Ach.

#### **4.3 Mecanismos de acción:**

Se evaluó más detalladamente si la inhibición no-competitiva de la CDR de Ach por las TM de ambas especies de *Aloysia* era debida a la activación de canales de  $K^+$  de tipo  $K_v$  (y  $K_{Ca}$  en el caso de *A.gratissima*) previo a la inducción de la contracción. Para ello, se realizaron las CDR de Ach con el previo tratamiento de la TM a la concentración óptima de 6.6 mg/ml en ausencia y presencia de TEA 10 mM (bloqueador no selectivo de  $K_v$  y  $K_{Ca}$ ). Se eligió esta concentración de 10 mM de TEA porque sólo desarrolla contracción fásica en este preparado, evitando la contractura tónica propia de la concentración de 40 mM, por lo que no afecta la línea de base de las CDR. Las figuras 8 y 9 muestran que los efectos bloqueantes no competitivos de las TM de ambas especies de *Aloysia* no fueron bloqueados por TEA, sino que contrariamente a lo esperado fueron potenciados por esta droga. Dado que la contracción fásica inducida por la despolarización provocada por TEA 10 mM había decaído a la línea de base antes de iniciar la CDR o agregar la TM, no existe interferencia en la estimación de los %E correspondientes a la Ach, asegurando que la inhibición no-competitiva es genuina. La ausencia de inhibición de TEA sobre el efecto de las TM permite concluir que las TM no estarían activando canales de  $K^+$  en el músculo liso intestinal, como una vía hiperpolarizante que reduciría el influjo de  $Ca^{2+}$ .

Sin embargo, fue notorio que tanto TEA 1 mM provocara una potenciación de la relajación de *A.polystachya* sobre la contractura tónica de Ach, como que TEA 10 mM potenciara la inhibición no-competitiva de las TM de *A.polystachya* sobre la CDR de Ach. Este similar

comportamiento frente a TEA permitió hipotetizar que la despolarización provocada por TEA podría inducir uno de los siguientes mecanismos: liberar un neurotransmisor inhibitorio como dopamina (DA) por despolarización de las respectivas neuronas intrínsecas del tejido, o potenciar un efecto inhibitorio de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del músculo liso por *A. polystachya*, considerando que TEA aumenta el número de canales activados. La figura 10 muestra que el pretratamiento con metoclopramida 10  $\mu\text{M}$ , que bloquea competitivamente la unión de dopamina a los receptores D2 presentes en el sistema gastrointestinal, no impidió el efecto de la TM de *A. polystachya*, permitiendo concluir que el efecto relajante de la TM potenciado por TEA no es debido a la liberación de dopamina actuando en D2. Puede observarse que metoclopramida por sí misma no afectó la CDR de Ach, como era de esperar debido a sus diferentes sitios de acción. Sin embargo, metoclopramida potenció las inhibiciones no-competitivas de la TM, tanto en ausencia como en presencia de TEA (comparar con Fig 9 a). Este resultado sugiere que metoclopramida podría interactuar con algún principio activo presente en la TM de *A. polystachya*.

Finalmente, las TM de ambas especies de *Aloysia* estudiadas exhibieron un efecto inhibitorio no-competitivo sobre las CDR de  $\text{Ca}^{2+}$  en medio despolarizante. La  $\text{CI}_{50}$  de TM- *A. polystachya* en estas CDR ( $\text{CI}_{50}$  de  $1.8 \pm 0.08$  mg/ml) fue menor que la de TM-*A. gratissima* ( $\text{CI}_{50}$  de  $9.3 \pm 1.4$  mg/ml), acorde con la potencia encontrada en los efectos de los EA sobre CDR-Ach. Por otra parte, las  $\text{CI}_{50}$  en las CDR-Ca son similar (en *A. gratissima*) o menor (en *A. polystachya*) que las  $\text{CI}_{50}$  en las CDR-Ach, lo cual sugiere que la inhibición sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  sería responsable del efecto inhibitorio sobre la Ach. Estos resultados demuestran que las TM inhiben el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula muscular lisa, aunque lo hacen en una forma no-competitiva. La ausencia de antagonismo competitivo sugiere dos posibilidades: un efecto en un sitio del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  diferente al de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  como lo hacen diltiazem y verapamil, o que podría inhibir otro paso posterior al influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  como por ejemplo la unión a calmodulina o la interacción actomiosínica. Un comportamiento análogo fue demostrado para el EA de cedrón (*A. citriodora*),

