

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



Mutagénesis y antimutagénesis
en extractos acuosos, clorofórmicos y acetónicos de
Ilex paraguariensis var. *paraguariensis* e
Ilex dumosa var. *dumosa*

Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos

Bioq. Carolina Buduba

2011

Directora de Tesis
Dra. Leda Giannuzzi

Co-directora de Tesis
Dra. Etile Spegazini

Realizada en la Cátedra de Toxicología de la Facultad de Ciencias Exactas,
UNLP, La Plata, Argentina.

Mutagénesis y antimutagénesis en extractos acuosos, clorofórmicos y acetónicos de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var. *dumosa*

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A mi Directora de Tesis, Dra. Leda Giannuzzi, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A mi Co-directora de Tesis, Dra. Etilé Spegazini por facilitarme las hojas de las plantas de *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa* utilizadas y brindarme el apoyo técnico necesario para conocer las características de las mismas.

A mi esposo Andrés por su cariño, comprensión y constante estímulo.

A mi hijos, Marina, Sofía y Martín por su paciencia y por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría.

A mis padres por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

INDICE

| Contenidos | Pág. |
|--|------|
| 1. Resumen general..... | 1 |
| 2. Introducción | |
| 2.1. El origen de la yerba mate..... | 6 |
| 2.1.1. Reseña histórica..... | 7 |
| 2.1.2. Características de la planta de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> | 11 |
| 2.1.2.1. Morfología externa..... | 11 |
| 2.1.2.2. Morfología interna..... | 13 |
| 2.2. Condiciones vegetativas y cultivo..... | 14 |
| 2.2.1. Región de origen, suelo y clima..... | 14 |
| 2.2.2. El cultivo..... | 14 |
| 2.3. Transformación primaria..... | 16 |
| 2.3.1. Cosecha (corte y quiebra)..... | 16 |
| 2.3.2. Elaboración..... | 17 |
| 2.3.2.1. Sapecado..... | 18 |
| 2.3.2.2. Secado..... | 19 |
| 2.3.2.3. Canchado..... | 21 |
| 2.3.2.4. Molienda..... | 22 |
| 2.4. Cadena Agroalimentaria..... | 24 |
| 2.5. Comercialización..... | 25 |
| 2.6. Mercados..... | 25 |
| 2.6.1. Mercado externo..... | 25 |
| 2.6.2. Mercado interno..... | 30 |
| 2.7. Composición química de la planta de <i>Ilex paraguayensis</i> | 30 |
| 2.7.1. Polifenoles..... | 30 |
| 2.7.1.1. Flavonoides..... | 31 |
| 2.7.1.2. Cafeoil derivados..... | 32 |
| 2.7.2. Xantinas..... | 33 |
| 2.7.3. Saponinas..... | 35 |
| 2.7.4. Minerales..... | 36 |
| 2.8. Código Alimentario Argentino e <i>Ilex paraguariensis</i> | 37 |
| 2.9. Adulterantes de yerba mate..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 2.10. Características de la planta de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | 39 |
| 2.10.1. Morfología externa..... | 39 |
| 2.10.2. Morfología interna..... | 40 |
| 2.10.3. <i>Ilex dumosa</i> y el Código Alimentario Argentino..... | 40 |
| 2.11. Yerba mate: Actividad biológica y efectos a la salud..... | 45 |
| 2.11.1. Capacidad antioxidante..... | 45 |
| 2.11.2. Control de peso y obesidad..... | 48 |
| 2.11.3. Protección dental..... | 49 |
| 2.11.4. Efectos de la cafeína en el mate..... | 49 |
| 2.11.5. Actividad mutagénica y genotóxica..... | 49 |
| 2.11.5.1. Determinación <i>in vitro</i> de mutagenicidad: Ensayo de <i>Salmonella</i> (Test de Ames)..... | 49 |
| 2.11.5.2. Test de Ames y la actividad antimutagénica..... | 52 |
| 2.11.5.3. Determinación <i>in vivo</i> del efecto clastogénico de los compuestos: Ensayo de Micronúcleo..... | 54 |
| 2.11.5.4 Mutagenicidad y genotoxicidad en <i>Ilex paraguariensis</i> | 56 |
| 2.11.6. Asociación de <i>Ilex paraguariensis</i> con carcinogénesis..... | 57 |
| 2.11.6.1. Prevención del cáncer..... | 57 |
| 2.11.6.2. Estudios epidemiológicos..... | 58 |
| 2.12. Investigación de extractos de <i>Ilex paraguariensis</i> e <i>Ilex dumosa</i> | 63 |
| 2.13. Hipótesis de trabajo..... | 64 |
| 3. Objetivos | |
| 3.1. Objetivo general..... | 65 |
| 3.2. Objetivo específico..... | 65 |
| 4. Materiales y Métodos | |
| 4.1. Extractos de hojas de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> e <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | 66 |
| 4.1.1. Cultivares..... | 66 |
| 4.1.2. Preparación de extractos..... | 66 |
| 4.2. Ensayo de mutagenicidad con <i>Salmonella typhimurium</i> (Prueba de Ames) en <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> e <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | 70 |
| 4.2.1. Material Biológico..... | 70 |
| 4.2.1.1. Cepas de ensayo..... | 70 |
| 4.2.1.2. Fracción de homogenato de hígado de ratón S9 mix..... | 72 |

| | |
|--|-----|
| 4. 2.2. Métodos..... | 72 |
| 4.2.2.1. Obtención y conservación de las cepas..... | 72 |
| 4.2.2.2. Verificación de las características genotípicas de las cepas..... | 74 |
| 4.2.2.3. Determinación de la correlación entre el valor de densidad óptica medido a 650 nm y el recuento de cada cepa en UFC.mL ⁻¹ (TA98 y TA100)..... | 79 |
| 4.2.2.4. Procedimiento para la obtención de cultivos en fase estacionaria..... | 80 |
| 4.3. Ensayo de toxicidad..... | 82 |
| 4.4. Ensayo de antimutagenicidad con <i>Salmonella typhimurium</i> (Prueba de Ames) en <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> e <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | 84 |
| 4.5. Ensayo de Micronúcleo..... | 86 |
| 4.5.1. Material Biológico: Grupo experimental..... | 86 |
| 4.5.2. Selección de los niveles de dosis del extracto de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> e <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> . administrados a los ratones..... | 88 |
| 4.5.3. Interpretación de Resultados..... | 91 |
| 4.5.4. Análisis de Datos..... | 92 |
| 4.5.5. Criterios de Positividad..... | 92 |
| 4.6. Material de Laboratorio..... | 95 |
| 4.6.1. Reactivos y Soluciones..... | 95 |
| 4.6.2. Material y Equipamiento de laboratorio..... | 97 |
| 5. <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> | |
| 5. 1. Ensayo de Salmonella Microsoma en yerba mate..... | 99 |
| 5.1.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> | 101 |
| 5.1.1.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin activación metabólica..... | 101 |
| 5.1.1.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, con activación metabólica..... | 107 |
| 5.1.1.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> , sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin y con activación metabólica..... | 110 |
| 5.1.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> | 127 |

| | |
|--|-----|
| 5.1.2.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin activación metabólica..... | 127 |
| 5.1.2.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, con activación metabólica..... | 133 |
| 5.1.3.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> , sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin y con activación metabólica..... | 139 |
| 5.1.3. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> | 146 |
| 5.1.3.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin activación metabólica..... | 147 |
| 5.1.3.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, con activación metabólica..... | 150 |
| 5.1.3.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> , sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin y con activación metabólica..... | 154 |
| 5.1.4. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en los extractos acuoso, clorofórmico y acetónico de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> , sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin y con activación metabólica..... | 158 |
| 5.2. Mutagenicidad <i>in vivo</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> : Ensayo de inducción de Micronúcleos en médula osea de ratón..... | 160 |
| 5.3. Antimutagenicidad en <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> | 180 |
| 6. <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | |
| 6. 1. Ensayo de Salmonella Microsoma en <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | 182 |
| 6.1.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | 183 |
| 6.1.1.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin activación metabólica..... | 183 |

| | |
|--|-----|
| 6.1.1.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, con activación metabólica..... | 184 |
| 6.1.1.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> , sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin y con activación metabólica..... | 185 |
| 6.1.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | 187 |
| 6.1.2.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin activación metabólica..... | 188 |
| 6.1.2.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, con activación metabólica..... | 191 |
| 6.1.2.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> , sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin y con activación metabólica..... | 192 |
| 6.1.3. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | 195 |
| 6.1.3.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin activación metabólica..... | 195 |
| 6.1.3.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, con activación metabólica..... | 212 |
| 6.1.3.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> , sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin y con activación metabólica..... | 199 |
| 6.1.4. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en los extractos acuoso, clorofórmico y acetónico de <i>dumosa</i> var. <i>dumosa</i> , sobre las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100, sin y con activación metabólica | 204 |
| 6.2. Mutagenicidad <i>in vivo</i> de <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> : Ensayo de inducción de Micronúcleos en médula osea de ratón..... | 209 |
| 6.3. Antimutagenicidad en <i>Ilex dumosa</i> var. <i>dumosa</i> | 212 |
| 7. Conclusiones..... | 214 |

| | |
|--|-----|
| 8. Bibliografía..... | 219 |
| 9. Anexos | |
| 9.1. Anexo 1: Soluciones y Medios de Cultivo para el ensayo Salmonella Microsoma..... | 243 |
| 9.2. Anexo 2: Soluciones para el ensayo de Micronúcleo..... | 248 |

1. Resumen General

Las infusiones de hierbas son de gran popularidad en nuestro medio, siendo una de las más corrientes, la de *Ilex paraguariensis*, comúnmente conocida como mate.

Diariamente el consumo de altos volúmenes de esta bebida caliente (mate), preparada con hojas secas de yerba mate resulta ser habitual en Argentina y en otros países como Uruguay, Paraguay y sur de Brasil.

A esta infusión se le han atribuido propiedades beneficiosas como colerético, hipocolesterolémico, antioxidante, hepatoprotector, diurético, controlador del peso y la obesidad, protector dental, entre otras.