que inhibió la CDR de  $\text{Ca}^{2+}$  con una  $\text{CI}_{50}$  de  $2.64 \pm 0.23$  mg/ml, pero dicho efecto estaba asociado a la activación de la guanilatociclasa y de los canales de  $\text{K}^+$  (Ragone y col 2007).

#### **4.4 Efectos de (-)-carvona**

Esta tesis ha caracterizado por primera vez en la literatura los efectos del monoterpeno cetónico (-)-carvona en las CDR de Ach y de  $\text{Ca}^{2+}$  del intestino de rata. Este compuesto ha sido encontrado en un 85% en la esencia de *A. polystachya*, en un estudio donde se describió actividad ovicida y repelente de la esencia (Werdin-González y col. 2010). Este monoterpeno también exhibió actividad antinociceptiva en ratones a una dosis de 100 mg/kg, por un mecanismo no-opioide sino asociado a disminución de la excitabilidad del nervio con reducción de la amplitud del potencial de acción (Goncalves y col. 2008). Se lo describió en gran cantidad en la esencia de las hojas de *Mentha villosa*, y demostró un efecto relajante de la contractura tónica de  $\text{K}^+$  60 mM en el íleon aislado de cobayo con una  $\text{EC}_{50}$  de 60  $\mu\text{M}$ , donde fue más potente que el enantiómero (+)-carvona (de Sousa y col. 2008). En los presentes resultados, se obtuvo un antagonismo no-competitivo de (-)-carvona sobre las CDR de Ach y de  $\text{Ca}^{2+}$  en el intestino de rata, con una afinidad estimada mediante el  $\text{pD}'2$  ( $-\log \text{K}_i$ ) de alrededor de 4. Este dato permite deducir que la concentración que ocupa la mitad de los receptores de (-)-carvona sería 100  $\mu\text{M}$  ( $\text{K}_i$ ), que es cercana a la  $\text{CE}_{50}$  de relajación en íleon de cobayo. La similitud de  $\text{pD}'2$  de las CDR de Ach y de  $\text{Ca}^{2+}$  sugiere que la inhibición de la contracción de Ach depende de la inhibición del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### **4.5 Estudios fitoquímicos:**

A diferencia de lo encontrado en *Aloysia citriodora* (cedrón) (Ragone y col. 2007), en los EA de *A. polystachya* y de *A. gratissima* no se encontró la presencia de los flavonoides vitexina e isovitexina por HPLC. De estos flavonoides, sólo vitexina demostró tener

actividad antiespasmódica por inhibir no-competitivamente a la Ach, pero no bloqueó las CDR de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ragone y col. 2007).

En las CCD de los EA de *A. polystachya* y *A. gratissima* se encontró la presencia de flavonoides. En general, las decocciones de ambas especies, contienen muy baja proporción de componentes si las comparamos con los extractos metanólicos; no obstante, es posible visualizar un perfil característico para las mismas, y con elementos que permiten diferenciarlos. El flavonol quercetina formaría parte de los flavonoides presentes en ambas especies estudiadas. La hesperidina podría estar presente en las decocciones de “palo amarillo”. El contenido de flavonoides totales, expresados como hesperidina, es ligeramente superior para la especie *A. pachystachya* (“burrito”). La presencia de flavonoides podría explicar la actividad encontrada, ya que estos compuestos tienen comprobada actividad relajante del músculo liso, e inhibidora del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gharzouli y Holzer, 2004).