Sin embargo, algunos estudios epidemiológicos sugieren una asociación entre consumo indiscriminado de infusiones de *Ilex paraguariensis* y el aumento de riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer como el esofágico, oral, pulmonar, de vejiga, renal y otros de cabeza y cuello. Estudios adicionales realizados sobre yerba mate demostraron que la misma contiene sustancias genotóxicas y mutagénicas, presentando también actividad clastogénica en cultivos de células humanas. Estas investigaciones han sido realizadas sobre el extracto acuoso de la planta entera, pudiendo contener una fracción compleja de nutrientes, antinutrientes y tóxicos potenciales como constituyentes de la misma. No se encuentran datos en la bibliografía sobre efectos mutagénicos y/o antimutagénicos en extractos orgánicos de la hierba realizados en distintos solventes orgánicos (cloroformo, acetona).

Además resulta muy frecuente en nuestro medio la adulteración de *Ilex paraguariensis* con otras variedades de *Ilex*, algunas de las cuales traen trastornos a la salud como cólicos, diarreas y dolor estomacal. *Ilex dumosa* es uno de los adulterantes más comunes utilizados. Esta planta presenta características potencialmente convenientes desde el punto de vista industrial, como un bajo o nulo contenido en cafeína y xantinas. Además, *Ilex dumosa* fue incorporada al Código Alimentario Argentino en el año 2006 como hierba para infusiones.

Debe destacarse que la especie *Ilex dumosa* ha sido estudiada escasamente en cuanto a sus componentes químicos y sus acciones farmacológicas.

El presente trabajo tuvo por finalidad investigar los posibles efectos mutagénicos y antimutagénicos de dos variedades de *Ilex* (*Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var. *dumosa*) empleadas corrientemente en la elaboración de infusiones utilizando ensayos de mutagenicidad *in vitro* (Ensayo de Salmonella microsoma) e *in vivo* (Test de Micronúcleo).

Se trabajó con *Ilex paraguariensis* St Hil. var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* Reissek var. *dumosa*, ejemplares frescos provenientes de la Estación Experimental del INTA Cerro Azul (Misiones).

Se prepararon extractos acuosos a partir de la infusión empleando 5g de hojas secas trituradas de *Ilex* en 70 ml de agua a 80°C. Se filtraron y llevaron a volumen de 100 ml. Luego se liofilizaron y se conservaron congelados hasta el momento del ensayo. Para la obtención de los extractos orgánicos se partió de 120 g de hojas secas trituradas de ambas plantas y se realizaron extracciones sucesivas con cloroformo. El polvo remanente fue sometido a extracciones sucesivas con acetona. Luego los extractos secos se conservaron congelados hasta el momento del ensayo. Los extractos acuosos se solubilizaron en agua destilada y los orgánicos en dimetilsulfóxido (DMSO), solvente compatible con el ensayo de mutagenicidad. La investigación de la mutagenicidad y antimutagenicidad de los extractos se realizó según el procedimiento descrito por Maron y Ames (1983) con preincubación, utilizando cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 (sensible a mutágenos que cambian el marco de lectura) y TA100 (sensible a mutágenos que producen sustituciones de pares de bases). Estas cepas han demostrado ser las de mayor sensibilidad para sustancias químicas. El ensayo se realizó con y sin activación metabólica, cofactores y solución reguladora.

Los ensayos realizados con el test de Ames indicaron que en el extracto acuoso de la hoja de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* habría sustancias que inducen la actividad mutagénica en el ensayo de *Salmonella* por el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, sin y con activación metabólica. La activación metabólica tendría un efecto desactivador de la acción mutagénica en el rango de concentraciones estudiadas (4.50 a 20.00 mg/placa). La mutagenicidad observada en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*, sin y con activación metabólica podría ser causada por diversos compuestos presentes en la planta como ser: los compuestos cafeoil derivados siendo el principal exponente el ácido clorogénico en conjunción con la alta concentración de Mn^{+2} , así como a otros flavonoides y a la cafeína presentes en el extracto. La acción mutagénica podría producirse mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). La alta solubilidad de la cafeína en cloroformo, sugiere que este compuesto puede estar concentrado en el extracto clorofórmico, justificando así el efecto mutagénico observado en este extracto a baja concentraciones (0.45 a 4.50 mg/placa).

En el extracto clorofórmico de la hoja de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* también se observó actividad mutagénica por el mecanismo de sustitución de pares de bases sin y con activación metabólica. La presencia de S9 mix aumentó el efecto mutagénico en el rango de concentración estudiado (4.50 a 45.00 mg/placa). Esta acción podría deberse a la presencia de compuestos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos como el benzo[a]pireno y el fluoranteno provenientes del procesamiento de la planta.

También se encontró actividad mutagénica en el extracto acetónico por el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, sin y con activación metabólica. La activación metabólica generó un aumento en el efecto. Estos resultados podrían ser causados por la presencia de compuestos de tipo flavonoides como la quercetina y el kaemferol presente en yerba mate. El aumento de actividad mutagénica en presencia de S9 mix, podría deberse a la biotransformación del kaemferol a quercetina a través del sistema P450 (CYP) mono-oxigenasa.

Los resultados hallados en el extracto acuoso de la hoja de *Ilex dumosa var. dumosa* no mostraron sustancias que induzcan la actividad mutagénica en el ensayo de Ames sin y con activación metabólica por el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, para los rangos de concentración estudiados (0.45 a 45 mg por placa). La baja concentración de cafeoil derivados, flavonoides y cafeína en esta planta (un orden de magnitud menor que en *Ilex paraguariensis var. paraguariensis*) apoyaría este hallazgo.

Se observó mutagenicidad en el extracto clorofórmico únicamente sin activación metabólica en el rango de 15.00 a 45.00 mg/placa. Este hallazgo podría deberse a la presencia de cafeína en este extracto.

Los estudios realizados en el extracto acetónico de la hoja de *Ilex dumosa var. dumosa* indicaron que habría sustancias que inducen la actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella Microsoma sin y con activación metabólica por el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura. Se atribuyó este efecto a la presencia de flavonoides como la quercetina, rutina y el kaempferol y a la presencia de taninos en el extracto que puedan estar asociados saponinas características de la planta. Se observó un efecto de desactivación de la mutagenicidad en presencia de S9 mix. Se planteó la acción reparativa de los taninos por medio del mecanismo de escisión en el ADN dañado en presencia del proceso de metabolización.

Frente a la evidencia de sustancias mutagénicas presentes en los extractos de ambas plantas, no se realizaron ensayos de antimutagenicidad.

Los resultados hallados en los ensayos *in vitro*, donde se encontró mayor mutagenicidad en el extracto clorofórmico de yerba mate, permitieron elegir dicho extracto para la realización del ensayo *in vivo* (Test de micronúcleo) en ambas plantas.

En el ensayo de Micronúcleo, se trabajó con ratones swiss machos de 10 semanas de edad, de aproximadamente 30 gramos de peso, que fueron distribuidos en 8 grupos de 5 animales. Se utilizó la vía intraperitoneal (i.p.) como vía de administración.

Un grupo se utilizó como control positivo y otro como control negativo. El control positivo fue inyectado con Ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.). El control negativo fue inyectado con solución isotónica de NaCl al 0.9%. Como vehículo se empleó aceite de maíz virgen.

Se inyectaron tres grupos de ratones con dosis crecientes de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (500, 1000 y 2000 mg/kg p.c.). Los tres restantes grupos de ratones se inyectaron con las mismas concentraciones de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa*. La administración se realizó a través de 5 aplicaciones separadas unas de otras por un tiempo de 24 hs. Pasado el período de tratamiento, se realizó el sacrificio 24 hs después de la última aplicación por dislocación cervical en previa atmósfera de éter. Se separaron los fémures de cada ratón para obtener su médula ósea, y se hicieron extendidos de sus células tñiéndolas con Giemsa al 5%. El material en los portaobjetos se observó mediante un microscopio óptico de campo claro con un aumento de 1000X.

La mutagenicidad *in vivo* fue evaluada mediante la presencia de eritrocitos policromáticos micronucleados los cuales fueron contados visualmente sobre 2000 eritrocitos policromáticos por animal (PCEs). Para evaluar el efecto citotóxico del tratamiento sobre la médula ósea, se determinó la relación PCE/NCE (NCE, eritrocitos normocromáticos) en la misma muestra, donde se contaron un mínimo de 500 eritrocitos por animal.

Se encontró un aumento significativo en el número de eritrocitos policromáticos micronucleados para el grupo de ratones inyectados con 2000 mg/kg p.c. de extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, mostrando un efecto clastogénico al observarse micronúcleos pequeños. No se observaron cambios en la relación PCE/NCE respecto del control negativo indicando que el blanco de acción mutagénica no sería la eritropoyesis en la médula ósea. Se atribuyó el aumento en el número de micronúcleos observados en los ratones inyectados con la mayor concentración a la alta concentración de cafeína presente en el extracto clorofórmico.

No se encontraron indicios de actividad clastogénica o aneuploidogénica en los eritrocitos policromáticos de los ratones inyectados con extracto clorofórmico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, indicando que el mismo no mostró mutagenicidad *in vivo* en las concentraciones estudiadas. Esto podría deberse a que el extracto clorofórmico de la planta contendría cafeína en una menor concentración.

2. Introducción

2.1. El origen de la yerba mate

El origen de la yerba mate, como tantos otros productos naturales, se encuentra en numerosas y emotivas leyendas argentinas. Esas leyendas, ritos y tabúes, legadas de padres a hijos, reglan aún hoy la labor cotidiana del autóctono cosechero de yerba mate.

Tariferos, gurúes y guainos, a cuyos antepasados debemos la tradición de la elaboración y consumo de la yerba mate, y en recuerdo también de los pioneros que reiniciaron el cultivo en nuestro país, se transcribe a continuación la leyenda de Caá-Yarîi, Diosa protectora de la yerba mate, que el escribano Aníbal Cambas, presidente de la Junta de Estudios Históricos de Misiones, en su libro "Leyendas Misioneras" relata así:

Cuenta la leyenda que una de las tribus se había detenido en las laderas de las sierras donde tienen sus fuentes el Tabay. Dejó después de una breve estadía el lugar, y siguió su marcha a través de las frondas. Un viejo indio no pudo seguir a los que partieron quedando en el refugio de la selva en compañía de su hija, Yarîi. Una tarde, llegó hasta la vivienda un extraño personaje, que por el color de su piel y por su rara indumentaria parecía no ser oriundo de esos lares. Arrimó el viejito del rancho un acutí¹ al fuego y ofreció su carne al desconocido visitante. El máspreciado plato de los guaraníes, el tambú², brindó también el dueño de casa a su huésped. Al recibir tantas demostraciones de hospitalidad, quiso el visitante, que no era otro que un enviado de Tupá³ recompensar a los moradores de la vivienda, proporcionándoles el medio para que pudieran siempre ofrecer agasajo a sus huéspedes, y para aliviar también las largas horas de soledad, en el escondido refugio situado en la cabecera del arroyo, e hizo brotar una nueva planta en la selva, nombrando a Yarîi, Diosa protectora, y a su padre, custodia de la misma, enseñándoles a "sapecar" sus ramas al fuego y a preparar la amarga y exquisita infusión, que constituiría la delicia de todos los visitantes de los hogares misioneros. Bajo la protección de la joven, que fue desde entonces CaáYarîi⁴ y bajo la severa vigilancia del viejo indio, que fue CaáYará⁵, crece la nueva planta, con cuyas hojas y tallos se prepara el mate, que es hoy genuina expresión de la hospitalidad.

¹ Acutí, roedor regional.

² Gusano de carne blanca y abundante, criado por el Guaraní en los troncos del pindó, que no solo proporciona su abundante carne, sino también un aceite muy codiciado, con él curaban algunos males, apuraban las digestiones y se precavían de los innumerables insectos de la selva.

³ Dios del bien.

⁴ y ⁵ Dioses protectores del Yerbal.

Algunos de estos textos han sido transcritos de la publicación que hiciera el Ministerio de Agricultura y Ganadería de la República Argentina en junio de 1971, con el Comité de Propaganda del Consumo de la Yerba Mate (CRIM).

2.1.1. Reseña histórica

El origen del uso de la yerba mate como alimento básico ya era conocido por los indios guaraníes como "caa-mate", "caa" significa en idioma guaraní "planta o hierba", en tanto que "mate", se supone derivado de la palabra quichua "matí" con lo que designaban a la calabaza que usaban para beber. Las bombillas que utilizaban eran hechas con diminutas cañas mediante las que sorbían la infusión.

Las virtudes que se le atribuyen hicieron que su consumo se difundiera en forma extraordinaria al punto de organizarse un intenso tráfico regular del producto, desde su zona de origen a todo el Virreinato del Río de la Plata.

Los jesuitas a fin de evitar las grandes distancias que los separaban de los lugares de producción, introdujeron el cultivo en algunas de sus "reducciones", o "misiones" distribuidas en la región que constituyen las provincias de Misiones, parte de Corrientes y parte del Paraguay.

Desde los tiempos del control comercial colonial por la corona española y posteriormente por los gobiernos de Paraguay, Argentina y Brasil que lidiaron por el dominio de los territorios de producción, la comercialización de la yerba mate estuvo sujeta a diferentes modos de regulación desde el poder estatal. Cuando a principios del siglo XX se reinicia su cultivo en nuestro país –cuya técnica se había perdido después de la expulsión de las misiones jesuíticas en 1768-, estas plantaciones son también fomentadas por el gobierno nacional que impulsó la colonización del territorio de Misiones entregando parcelas a inmigrantes extranjeros con la condición de plantar en ellas entre un 20 y un 75% -dependiendo del tamaño del predio- con yerba mate (CRYM, 1971). Fue además una decisión geopolítica del estado argentino de promover la ocupación de un espacio territorial fronterizo en el marco de la hipótesis de disputa hegemónica o de conflicto armado con Brasil – el perímetro de la provincia de Misiones tiene 900 km de frontera con Brasil, 300 km con Paraguay, y sólo 100 km con el resto del país- .

La depredación sistemática de los yerbales silvestres en el período previo y las recurrentes denuncias –que llegaron a cobrar estado parlamentario nacional (Barret, 1910; Niklison, 1914; Naboulet, 1917; Abos, 2002)- por las condiciones infrahumanas de explotación a los que fueron sometidos los mensúes (peones) en las llamadas “minas” yerbateras, hizo del cultivo a cargo de pequeños productores una alternativa mucho más atractiva: sostenible en el tiempo y más económica. El cultivo se expandió rápidamente al ritmo de la colonización, generando niveles de producción que entraron a competir con los intereses del puerto de Buenos Aires ligados a la importación histórica de yerba mate desde Brasil, en el marco de un

mercado interno cautivo pero limitado al crecimiento vegetativo de la población. La colonización yerbatera impulsada por el Estado, convirtió rápidamente a la actividad en la más importante económicamente de Misiones y marcó el comienzo de la declinación de la importación. En 1920, prácticamente todo el consumo nacional, unos 67 millones de kilos, era abastecido con yerba importada, de la cual una tercera parte era yerba elaborada en Brasil. En 1940, la importación se redujo al 30% del consumo –estimado en 106 millones de kilos- y fue prácticamente nula la importación de yerba molida. La producción nacional pasó de 1 millón de kilos en 1914, a 9 millones en 1924, alcanzó los 38 millones en 1930, hasta superar los 100 millones de kilos en 1937 con una superficie plantada de 70 mil hectáreas.

Se produce entonces la crisis que Bunge había preanunciado como "La cercana tragedia del mate": considerando el volumen producido en 1933 y el ritmo de plantación anual, estimó que en 1940 se alcanzaría un nivel de producción de 190 millones de kilos para un consumo nacional que apenas superaba los 100 millones (Bunge, 1934).

Primaron entonces los intereses importadores y de los molineros de yerba mate asentados en Rosario y Buenos Aires -casi todos capitales brasileros y paraguayos, apoyados por los exportadores pampeanos de trigo a esos países - que lograron limitar por ley la producción nacional manteniendo una cuota de importación y reservándose además los mercados de Uruguay, Chile, Bolivia y Perú (CFI, 1975; Bolsi, 1988).

Se creó así la Comisión Reguladora de la Yerba Mate (Ley N° 12.236, septiembre de 1935) con atribuciones para prohibir/autorizar nuevas plantaciones y establecer cupos de cosecha. Un año después se creó el Mercado Consignatario, que garantizaría un precio sostén.

Junto con la crisis aparecieron las primeras movilizaciones de los colonos reclamando por el precio y los cupos de producción, y generando además el primer hecho político represivo de resonancia nacional desde los tiempos del exterminio de peones en los yerbales silvestres del Alto Paraná: la llamada masacre de Oberá de 1936 (cruenta represión policial a una manifestación de colonos con sus mujeres y niños protestando contra la decisión política de limitar la producción de yerba y los abusos de los acopiadores privados de tabaco) (Waskiewicz 2005).

Tanto la oferta como la demanda de materia prima respondieron desde entonces a orientaciones precisas del poder público, para satisfacer un mercado doméstico que, luego de desarrollarse en forma dinámica hasta sustituir casi por completo la importación -década del 60-, acompañó el ritmo del crecimiento vegetativo de la población. En el marco de esas reglas económicas, con su intervención el Estado funcionaba como un garante de la "paz" social en

la actividad, posibilitando que el sector primario sostuviera su participación en la distribución de la “renta” yerbatera y regulando el avance del capital sobre la producción.

En 1966, al prohibirse la cosecha por exceso de producción, se prohibió además la importación de yerba mate, con la excepción de Paraguay, que en su condición de país de menor desarrollo relativo (acuerdos con la Asociación Latinoamericana de Libre Comercio, ALALC), obtuvo la concesión de un cupo anual de 5 mil toneladas de yerba canchada. Desde entonces la importación fue cayendo, hasta quedar limitada en la actualidad a aquellas operaciones con yerba “tipo uruguayo” para satisfacer la demanda de la colonia de residentes de ese país en Argentina.

Los reclamos del Movimiento Agrario de Misiones en los primeros años de la década del setenta, por lograr la incorporación en mayoría de los representantes de los productores al directorio de la Comisión Reguladora de la Yerba Mate (CRYM), nunca pudieron concretarse a pesar de una predisposición favorable del gobierno provincial de Irrazábal (1973) y de las autoridades nacionales durante las breves presidencias de Cámpora y Perón (1973/74). Estas aspiraciones se vieron definitivamente frustradas con el advenimiento de la dictadura militar, que persiguió y encarceló a la dirigencia agraria.

La mala cosecha del año 1987, llevó a autorizar como excepción la importación de más de 20 millones de kilos de yerba para compensar el déficit. El precio de la materia prima alcanzó en esos años un pico que no se volvería a repetir. Al compás de esa euforia por el "oro verde" se autorizaron nuevas plantaciones y se inició un exitoso programa de extensión para recuperar yerbales degradados y mejorar rendimientos con prácticas culturales y aumentando la densidad de plantas por hectárea: la Comisión Tripartita (productores, industria y gobiernos provinciales) para el Incremento de la Producción Yerbatera (1988-91) (Comisión Tripartita, 1991).

Se puede concluir entonces que la historia de la producción y comercialización de la yerba mate estuvo signada por la tutela del Estado desde sus inicios. Con sus maniobras y conflictos de intereses (plantaciones “en negro”, contrabando de palo, adulteración, prevaricato, intervenciones a la CRYM, legislación, etc), el mecanismo regulador posibilitó acompañar el crecimiento de la demanda interna, sustituir las importaciones y consolidar un interesante mercado de exportación en Siria y Líbano.