Respecto a los extractos metanólicos de “burrito” y “palo amarillo”, sus perfiles cromatográficos también presentan grandes similitudes, sin embargo, es posible distinguirlos por la existencia de una banda extra ( $R_f$  0,40) en el extracto metanólico de “palo amarillo” esta banda, según los datos bibliográficos correspondería a un derivado del ácido cafeico o clorogénico.

Además, los extractos hexánicos de “burrito” y “palo amarillo” serían muy similares en cuanto a su composición en sustancias de naturaleza terpénica. La cetona monoterpénica (-)-carvona formaría parte de las sustancias presentes en ambas especies de *Aloysia*, demostrando que la extracción en hexano retuvo parte de los componentes de la esencia. Se ha demostrado que algunos monoterpenos como el citral ejercen una actividad relajante de la contractura provocada por varios agonistas y por alta  $[\text{K}]_o$  en el íleon, mecanismo que sugiere interferencia con el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , y parece ser el principal responsable de los efectos de *Melissa officinalis* (Sadraei y col. 2003). Como se describió en el punto anterior, si

bien había escasos datos sobre la actividad relajante de (-)-carvona, esta tesis determinó que posee actividad antiespasmódica antagonista no-competitivo de Ach y de  $Ca^{2+}$ . Por lo tanto, este compuesto podría ser uno de los responsables del mayor efecto obtenido con las TM que con el EA, puesto que sólo las TM podrían retener componentes de la esencia al ser obtenidos por maceración. La presencia de (-)-carvona por ser un compuesto volátil de la esencia es difícil de caracterizar por CCD en los extractivos. Sin embargo su presencia en las hojas coincide con el trabajo de Werdin Gonzalez (2010) que describe un 83.5% de (-)-carvona en el aceite esencial de *Aloysia polystachya*.

Se ha reportado en bibliografía que las especies de *Aloysia* de Chaco y Corrientes poseen un bajo contenido de terpenos oxigenados haciéndose más apreciable la proporción de compuestos sesquiterpénicos como el  $\beta$ -cariofileno (entre 20 y 27%), los cuales le dan alto índice de refracción a la esencia (Ricciardi y col 2002). Según dichos estudios, las plantas del género *Aloysia* se caracterizan por una constancia química en la composición del aceite apareciendo diferencias cuantitativas en relación al estado de crecimiento de la planta con mayor rendimiento en verano y primavera. En estos trabajos se destaca que la esencia de *A. gratissima* del nordeste de nuestro país exhibía entre 7 y 26% de  $\alpha$ -tuyona antes no encontrada en esta especie, que alcanzó su máximo en ejemplares cosechados en primavera y su mínimo en verano (Ricciardi y col 2002). La presencia de tuyonas en cantidades elevadas en *A. gratissima*, coincide con lo hallado en la especie *A. polystachya* (Griseb.) Mold. Conocida como “té del burro”, y podría ser causante de un efecto tóxico moderado en el sistema nervioso que, bajo ciertas concentraciones, puede conducir a convulsiones.

Los perfiles cromatográficos obtenidos constituyen un buen aporte para un eventual control de calidad de estas especies.

Esta tesis es de índole principalmente farmacológica para cumplir con el objetivo principal de validar el uso popular de estas dos especies de *Aloysia* como antiespasmódicas y

caracterizar la presencia de algunos grupos de principios activos. Sin embargo, para lograr una más detallada correlación de la composición de la planta con la actividad farmacológica se requerirán metodologías analíticas más sensibles y complejas con sus respectivas validaciones, enfoque que excede el objetivo general de esta tesis de Magister.