Toda esa rica experiencia de aciertos y errores, que le permitió al país convertirse en el primer productor y consumidor mundial de yerba mate y el más avanzado en todos los aspectos de la tecnología de cultivo y elaboración, sosteniendo al mismo tiempo un equilibrio

contemporizador entre los intereses del pequeño productor y los grandes molinos concentradores, fue desestimada en 1991 cuando se aprobó la desregulación.

El Decreto Nacional N° 2284 (Menem-Cavallo) de 1991, terminó así con más de 50 años de política económica yerbatera y provocó una rápida concentración de la renta del sector. Ocho empresas industriales con sus principales marcas: Las Marías (Taragüi), Molinos Río de la Plata (Nobleza Gaucha), Mate Larangeira Mendez (Cruz de Malta), Reñuk (Rosamonte), Martín y Cía (La Hoja), La Cachuera (Amanda), Llorente (La Tranquera), Gerula (Romance) y 3 cooperativas: Santo Pipó (Piporé), Colonia Liebig (Playadito) y Montecarlo (Aguantadora), concentraban en 1998 más del 70% del mercado y sólo las 3 primeras empresas el 50% (Secretaría de Agricultura, Pesca, Ganadería y Alimentos de la Nación, 1998). Parte de esa renta fue luego disputada por nuevos y poderosos actores que aparecieron en la cadena comercial durante la década del 90: los hipermercados. Esta puja impactó directamente en la presión hacia abajo de los precios pagados al productor y al tarefero (peón cosechero), hasta reducirlos al nivel de subsistencia (Gortari, 1997).

La crisis se manifestó con toda su crudeza a partir de 1997, cuando llegó a su tope la infiltración de volúmenes de yerba canchada hacia Brasil en el marco de los acuerdos comerciales del MERCOSUR y entraron en plena producción las nuevas plantaciones alentadas por la desregulación. El malestar social fue creciente: el precio neto del kilo de hoja verde recibido por el productor llegó a niveles irrisorios, comenzó la tala rasa de yerbales y su reemplazo por potreros, cultivos anuales o forestación, el valor de las chacras se desplomó promoviendo su enajenación a intereses especulativos forestales y agudizando el éxodo de la población rural a las ciudades.

En plena gestión neoliberal de Cavallo, esta vez ministro del gobierno de la Alianza (De La Rúa), los productores yerbateros organizaron una manifestación de protesta en la plaza central de Posadas, donde acamparon y permanecieron con sus tractores y otros equipos agrícolas aun más arcaicos por espacio de un mes (junio 2001). El eje del reclamo del “tractorazo” yerbatero fue la intervención de los gobiernos provincial y nacional a fin de establecer un acuerdo de precios para la materia prima (Gortari, 2001). Si bien se logró una mejora formal para el precio –sin ninguna garantía de control-, la movilización fue el prolegómeno de un proyecto de ley que se aprobó en el Congreso Nacional el 21 de febrero de 2002: la creación del Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) -Ley 25.564, Decreto Reglamentario N°1240/02. Cinco meses después, se reglamentó la ley a través del Decreto N° 1240, y el 19 de Julio de 2002 se realizó la primera reunión formal del Directorio. Debe destacarse que con el INYM se restablece la regulación de la actividad yerbatera, que cuenta con una historia de

más de cincuenta años, que se había discontinuado a fines de 1991 con la disolución y liquidación de la Comisión reguladora de la producción y el comercio de la yerba y el Mercado consignatario nacional de yerba mate canchada.

El objetivo principal del INYM es promover, fomentar y fortalecer el desarrollo de la producción, elaboración, industrialización, comercialización y consumo de la yerba mate y sus derivados en las diversas modalidades de usos y consumo. De esta forma procura lograr la sustentabilidad de todos los sectores involucrados con la actividad (trabajadores rurales, productores, secaderos, industriales) en conjunción con las cadenas de distribuidores y los consumidores, diseñando y ejecutando programas que mejoren la competitividad.

2.1.2. Características de la planta de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*

Científicamente se conoció la planta de yerba mate en Europa desde principios del siglo XIX con la denominación de "*Ilex theezans*" dada por Bonpland en 1821, en tanto que Saint Hilaire, en 1822, denominó "*Ilex paraguariensis*" en las "*Memoires du Muséum d'Histoire naturelle*" ó en su "*Histoire des plantes plus remarquables du Brasil et du Paraguay*" (1824) a la planta de yerba mate que encontrara en Curityba, usando esta denominación de especie en razón de que los antiguos historiadores españoles usaban para el adjetivo "paraguayo" la palabra latina "*paraguariensis*".

Tal denominación ha prevalecido sobre las de "*Ilex paraguayensis*", "*Ilex Mate*". "*Ilex paraguensis Lambert*", "*Ilex paraguaiensis Unger*", "*Ilex Curitibensis*".

Pertenece la yerba mate a la clase de las dicotiledóneas, dialipétalas corolianas, familia de las Aquifoliáceae, del género *Ilex* que comprende casi toda la familia (175 de las 181 especies) dispersas en toda Sudamérica.

2.1.2.1. Morfología externa

Planta originaria de la América del Sur, abunda en estado silvestre y en cultivo. Por lo general en el cultivo y explotación racional, por razones prácticas se mantiene su altura entre unos 3 a 4 metros presentando un corto tronco que se ramifica a escasa altura del suelo,-adquiriendo así, por sucesivas podas,- el aspecto de un pequeño arbusto.

En estado silvestre, en cambio, donde necesita unos 30 años para su desarrollo completo, alcanza alturas de hasta 12-16 metros, formándose un árbol cargado de hojas, de tronco recto de hasta 50-70 centímetros de diámetro, de corteza lisa y color grisáceo-ceniciento.

Sus hojas perduran en la planta unos tres años, son alternas coriáceas, de forma obovada, elípticas, con borde aserrado, resolutivo. Sus dimensiones difieren según las variedades, entre 5 a 10 y 15 centímetros de largo por 2 a 5 de ancho.

En estado de plena madurez son espesas, duras y lucientes como enceradas, de color verde más intenso en su cara superior que en la inferior presentando un corto pecíolo de color claro verdoso, a veces ligeramente rosado.

Su nervadura central y secundaria, se destaca netamente por su color amarillo verdoso en la cara superior de la lámina foliar, y por ser muy salientes en la cara inferior.

La floración, que tiene lugar entre los meses de octubre a diciembre, de tipo racimoso, en forma de falsas panojas, desarrollándose en las axilas de las hojas y en la base de las ramitas en número de 40 a 50 flores por racimo (Fig.2.1).

Sus flores son muy pequeñas, dioicas, con cáliz y corola de constitución tetrámera, aún cuando suelen encontrarse, sobre un mismo pie, ejemplares con 5 pétalos, de color blanquecino o pálido verdoso, con igual número de estambres (4 o 5) ubicados entre los intervalos de éstos, presentando, según sea su género, un gineceo normal o atrófico.

Después de la fecundación se desarrollan los frutos que consisten en una pequeña baya de unos siete milímetros de diámetro, que madura entre los meses de enero a marzo, adquiriendo un color azul oscuro o negro violáceo y coronado por un pequeño estigma más o menos saliente (Fig.2.2).



Figura 2.1: Flor y Pimpollo



Figura 2.2: Fruto de la yerba mate. Fuente: INYM

Cada fruto desecado tiene el aspecto de un grano de pimienta, contiene generalmente de 4 a 8 semillas de color amarillo pálido, ligeramente rugosas.

2.1.2. 2. Morfología interna

La epidermis superior de la lámina foliar se halla formada por células de contornos rectos, con abundantes estrías cuticulares, tricomas tectores y no presenta estomas.

La epidermis de la cara inferior presenta células de contornos levemente ondulados, tricomas tectores, los cuales se encuentran a nivel de las nervadura principal en ambas epidermis, muchos autores niegan la presencia de los mismos, lo que debe adjudicarse al manipuleo y los distintos tratamientos que sufre las hojas en el proceso de elaboración de la “yerba mate”, mientras que en el material fresco, recién herborizado se observan dichos tricomas. Estomas ciclocíticos e hidatodes o verrugas corchosas o lenticelas foliares abundantes, las mismas poseen valor diagnóstico y revisten importancia en el género *Ilex*.

En cuanto a los caracteres anatómicos, en corte transverso se advierte una estructura dorsiventral o bifacial, o sea constituida por dos hileras de células de igual tamaño y una tercera más corta de parénquima en empalizada hacia la epidermis superior y un parénquima lagunoso braciforme hacia la epidermis inferior, cutícula gruesa y ornamentada en ambas epidermis. Presencia de idioblastos cristalíferos “drusas” en la tercera capa de empalizada.

El sistema vascular de la nervadura principal, es un haz anfigasal rodeado de una vaina esclerenquimática.

La epidermis superior es uniestratificada interrumpida por células mucilaginosas. Los tallos en corte transversal presentan un parénquima cortical, con cristales de oxalato de calcio, una

vaina de fibras esclerenquimáticas que rodea al floema y al xilema, y un parénquima medular en el que se observan células con cristales simples y drusas de oxalato de calcio.

2.2. Condiciones vegetativas y cultivo

2.2. 1. Región de origen, suelo y clima

El área de distribución natural de la planta de yerba mate es muy restringida, encontrándose en estado silvestre o en plantaciones cultivadas en la zona delimitada por el Este por el Océano Atlántico y al Oeste por el río Paraguay entre los 18 y 30 grados de latitud sur.

Planta típica de la cuenca del Alto Paraná, Alto Uruguay y algunos afluentes del río Paraguay; los ensayos efectuados en regiones de igual clima, en América del Norte, África y Asia han fracasado hasta el presente.

Suele encontrársela rebasando aisladamente hacia el norte esta zona, entre ejemplares de araucarias de Brasil pero recién alcanza a formar "manchones" y montes cerrados en las latitudes más australes.

Como planta subtropical o tropical, requiere elevadas temperaturas, mucha humedad en el suelo y el ambiente, condiciones que poseen las zonas bañadas por el Alto Paraná, esto es para satisfacer las exigencias de este cultivo, que necesita unos 1.500 milímetros de lluvia anuales, con caídas frecuentes en los meses de septiembre a febrero.