#### 4.5 Conclusiones:

- Esta tesis avala el uso como antiespasmódicos intestinales de *Aloysia polystachya* y *Aloysia gratissima* ya que reducen los efectos espasmogénicos de Ach.
- Producen una inhibición no-competitiva de la contracción de Ach con una CI50 comparable a la de cedrón (*Aloysia citriodora*).
- Las tinturas madres obtenidas por maceración de las hojas de ambas especies de *Aloysia* en etanol de 70% a temperatura ambiente también demostraron una actividad antagonista no competitivo de la Ach, mayor que la encontrada con los extractos acuosos obtenidos por decocción con agua a ebullición, sugiriendo que el medio etanólico extrae más principios activos relajantes.
- Los efectos sobre la Ach pueden explicarse por un antagonismo no-competitivo del influjo de  $Ca^{2+}$ , ya que las CI50 de ambas CDR son similares.
- El efecto de la TM se potencia al despolarizar el tejido por bloqueo de los canales de  $K^+$ , y no involucra la liberación de dopamina (DA) actuando en receptores D2.
- El efecto de las TM podría ser debido en parte a la presencia del monoterpeno (-)-carvona en la esencia, pues ésta produce inhibición no-competitiva de la CDR de Ach, asociada a la inhibición no-competitiva de la CDR de  $Ca^{2+}$ .
- En las hojas se encontró la presencia de flavonoides como quercetina y hesperidina, pero no de vitexina o isovitexina.
- A pesar de compartir la misma actividad antiespasmódica asociada a la inhibición no-competitiva del influjo de  $Ca^{2+}$ , y contrariamente a la hipótesis inicial de esta tesis, las dos especies estudiadas de *Aloysia* difieren del cedrón (*A. citriodora*) tanto a nivel mecanístico (no activan los canales de  $K^+$  como cedrón) como fitoquímico (no poseen vitexina ni isovitexina).



# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abedini; W., Sharry, S., Rivas C., Traversaro, M., Romero, M., Mattia, V. Progapagación vegetativa de especies forestales, frutales, aromáticas y medicinales. Planes de investigación dentro del marco de la comisión de investigaciones científicas (CICPBA). Facultad de Cs. Agrarias y Forestales. UNLP. IV Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO 1999. CE.PRO.VE: <http://www.inta.gov.ar> Ultima revisión 04/09/2010
- Aguado, M., Nuñez, M., Dudik, H., Bela, A., Raisman, J., Sansberro, P. “Diseño de Comprimidos de Extracto de *Aloysia polystachya* por compresión directa.”. Acta Farm. Bonaerense 25 (2):225-30, 2006.
- Aguado, M., Nuñez, M., Dudik, H., Bela, A., Sansberro, P., Raisman, J.”Cultivo de *Aloysia polystachya*, obtención y propiedades físicas de sus soluciones extractivas: ensayos exploratorios. UNNE-CONICET. [www1.unne.edu.ar/cyt/2001/8-Exactas/E-035.pdf](http://www1.unne.edu.ar/cyt/2001/8-Exactas/E-035.pdf) ult rev 25/09/2010
- Aguado, M., Nuñez, M., Bela, A., Sosa, A., Sansberro, P. Ensayos preliminares en *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold. (Verbenaceae) y sus tinturas. Latin American Journal of Pharmacy.26 (3): 411- 4, 2007.
- Almeida, F., Zunino, P., Ponce,A., Zygadlo,J., Baiardi,G. “Bioactividad del aceite de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold.: efectos sobre el comportamiento de ansiedad”. Primera jornada de Jóvenes Investigadores en Neurociencias de Córdoba. 3 de abril 2009. En: [www.famaf.unc.edu.ar/neuro/2009/resumenes//Almeira.pdf](http://www.famaf.unc.edu.ar/neuro/2009/resumenes//Almeira.pdf) ult.rev 25/09/2010
- Alonso, J., Desmarchelier, C. “Plantas medicinales autóctonas de la Argentina”. Editorial Literatura of Latin America (L.O.L.A.), Buenos Aires, pág. 88-92, 2005
- Arvelija, C.,Walter, C. Antimicrobial agents deriving from indigenous plants. Recent Pat Food Nutr Agric 2(1): 83-92, 2010.
- Bandoni, A., Retta, D., Di Leo Lira, P., Baren, C . “¿Son realmente útiles los aceites esenciales? Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y Aromáticas 8 (5): 317-322, 2009.
- Benzi, V., Sanchez Chopa, C., Ferrero, A. “Comparación del efecto insecticida de dos especies de *Aloysia* sobre *Rhizopertha dominica*. Trabajo presentado en el 1ª Congreso Internacional de Farmacobotánica. Chillán, Chile. Enero de 2009. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y aromáticas 8(2): 150-153, 2009. En: [www.blacpma.org](http://www.blacpma.org) últ.rev 17/09/2010.
- Benzi, V., Murrayb, AP, Ferrero, AA. “Insecticidal and insecto-repellent activities of Essentials oils from Verbenaceae and Anacardiaceae against *Rhizopertha dominica*.” Nat. Prod. Commun 4 (9):1287-90, 2009.
- Burdyn, L., Luna, C., Tarragó,J., Sanberro, P., Dudit, N., Gonzalez, A., Mroginsky,L. “Direct shoot regeneration from leaf and internode explants of *Aloysia polystachya* (Gris.) Mold. (Verbenaceae). In Vitro Cell. Biol-Plant: 42: 235-239, 2006.

- Cano, C.G. Biotecnología y propiedad intelectual en el agro. Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural, Bogotá 2004. En: <http://www.cenired.org.co>. Ultima rev. 03/09/10.
- Capasso F., T. Gaginella, G. Grandolini & A.A. Izzo. *Phytotherapy*. Springer-Verlag Berlín Heidelberg. 2003.
- Consolini A.E, Ragone M.I., Tambussi A, Paura A. “Estudio observacional del Consumo de Plantas Medicinales en La Provincia de Buenos Aires, Argentina, en el periodo Diciembre de 2004-Noviembre de 2005”. *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (6): 924-36, 2007.
- Consolini, A.E., Ragone, M.I., Migliori, G.N., Conforti, P., Volonté, M.G. “Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice.” *Journal of Ethnopharmacology* 106, 90-96, 2006.
- De Sousa, D.P, Genival, A., Andrade, L., Calasans, F., Nunes, X., Barbosa, J., Batista, J. “Structure and spasmolytic activity relationships of monoterpene analogues found in many aromatic plants”. *Z. Naturforsch*, 63: 808-812, 2008.
- Duarte, MC., Leme, EE., Delarmelina, C., Soares, AA., Figueira, GM., Sartoratto, A. “Activity of Essentials oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*”. *J Ethnopharmacol.* 111(2):197-201, 2007.
- Duarte, MC, Figueira, GM., Sartoratto, A., Rehder, VL, Delarmelina C. “Anti-Cándida activity of Brazilian medicinal plants.” *J Ethnopharmacol.* 97(2): 305-11, 2005.
- Emendorfer, F., Emendorfer, F., Bellato, F., Noldin, V.F., Niero, R., Cechinel-Filho, V., Cardozo, A.M. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8, 63-68, 2005.
- Fester, G., Martinuzzi, E., Retamar, J., Ricciardi, A. “Aceites esenciales de la República Argentina”. pág: 40-41, 1961.
- García, C.C., Talarico, L., Almeida, N., Colombres, S., Duschatzky, C., Damonte, E.B., “Virucidal activity of esencial oils from aromatic plants of San Luis, Argentina.” *Phytother Res.* 17(9): 1073-5, 2003.
- Gharzouli K and Holzer P. Inhibition of guinea pig intestinal peristalsis by the flavonoids quercetin, naringin, apigenin and genistein. *Pharmacology* 70: 5-14, 2004.
- Gleiser RM, Bonino MA, Zygadlo JA. “Repellence of esencial oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti*”. *Parasitol Res.* 14 , 2010. (epub ahead of print)
- Goncalves JCR, Sousa Oliveira F, Benedito RB, de Sousa DP, Almeida RN, Araujo DAM. Antinociceptive activity of (-)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. *Biol. Pharm. Bull* 31(5): 1017-1020, 2008.
- Gorzalczany S, Sülsen V, Redko F, Vescina C, Muschietti L., Martino V, Acevedo C. Choleric and antispasmodic effects of *Lippia integrifolia* aqueous extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18(1): 16-20, 2008.