La temperatura media de la zona yerbatera oscila entre los 15.5 y 25.5 grados centígrados, estimándose la óptima para el cultivo entre 20 - 23° C como media anual.

Prospera notablemente en los suelos areno-arcillosos y arcillo-arenosos, ricos en ácido fosfórico, potasio y hierro, donde las aguas no se estanquen y el subsuelo sea permeable, prefiriendo los suelos profundos y frescos.

Las tierras coloradas de Misiones, cargadas de óxido de hierro, conocidas como lateríticas, son las que se consideran mejores, para el desarrollo de la yerba mate.

2.2. 2. El cultivo

En la peculiar constitución anatómica de la semilla y particularmente si éstas no son frescas, radican las dificultades de su germinación.

Precisamente la carencia de semillas frescas que debían traerse de largas distancias, fueron causal de los fracasos y desalientos iniciales de los pioneros de su cultivo. Tanto fue así que se consideraba como incuestionable que, siendo una planta esencialmente selvática, sólo germinaba y prosperaba en su hábitat natural.

Hoy la formación de almácigos ha dejado de ser un problema. Semillas frescas, obtenidas de frutos maduros, quebradas y remojadas por algunas horas en agua, lavadas y extraída las capas externas, una vez secas y sembradas al voleo entre los meses de marzo-abril y recubiertas luego por un ligero mantillo de buena tierra vegetal, liviana, con abundante riego y buen cuidado; germinan y brotan entre los 30 a 60 días.

Cuando la plantita de almácigo -protegida adecuadamente bajo carpas móviles de arpilleras- alcanza a tener 4 o 5 hojitas, se las lleva al vivero, extrayéndolas con un poco de tierra. Esta tarea suele hacerse también mediante el uso de macetitas de barro crudo o cilindros de laminillas de madera, donde se las mantienen durante nueve meses a un año a media sombra y bien regadas hasta el momento de su traslado al lugar definitivo.

En los primeros cultivos se llevaba la planta de vivero -una vez alcanzados unos 30 a 80 cm. de alto- a hoyos preparados adecuadamente y distribuidos uniformemente, en cuadrilátero o tresbolillo, a distancias variables entre 3 x 3 a 3,5 x 3,5 o más metros entre plantas y filas.

Al autorizarse en el año 1953 la renovación y ampliación de los cultivos, por resolución del Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación, se dispuso la obligatoriedad de efectuar las plantaciones -con un máximo de hasta 1000 plantas por hectárea- en "curvas de nivel" a efectos de precaver los cultivos de la intensa erosión hídrica, notable en Misiones en razón de sus tierras onduladas, sometidas a frecuentes lluvias torrenciales.

Con ello se modificó simultáneamente la forma de plantación que, con frecuencia se realizó sin la preparación de hoyos, colocando la plantita directamente en la tierra, bien trabajada, en surcos adecuados a las curvas trazadas conforme al declive del terreno.

Durante los primeros tiempos, mediante "aripucas" (pirámides construidas con astillas de maderas, entrecruzadas) "ponchos" o "pantallas" de paja brava, o "estacas", abiertas hacia el norte, se protege a la plantita del frío, viento e insolación.

En el período de su arraigo, un año aproximadamente, se reponen las fallas y mantienen limpias de malezas por sucesivos carpidos, en tanto que en los años siguientes se procede, mediante poda, a dar forma adecuada a la futura planta.

De estas podas dependerá luego una buena cosecha por lo que se trata de obtener una planta de escasa altura y gran copa, que permita una buena luminosidad y facilite el acceso y labor del cosechero.

Las plantaciones de yerba mate (Fig. 2.3.), que no se hallan exentas de algunas enfermedades y plagas -hormigas. metaphalara, cochinillas, chicharras, taladros, etc: requiere, para su buena conservación, numerosos trabajos culturales anuales, que se adecuan a las necesidades y

características de la plantación y terreno, consistentes en "podas de limpieza", carpidas, aradas y disqueadas, macheteadas, etc; tareas que en la actualidad han sido tecnificadas.



Figura 2.3: Plantación de Yerba Mate. Fuente: INYM

2.3. Transformación primaria

La transformación primaria consiste en los siguientes pasos: Cosecha, sapecado, presecado, secado, canchado, despaldado y estacionamiento.

El objetivo de la transformación primaria es detener los procesos biológicos de degradación de los tejidos del vegetal y lograr una deshidratación casi total (aproximadamente 1%).

2.3. 1. Cosecha (corte y quiebra)

Consiste la cosecha en el cuidadoso corte de las ramas, cargadas de hojas, mediante tijera, machete o serrucho, según lo requiera el grosor de las ramas a cortar (Fig. 2.4).

La primera cosecha de muy escaso rendimiento suele realizarse entre el 4º y 5º año de implantación. Si bien ésta se realiza anualmente en los yerbales de cultivo -aconsejándose no despojar totalmente a las plantas en los yerbales silvestres, en razón de cortarse ramas primarias o secundarias muy gruesas, la cosecha se efectúa cada tres años, siendo obligatorio mantener en la planta una así llamada "banderola", es decir, las ramas centrales altas.



Figura 2.4: Cosecha manual de yerba mate. Fuente: INYM

La cosecha se efectúa preferentemente entre los meses de mayo a octubre, cuando la planta ha detenido la circulación de su savia y en que cuenta con un mayor porcentaje de hojas maduras.

Se realizan dos podas anuales:

- La primera se realiza en abril-mayo, donde se realiza una poda o entresacado, haciendo una limpieza de la planta.
- La segunda se realiza de julio a septiembre, donde se realiza un despunte o cosecha gruesa.

En los yerbales de cultivo, cosechadas las ramas, se procede a la "quiebra" eliminando las más gruesas y se separan en una operación, conocida como "viruteo", las hojas aisladas. Las ramas ya quebradas, tarea que se realiza a efectos de facilitar su transporte y posterior elaboración, se acondicionan, sobre amplios lienzos de arpillera "conocidos en la jerga yerbatera como ponchadas"- las que, recogidas y atados sus cuatro extremos, constituyen el "raído".

Antiguamente, el "tarifero", denominación con que en razón de la modalidad retributiva imperante se conoce al "cosechero", transportaba los raídos, cargándolos sobre sus espaldas y sosteniéndolo mediante unas correas de cuero que, circundando al mismo, apoyaba sobre su frente.

En circunstancias climáticas favorables, una buena plantación puede dar por planta, unos 20 a 25 kilogramos de hoja "verde", rendimiento que varía según la edad de la plantación y su zona de implantación. En este último sentido un buen yerbal de monte prácticamente duplica la producción de los implantados en tierras de campo.

2.3. 2. Elaboración

La elaboración de las hojas, que comprende el "sapecado", el "secado o secanza" y el "canchado", debe iniciarse dentro de las 24 horas de cosechadas, con el fin de evitar su fermentación (actividad enzimática) y con ello, su inutilización y pérdida.

Cuenta la zona productora con unas 1700 instalaciones para la elaboración de yerba mate. En una tercera parte de éstas se elabora únicamente la producción propia en tanto que en las restantes, se la efectúa también por cuenta de terceros, incluyendo frecuentemente en la tarea la cosecha del yerbal, cuando no el acopio directo de la producción "en planta".

2.3.2.1. Sapecado

Con esta operación preliminar, se inactivan las enzimas por el calor, entre ellas las oxidasas que ennegrecen al producto por desdoblamiento de los taninos en ácido gálico en contacto con el oxígeno del aire, alterando su composición química y por consiguiente sus propiedades organolépticas. El material fresco se expone a la acción de la llama directa o del aire calentando a elevadas temperaturas para conseguir unos 100°C dentro del parénquima de la hoja durante fracciones de tiempo tan pequeñas de tal forma que no se destruyan por el fuego. Se tiene como indicación útil de la buena marcha de esta operación, el crepitar que producen las hojas durante las roturas de la epidermis, por efecto de la presión instantánea del vapor formado en su interior. El buen sapecado es indispensable para obtener un producto de calidad. En los yerbales silvestres esta operación se efectuaba pasando las ramas a mano, sobre una llama viva, por cuyo motivo la operación de "quiebra" se realizaba recién después del "sapecado". En los yerbales de cultivo, centralizada la producción en las cercanías de las instalaciones, se procedió a la mecanización del sapecado.

Las primeras "sapecadoras" consistían en un cilindro de alambre tejido de unos 2 y ½ metros de largo y unos 70 a 80 centímetros de diámetro, con armazón de varillas de hierro, el que - montado sobre un eje inclinado en unos 20 o 25 grados, se hacía girar la manivela sobre un fuego abierto. Esta tarea era realizada por un "horquillero", un "manijero", un "foguista" y un "guaino", siendo este último el encargado de arrastrar sobre amplios cueros, las hojas sopecadas, al secadero.

Introducidas las hojas por la boca superior mediante una horquilla, quedaban expuestas a la acción directa del fuego durante su recorrido descendente hacia la boca de salida.

Si bien con el tiempo se introdujeron modificaciones tendientes a obtener un mejor aprovechamiento del calor, acondicionando el tambor de alambre entre dos paredes de ladrillo, y luego reemplazando a aquél por un cilindro de chapa, igualmente, esas máquinas primeras han caído en desuso.

Aparecieron máquinas perfeccionadas, mecánicas, y se fueron utilizando cilindros o conos truncados, de hierro, planos inclinados, hornallas, cintas transportadoras, para la realización de la elaboración de la yerba mate, y las hojas sapecadas son llevadas mediante las cintas transportadoras a una planchada de enfriamiento o directamente al secadero. Durante este proceso, la hoja pierde un 20% de su peso por deshidratación (Fig. 2.5).