- Gupta, M.P. 270 *Plantas Iberoamericanas*, Ed. Presencia, Colombia. 1995.
- Gutiérrez Gaitén YI, Miranda Martínez M, Varona Torres N, Tania Rodríguez A. Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en psidium guajaba, L. *Rev Cubana Farm* 34(1): 50-5, 2000.
- Hellion-Ibarrola, MC., Ibarrola, DA., Montalbetti, Y., Kennedy, ML., Heinichen, O., Campuzano, M., Ferro, EA., Alvarenga, N., Tortoriello, J., De Lima, TC., Mora, S. "The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice". *Phytomedicine* 15 (6-7): 478-83, 2008.
- Hellion-Ibarrola, MC., Ibarrola, DA., Montalbetti, Y., Kennedy, ML., Heinichen, O., Campuzano, M., Tortoriello, J., Fernández, S., Wasowski, C., Marder, M., De Lima, TC., Mora, S. "The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice". *J Ethnopharmacol.* 105(3): 400-8, 2006.
- Hister, C.A., Laughinghouse, H.D., Da Silva, C.B., Dorow, T.S., Tedesco, S.B. "Evaluation of the antiproliferative effect of infusions and essential oil of *Aloysia gratissima*." *Pak J Biol Sci.* 12(24):1581-4, 2009.
- Izquierdo, J. *Hacia una agricultura sustentable: las alternativas de las ciencias de la vida y de la biotecnología.* ISBN 987-521-138-9 Ediciones Instituto Nacional de tecnología Agropecuaria.sección -Sección I, cap 1, pág. 17, 1998.
- Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Amano, K-I., Harada, K-I., Miyamoto, S., Nakazawa, H., Won, K-J., Sato, K., 1997. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacological Reviews* 49 (2), 157-230.
- Karamenderes, C., Apaydin, S., 2003. Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp. *sipylea* (O. Schwarz) Bassler on the rat isolated duodenum. *Journal of Ethnopharmacology* 84, 175-179.
- Kenakin, T.P., 1984. The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacological Reviews* 36 (3), 165-222.
- Lahitte, H.B., J.A. Hurrell, M.J. Belgrano, L.S. Jankowski, P. Haloua, & K. Mehlreter. *Plantas medicinales rioplatenses.* Edit. Literatura of Latin America (L.O.L.A.), Buenos Aires. 1998.
- Livingstone E; Livingstone S. 1970. *Pharmacological experiments on isolated preparations.* Department of Pharmacology, University of Edinburgh, Edinburgh, 2d edition.
- López, A.G., Theumer, M.G., Zygadlo, J.A., Rubinstein, H.R. 2004. "Aromatic plants Essential oils activity on *Fusarium verticilloides* Fumonisin B(1) production in corn grain". *Mycopathología* 158(3):343-9
- Marelli, H. *La erosión hídrica área suelos y Producción Vegetal.* 2004. INTA Marcos Juárez-Córdoba En: [http://www.INTA.gov.ar/suelos/er\\_hidrica04res.htm](http://www.INTA.gov.ar/suelos/er_hidrica04res.htm) últ.rev 04/09/10

- Martinez Crovetto, R. Plantas utilizadas en medicina en el noroeste de Corrientes. Fund.Miguel Lillo. Tucumán, pp.139, 1981.
- Marzocca, A. *Vademecum de malezas medicinales*. Ed. Orientación gráfica, Buenos Aires. 1997.
- Millet, Y., Jourglard, J., Steinmetz, M., Tognetti, P., Joanny, P., Arditti, J. "Toxicity of some essentials plant oils". Clinical and experimental study. Clin. Toxicol. 18:1485-1498; 1981.
- Mora, S., Díaz-Véliz, G., Millán, R., Lungenstrass, H., Quirós, S., Coto-Morales, T., Hellion-Ibarrola, MC. "Anxiolytic and antidepressant-like effects of hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats." Pharmacol Biochem Behav. 82 (2):373-8, 2005.
- Nocerino E, Izzo AA, Borrelli F, Capasso F, Capasso R, Pinto A, Sautebin L, Mascolo N. Relaxant effect of capsazepine in the isolated rat ileum. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 365(3): 187-92, 2002.
- Nunes da Silva, D. "Extração supercritica de plantas aromaticas e medicinais" SBU. Biblioteca digital da Unicamp. 2008. En: [www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver) ult rev 24/09/2010.
- Nunes da Silva, D. "Extração supercritica de plantas aromaticas e medicinais (Lavanda brasileira-*Aloysia gratissima*, Quebra pedra(*Phyllanthus amarus*) e Ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculada*):dados experimentais, composição e avaliação da atividade biologica." [http://biblioteca.universia.net/HTML\\_bura/ficha/params/id/51024636.html](http://biblioteca.universia.net/HTML_bura/ficha/params/id/51024636.html). Ultima revisión: 08/11/2010.
- Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology 76, 201-214, 2001.
- Pensiero, J. & Gutierrez, H." Proyecto Bosques Nativos y Areas protegidas."B.I.R.F. En: [www.ambiente.gov.ar](http://www.ambiente.gov.ar) Ult. Rev: 07/08/10
- Ragone, MI, Sella, M., Conforti, P., Volonté MG, Consolini AE. "The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum." J Ethnopharmacol. 113(2):258-66, 2007.
- Ragone M.I., Sella M., Pastore A., Consolini A.E. "Sedative and cardiovascular effects of *Aloysia citriodora*, Palau on mice and rats". Latin American Journal of Pharmacy 29 (1): 79-86, 2010.
- Ricciardi, G., Van Baren, C., Di Leo Lira, P, Ricciardi, A., Bandoni,A. "El aceite esencial de *Aloysia gratissima* Tronc de la provincia de Corrientes." En: [www.idecefyn.com.ar/clf12002/archivos/093\\_BandoniAL\\_R.doc](http://www.idecefyn.com.ar/clf12002/archivos/093_BandoniAL_R.doc) , ult rev:08/11/2010
- Ricciardi, G., Torres, A., Agrelo de Nassiff, A., Ricciardi,A., Van Baren, C.Bandoni, A."Examen del aceite esencial de "niño rupá" *Aloysia gratissima* var.*gratissima* (G & H.) UNNE. UBA, 2002. En: [www.unne.edu.ar/cyt/2002/08-Exactas/E-018.pdf](http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/08-Exactas/E-018.pdf) ult.rev.17/09/2010