Figura 2.5: Horno rotativo cilíndrico donde se realiza el sapecado. Proceso de sapecado. Fuente: INYM

2.3.2.2 Secado

La hoja debe ser sometida a un proceso de secado y ligera torrefacción hasta reducir su contenido en humedad, a aproximadamente un 5 a 6%, disminuyendo consecuentemente en peso que, con relación a cada 100 kilogramos de hoja "verde" queda reducido, según haya sido la madurez de las hojas cosechadas, a unos 23 kilogramos de yerba mate seca con un 5% de palitos.

El secado de la yerba mate se efectúa mediante dos tipos de instalaciones que se diferencian fundamentalmente en que, uno denominado "carijo", actúa mediante la acción de un fuego directo, en tanto que el otro, conocido como "barbacuá" funciona a calor indirecto.

El "carijo", tipo de instalación cuyo uso en Argentina prohíbe expresamente el "Reglamento de Cosecha y Elaboración", consiste en una parrilla primitiva construida de varillas de madera sobre la cual se esparcen o cuelgan las ramas de yerba mate, ya sapecadas, las que se secan por acción directa del fuego encendido debajo.

Las yerbas secadas por este sistema, expuestas directamente durante horas, al humo de la fogata del que se impregna totalmente, adquiere un característico olor y sabor a humo.

Aunque está en desuso este sistema, en algunas zonas sudamericanas suelen utilizarlo.

En Paraguay se solía usar un adminículo un tanto similar, el "mbatovi", término que en guaraní significa "montón de hojas".

El "barbacuá" (del guaraní "mbarambacuá", que significa "montón de casa tostada") consiste en una parrilla circular o elíptica, de unos 7 metros de diámetro, hecha con varillas de maderas y tacuaras, en forma de una gran cúpula sostenida perimetralmente por columnas ("tambos") de 1,20 a 1.80 metros de altura, y rodeado de una barandilla ("cambará") para evitar el deslizamiento de la carga de hojas.

A unos 12 metros del centro de la parrilla, se halla una hornalla, la que se comunica con el centro de la parrilla mediante un túnel (el "conducto") que se inicia con un diámetro de más o menos un metro y termina con unos 80 cm. a la salida, debajo de la cúpula, en forma de una chimenea, con campana protectora contra chispas.

Toda la instalación, a efectos de un mejor aprovechamiento del calor, se halla en el interior de una construcción de madera o ladrillos, cuyo techo presenta un típico capuchón ventilador.

La yerba "sapecada" se extiende sobre la parrilla en capas de 30 a 40 centímetros de espesor donde queda expuesta a una corriente de aire y gases, a una temperatura de 90 a 100°C. Cuando la "camada" inferior comienza a secarse, adquiriendo una consistencia quebradiza, el maestro secador -conocido en la jerga yerbatera como "urú", la remueve y recuesta sobre la barandilla lateral, el cambará, operación que se repite hasta colmar la capacidad del barbacuá, que es de unos 2.000 kilogramos de producto seco.

Secada la yerba, se apaga la hornalla dejando que se enfríe lentamente. Esta operación se realiza en el término de entre 12 y 24 horas.

Posteriormente se fueron usando máquinas más modernas para realizar esta operación de secado, que se realizó posteriormente a "catre" y a "cintas" con cargas y descargas automatizadas (Fig. 2.6).



Figura 2.6: Secado en cintas. Fuente: INYM

2.3.2.3. Canchado

Primitivamente se realizaba esta operación esparciendo la yerba sobre un lugar plano, recubierto de arpilleras, a las que denominaban "canchas", de allí deriva este término de "canchado". Era una operación similar a la primitiva trilla del trigo, mediante espadones o machetes de madera dura, que desmenuzaba manualmente.

Otro paso hacia la mecanización fue la canchadora a cono dentado, una especie de noria a tracción a sangre.

Estos métodos tradicionales fueron suplantados por las canchadoras mecánicas, las que a la vez producen la dispersión de gran cantidad de polvo.

Después de canchada, la yerba se estaciona, embolsándola en bolsas de arpillera durante un período mínimo de nueve meses (Fig. 2.7).

La yerba mate canchada es heterogénea por sus cualidades organolépticas, contenido de humedad, granulometría y contenido de hojas y palitos de comportamiento diferente frente a la molienda.



Figura 2.7: Aspecto de la yerba canchada y estacionamiento en bolsas de arpillera. Fuente: INYM

2.3.2.4. Molienda

El objetivo es obtener un producto homogéneo en cuanto a sabor y molienda uniforme por sucesivas operaciones de clasificación, trituración y mezclado.

Seleccionada la materia prima según su origen y características particulares y observación directa sobre cintas transportadoras, se la pasa por una zaranda circular de alambre, conocida como "zaranda de limpieza" para la eliminación de posibles cuerpos extraños, palos y ramas excesivamente gruesas. Seguidamente, en un zarandeo primario de clasificación, se separan las hojas muy grandes y el palo.

Estas hojas se someten a una trituración más o menos intensa en un molino o bien en el "trapiche" (tanque de hierro en el que giran dos pesados rodillos de hierro, de forma cónica truncada y superficie estriada) para luego ser zarandeadas nuevamente. Para ello se emplean cernidores rotativos prismáticos hexagonales o bien "plansichters", es decir, zarandas vibradoras, obteniéndose, de acuerdo a su mayor o menor grado de trituración, las distintas "telas" clasificadas en "goma", "polvo", "fibra" y hoja de distinto grano, las que se almacenan en silos especiales conocidas como "percheles".

Finalizada la clasificación se procede a su mezcla en distintas proporciones, según calidad, origen, sabor, grado de molienda, etc. con agregado o no de "palos", cortados previamente en trozos uniformes mediante un 'corta palos'.

Se elaboran así dos tipos bien definidos en su molienda, la integral, vale decir, con contenido de fibra y palos, denominada de "tipo paraguayo" y la molienda "sin palos ni fibra" de "tipo argentino".

Ambas denominaciones han sido prohibidas oficialmente con el fin de evitar equívocos en cuanto al origen del producto y reemplazadas por las de tipo "con palos" y "sin palos" respectivamente.

En nuestro país, el consumo de estos dos tipos de molienda se halla más o menos definido. Mientras que la yerba molida tipo "con palos" se consume preferentemente en la Capital Federal y sus alrededores, parte del litoral, y el norte del país, en el resto se consume por lo general yerba mate "sin palos". Existen igualmente preferencias en cuanto al grado de trituración, imperando la "molienda fina" en parte del Litoral, Norte y Sur de nuestro país.

El envasado se realiza mediante rápidas e higiénicas máquinas envasadoras automáticas o semiautomáticas, aun cuando la industria molinera radicada en la zona productora suele presentarla, excepcionalmente, fuertemente prensada ("atacada") en pequeñas bolsas de tela conocidas como "sobornales".

Si bien numéricamente la mayor parte de las industrias molineras se hallan radicadas en la zona de producción, dedicándose por lo general a la elaboración de su propia producción de yerba mate, el 80 % de la molienda y comercialización se halla localizada en Buenos Aires y Rosario.

La Figura 2.8 muestra en forma de flujograma un resumen de todos los pasos que intervienen en el proceso de molienda de la yerba mate comercial.

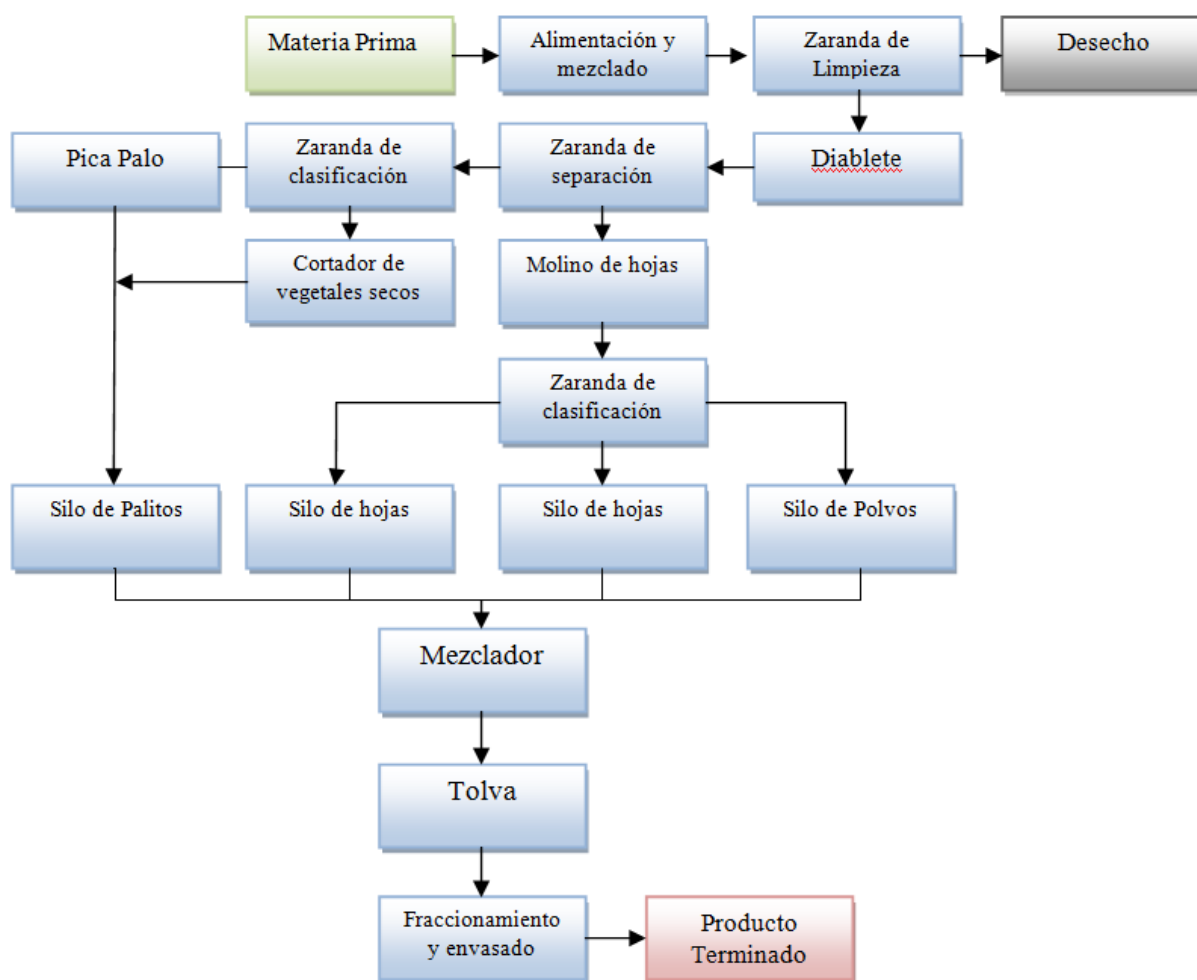


Figura 2.8: Diagrama de Flujo de un moderno y eficiente complejo industrial molinero de yerba mate (INYM, 2006)

2.4. Cadena Agroalimentaria

Entre las características de desarrollo en las economías regionales, el sector yerbatero es el que reviste distintos perfiles por su heterogeneidad en las técnicas de producción, manejo para el proceso de transformación primaria y secundaria y en las diferencias metodológicas y tecnológicas para la elaboración del producto final.

La producción primaria es llevada a cabo por 17000 agricultores cuya distribución parcelaria no supera, en general, las 25 hectáreas por productor.

La Figura 2.9 muestra la estructura básica de la cadena agroalimentaria de la yerba mate.

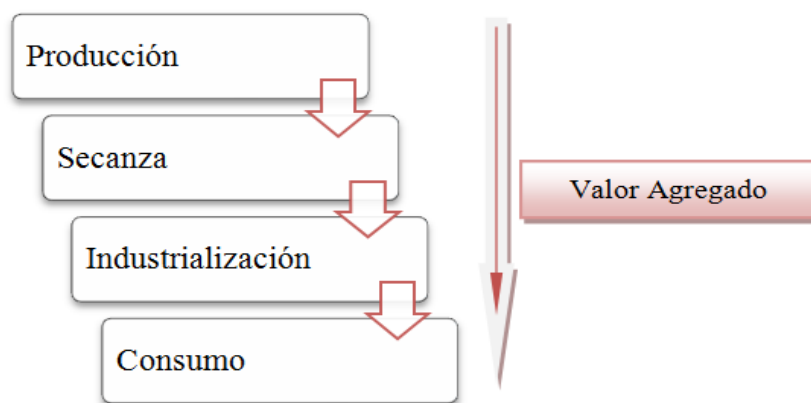


Figura 2.9: Estructura de la cadena agroalimentaria de la yerba mate

2.5. Comercialización

La producción de yerba mate molida, se vuelca al mercado doméstico en aproximadamente en un 84 % de su total, correspondiendo el saldo a exportaciones. En el mercado interno, más del 55% del volumen de yerba mate comercializada se presenta en envases de 500 gr de capacidad, mientras que alrededor del 35 % se presenta en envases de 1 kg de capacidad. Con respecto al abastecimiento del mercado internacional, la exportación de yerba mate evidencia distintas características en cuanto a las presentaciones. Para el mercado sudamericano, a excepción de Chile, la yerba mate se comercializa canchada; para el sirio, en paquete de ¼ kg prensado, para el continente europeo en envases de medio y kilogramo registrándose un importante incremento de las ventas en saquitos.

2.6. Mercados

2.6.1. Mercado externo:

La yerba mate, se obtiene de una especie arbórea cuya dispersión natural abarca los países de Argentina, Brasil y Paraguay. Los mismos se constituyen como los únicos productores mundiales de este producto, que se consume bajo diversas modalidades, entre las que prevalece la infusión mediante el empleo de bombilla (mate cebado), preparado con yerba mate molida, y la infusión en taza, preparada con yerba mate en saquitos. En estos casos predomina el consumo con agua caliente, aunque también se bebe mate cebado con agua fría. Además se encuentran en el mercado bebidas a base de yerba mate listas para beber con y sin gas, alcohólicas y analcohólicas, así como extractos, entre otras presentaciones.

Su consumo en los cuatro países integrantes del MERCOSUR es tradicional y su demanda es relativamente estable, con tendencia al crecimiento, aunque se destaca que se ha extendido a numerosos destinos internacionales como Siria, Líbano, Estados Unidos, Chile, Alemania y

España, entre muchos otros. Dentro del bloque MERCOSUR se aprecian flujos de producto determinados. Argentina exporta mayormente a Brasil y éste es el proveedor líder de Uruguay. Por su lado, Paraguay también exporta mayormente a Uruguay, aunque con menor magnitud que Brasil, y Uruguay muestra cierto grado de reexportación tanto hacia la Argentina como hacia Brasil. Respecto del perfil de las exportaciones de los países integrantes del bloque, se observa que Argentina y Paraguay dominan las ventas a mercados externos al MERCOSUR, mientras que Brasil exporta mayormente a países intrazona. En la esfera internacional se está atravesando por un período de dinamismo en el consumo de bebidas en general y de infusiones en particular, con tendencia hacia los productos naturales. Por ello, el desarrollo de nuevos productos a base de yerba mate como: extractos, con o sin el agregado de otros ingredientes (esencias de cítricos, entre otras), bebidas listas para consumo gasificadas o no gasificadas y yerba mate en saquitos con presentación premium, se perfilan con amplias posibilidades de desarrollo y penetración tanto en el mercado doméstico como en el externo.

- Exportaciones

La Figura 2.10 muestra la evolución mensual de las exportaciones de yerba mate argentina durante los años 2008, 2009 y enero a mayo de 2010. Durante el mes de mayo se exportaron 1902.3 toneladas, por un valor de 2 millones de dólares FOB y con un precio promedio de exportación de 1076.7 U\$S FOB/ton.

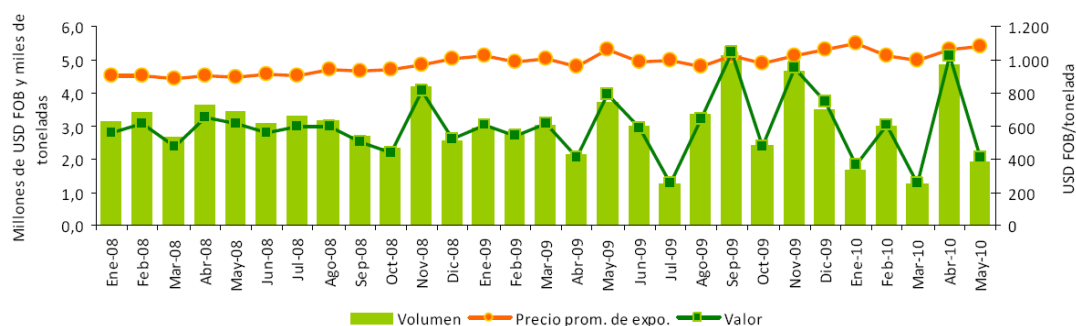


Figura 2.10: Evolución mensual de exportaciones de yerba mate en los años 2008, 2009 y de enero a mayo de 2010. Fuente: Cadena de Infusiones, Subsecretaría de Desarrollo de Economías Regionales, MAGyP, en base a INDEC.

Al analizar el desempeño exportador del período enero – mayo de los últimos cuatro años, se observa que tanto el valor total como el precio promedio de exportación se incrementaron en un 21,4% y un 24,1%, respectivamente (Fig. 2.11).

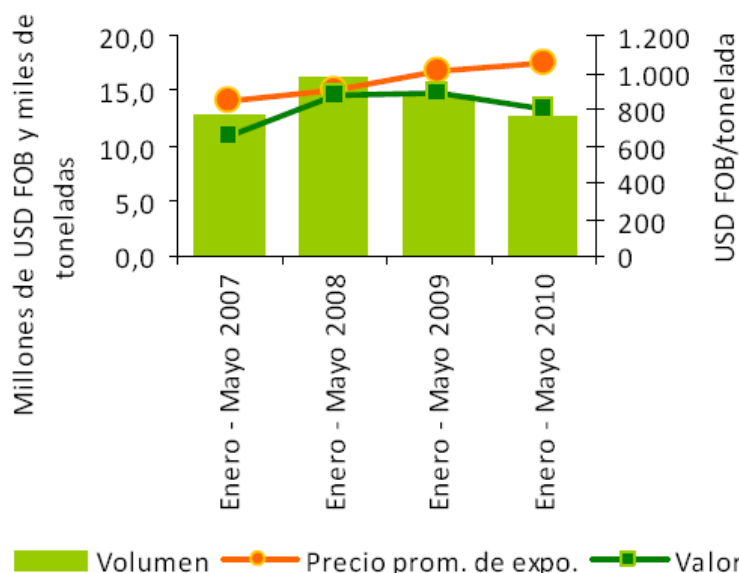


Figura 2.11: Evolución de las exportaciones de yerba mate argentina durante el período de enero a mayo 2007,2008, 2009 y 2010. Fuente: Cadena de Infusiones, Subsecretaría de Desarrollo de Economías Regionales, MAGyP, en base a INDEC.

En términos anuales, las ventas a mercados externos han registrado un crecimiento sostenido del volumen, del valor y del precio promedio de exportación entre los años 2007 y 2009. En este lapso el valor se incrementó un 26%, el volumen lo hizo en un 7%, y el precio promedio en un 17% (Fig. 2.12).

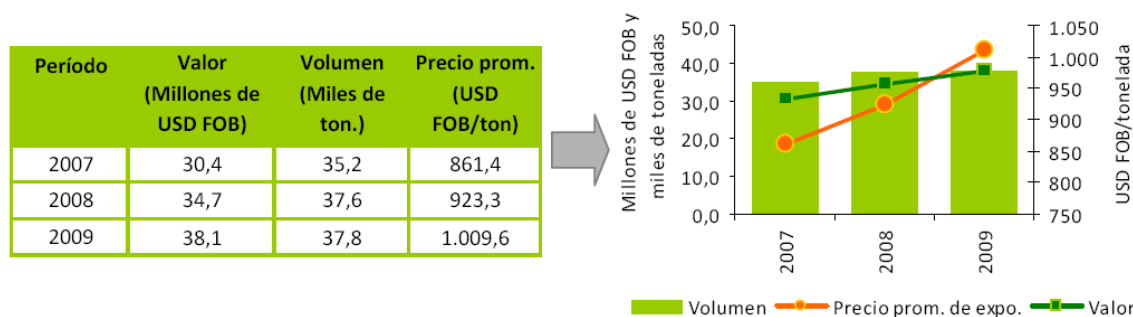


Figura 2.12: Evolución anual de las exportaciones de yerba mate durante los años 2007 a 2009. Fuente: Cadena de Infusiones, Subsecretaría de Desarrollo de Economías Regionales, MAGyP, en base a INDEC.