- Ricciardi, A.,L., Lorenzo, D., Dellacassa, E., Ricciardi, A. Impacto de los componentes quirales en el aceite esencial de *Aloysia gratissima*.var.gratissima del Nordeste argentino. IX Simposio Argentino y XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. Sección Farmacognosia y Farmacoquímica. Bol. Latinoam. Caribe Plant.Med.Aromaticas 6(5): 44, 2007. En: [www.uv.es/prietojm/.../BLACPMA-v6-N5-Farmacognosia.pdf](http://www.uv.es/prietojm/.../BLACPMA-v6-N5-Farmacognosia.pdf). Ult.rev 10/09/2010
- Ringuelet, J., Cerimele, E., Ré, M.S., Henning, C., Barreyro, R., Arango, C., “Primera jornada sobre cultivos aromáticos”. Proyecto de extensión “Producción de especies aromáticas como alternativa agroindustrial”.Estación experimental Hirschhorn. Facultad de Ciencias Agrarias. Agosto, 2004. UNLP.
- Sadraei H., Ghannadib A., Malekshahi K.. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. Fitoterapia 74: 445–452, 2003.
- Santos, E., Umpierrez, M., Gonzalez, A., Mendoza, Y., Ramallo, G., Diaz-Cetti, S., Rossini, C. “Essential oils from uruguayan native plants against *Varroa destructor*”. Chemical characterization and bioactivity. Poster bee-health 2009. Congreso Apimondia 2009. En: [www.apimondia.org](http://www.apimondia.org). Ult. Rev: 07/08/10
- Schwambach, K.H. Utilização de plantas medicinais e medicamentos no autocuidado do município de Teutônia, RS. Univ.Fed.do Rio Grande do Sul. 2007. En: [www.bibliotecadigital.ufrgs.br/](http://www.bibliotecadigital.ufrgs.br/) ult.rev 11/09/2010
- Sersic, A., Cocucci, A., Benitez-Vieyra, S., Cosacov, A., Díaz, L., Glinos, E., Grosso, N., Lazarte, C., Medina, M., Moré, M., Moyano, M., Nattero, J., Paiaro, V., Trujillo, C., Wiemer, P. “Flores del centro de Argentina, una guía ilustrada para conocer 141 especies típicas”. pág: 326-334, 2006.
- Shamsa F, Ahmadiani A, Khosrokhavar R. Antihistaminic and anticholinergic activity of barberry fruit (*Berberis vulgaris*) in the guinea-pig ileum. J. Ethnopharmacol. 64: 161-166, 1999.
- Sharapin, N. “Materias primas vegetales para la industria de productos fitoterapéuticos”. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. CYTED (Ciencia y tecnología para el desarrollo). Bogotá, Colombia. 2000 pág 16-26
- Soler, E., Dellacassa, E., Moyna, P. “Composition of *Aloysia gratissima* flower esencial oil1” .Planta Med 52(6): 488-90, 1986.
- Soraru, S. & A. Bandoni. *Plantas de la medicina popular argentina*. Editorial Albatros, Buenos Aires. 1978.
- Van der Brink, F.G., 1977. General theory of drug-receptor interactions. Drug-receptor interaction models. Calculation of drug parameters. In: Van Rossum, J.M. (Ed.), Kinetics of Drug Action, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp 169-254.
- Wagner, H y Bladt, S. (1995) Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer-Verlag, Berlin, Germany

- Wasowski, C., Marder, M. “Central nervous system activities of two diterpenes isolated from *Aloysia virgata*”. *Phytomedicine* 2010 oct 29 (epub ahead of print)
- Werdin González, J.O, Gutierrez, M.M, Murray, A.P, Ferrero, A.A. “ Biological activity of Essentials oils from *Aloysia polystachya*, and *Aloysia citriodora* against the Soybean Pest *Nezara viridula*.”. *Natural Product Communications* 5 (2): 301-306, 2010.
- WHO. *WHO Monographs on selected medicinal plants*. Geneva. WHO, 1999.
- Zamorano-Ponce, E., Fernández, J., Vargas, G., Rivera P., Carballo,MA. “Protective activity of cedrón (*Aloysia triphylla*) infusión over genetic damage induced by cisplatin evaluated by the comet assay technique”. *Toxicol Lett.* 152(1):85-90, 2004.
- Zumelzú, G., Darré,C., Novo,R. “Control de malezas en té de burro *Lippia polystachia* Griseb.con herbicidas pre y post emergentes”.*Anales de SAIPA-Sociedad Argentina para la investigación de Productos Aromáticos. IX Congreso Nacional de Recursos Naturales aromáticos y Medicinales. Córdoba XVI: pp. 91-96, 2000.*
- Zaho P, Huang X, Wang Z, Qiu Z, Ham Y, Lu H, Kim Y, Xu W. Dual effect of exogenous hydrogen sílfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 616: 223-228, 2009.

Otra fuentes consultadas:

- “Alternativas de sustentabilidad del bosque nativo del espinal” Proyecto Bosques Nativos y áreas protegidas BIRF 4085 AR. Univ.Nac. de Entre Ríos, Córdoba y el Litoral. En: <http://medioambiente.gov.ar> últ rev 14/07/2010.
- SIB- [http://www.sib.gov.ar/ficha/PLANTAE\\*aloyisia\\*gratissima](http://www.sib.gov.ar/ficha/PLANTAE*aloyisia*gratissima). 13/07/2010.