La Tabla 2.1 muestra los principales destinos de exportación de yerba mate argentina y la participación porcentual en volumen de los mismos. Durante el año 2009 se exportó yerba mate a 44 destinos. Siria fue el preponderante y concentró el 62,1% del volumen total exportado. En el período enero-mayo 2010 los destinos fueron 34, mientras que en mayo los mismos fueron 24. En ambos casos, Siria fue el destino líder.

Los países integrantes y asociados del MERCOSUR: Chile, Brasil y Uruguay significaron el 26,9% durante 2009, el 34% en el período enero-mayo 2010 y el 46% en mayo 2010.

Tabla 2.1: Principales destinos de exportación de yerba mate argentina. Participación porcentual en volumen.
Fuente: Fuente: Cadena de Infusiones, Subsecretaría de Desarrollo de Economías Regionales, MAGyP, en base a INDEC.

| País destino | Período | | |
|--------------|----------|-----------------|-----------|
| | Año 2009 | Enero-mayo 2010 | Mayo 2010 |
| Siria | 62,1 | 53,9 | 32,8 |
| Chile | 9,8 | 12,3 | 13,8 |
| Brasil | 8,7 | 12,6 | 19,6 |
| Uruguay | 8,3 | 9,1 | 12,6 |
| Líbano | 2,5 | 3,2 | 6,8 |
| España | 2,0 | 2,9 | 6,3 |
| EEUU | 1,9 | 1,7 | 2,3 |
| Otros | 4,7 | 4,3 | 5,8 |

La Figura 2.13 muestra las formas de presentación de yerba mate y los volúmenes porcentuales exportados durante los períodos 2009, enero a mayo de 2010 y mayo de 2010.

El 93,8 % del volumen y el 90,1% del valor de la yerba mate exportada durante el año 2009 correspondió a producto molido, el resto se constituyó de yerba mate canchada.

La yerba mate molida a granel fue la presentación exportada en mayor proporción, concentrando el 66,4% del volumen total.

Un patrón similar se registró tanto el período enero-mayo 2010, como en mayo 2010. En el primer caso, el 85,9% del volumen y el 90,8% del valor total exportado correspondieron a yerba mate molida. En el segundo caso, este producto concentró el 78,8% del volumen y el 86,3% del valor total exportado.

Este esquema se debe a que el mayor mercado destino, Siria, adquiere yerba mate molida y la fracciona en su país, mayormente en envases de 250 gramos de capacidad.

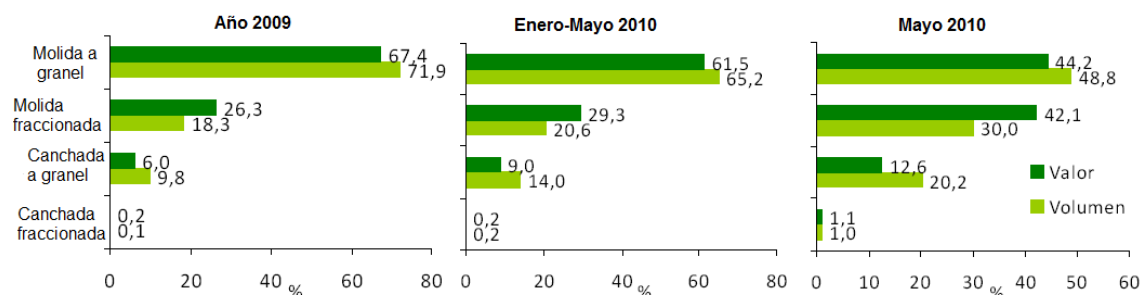


Figura 2.13: Detalle de las presentaciones de yerba mate exportada. Participación porcentual en volumen.
Fuente: Cadena de Infusiones, Subsecretaría de Desarrollo de Economías Regionales, MAGyP, en base a INDEC.

- Importaciones

Las compras de yerba mate a mercados externos son de escasa relevancia.

Durante mayo del 2010 se importaron 48 toneladas por un valor total de 108.161,6 dólares CIF y con un precio promedio de importación de 2.253,9 U\$S CIF/ton. El 99,99% provino de Brasil y se trató de yerba mate molida y fraccionada.

En el período enero-mayo 2010 se compraron 131,6 toneladas por un valor total de 282.653,2 dólares CIF, con un precio promedio de importación de 2.147,7 U\$S CIF/ton. El origen del 99,99% fue Brasil y también se constituyó de yerba mate molida y fraccionada (Tabla 2.4).

La variación mensual de mayo fue positiva tanto en volumen, como en valor y en precio promedio de importación. Por el contrario, la variación anual del volumen y del valor fue negativa.

Tabla 2.2: Evolución de las importaciones de yerba mate argentina. Períodos enero-mayo 2007,2008, 2009 y 2010. Fuente: Cadena de Infusiones, Subsecretaría de Desarrollo de Economías Regionales, MAGyP, en base a INDEC.

| Período | USD CIF | KILOS | Valor (Millones de USD CIF) | Volumen (Toneladas) | Precios Prom. (USD CIF/ton) |
|-----------------|-----------|-----------|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Enero-Mayo 2010 | 282.653,2 | 131.604,5 | 0,3 | 131,6 | 2.147,7 |
| Enero-Mayo 2009 | 215.232,2 | 97.639,8 | 0,2 | 97,6 | 2.204,3 |
| Enero-Mayo 2008 | 190.267,0 | 96.802,0 | 0,2 | 96,8 | 1.965,5 |
| Enero-Mayo 2007 | 97.211,0 | 57.321,0 | 0,1 | 57,3 | 1.695,9 |

Al considerar el período enero-mayo 2010, se observa incrementos en volumen como en valor, respecto de idéntico período del año anterior. Durante el mismo lapso de comparación, el precio promedio de importación registró variación positiva (Tabla 2.3).

Tabla 2.3: Variaciones de las importaciones de yerba mate. Fuente: Cadena de Infusiones, Subsecretaría de Desarrollo de Economías Regionales, MAGyP, en base a INDEC.

| Período | Variación en Valor | Variación en Volumen | Variación en Precio prom. Importación |
|------------------------------------|-----------------------|-------------------------|--|
| Mayo 2010 vs Abril 2010 | 124,6% | 92,0% | 17,0% |
| Mayo 2010 vs Mayo 2009 | -32,9% | -34,4% | 2,3% |
| Enero-Mayo 2010 vs Enero-Mayo 2009 | 31,3% | 34,8% | -2,6% |

En términos anuales, las compras a mercados externos han registrado reducción en volumen y en valor entre los años 2007 y 2009. En el mismo lapso, el precio promedio de importación registró crecimiento.

2.6.2. Mercado interno

El consumo nacional se ha mantenido relativamente estable en la última década, con un valor de 6.5 kg/hab/año; la particularidad es que comienza a percibirse un mayor grado de exigencia por parte del consumidor, en cuanto a lo genuino y calidad, motivado por los cambios en los hábitos de consumo. Esta relación podría corresponderse con una mayor demanda, sobre la base de un producto original y seguro. El 90% de la producción argentina se destina al mercado interno.

Según datos estadísticos realizados por GEA Research for Strategy para INYM, el uso de yerba mate está presente en el 98% de los hogares argentinos: el 92 % lo constituye el mate cebado, el 54% el mate cocido y el 14% el tereré.

2.7. Composición química de la planta *Ilex paraguayensis*

Varios fitoquímicos activos han sido identificados en extractos acuosos de *Ilex paraguayensis* como ser polifenoles, xantinas, saponinas, amino ácidos, minerales y vitaminas. También se ha encontrado la presencia de xantinas, como la cafeína, teofilina y teobromina en la yerba mate. Las xantinas son una clase de alcaloides purinas que se encuentran en distintas plantas, que otorgan efectos estimulantes y diuréticos. La cafeína es la xantina presente en mayor concentración en yerba mate.

Además de los compuestos mencionados anteriormente, las hojas de *Ilex paraguayensis* contienen una cantidad importante de saponinas triterpenoides. Por último, se han identificado varios minerales en mate, como ser aluminio, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel, potasio y zinc, los cuales tienen una gran importancia para el desarrollo y metabolismo humano.

2.7.1. Polifenoles

Los polifenoles son una clase de compuestos que contienen un anillo bencénico unido a uno o más grupos hidroxilo. Al hablar de compuestos polifenólicos, generalmente se refiere a un diverso grupo de compuestos que se encuentran de forma natural, comúnmente en las plantas superiores, que contienen múltiples funciones fenólicas. Los compuestos polifenólicos principales del mate son los flavonoides y los derivados cafeoil.

Estos compuestos han sido analizados por un gran número de métodos, incluyendo el biosensor de tirosinasa, ensayo de Folin Ciocalteu, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Carini y col, 1998; Chandra y col., 2004; Dall'Orto, 2005). Con estos análisis se ha mostrado que en la variedad de yerba mate el grado de molienda y la mezcla con otras hierbas

determina la concentración de polifenoles extraídos en la infusión. Dall'Orto (2005), extrajo en promedio, una cantidad de polifenoles de 92 mg equivalentes de ácido clorogénico por gramo de hojas secas, y halló que en mezclas con otras hierbas, la cantidad es significativamente menor. La cantidad de polifenoles extraídos en *Ilex paraguariensis* depende del método usado, ya sea con agua o solventes. La extracción con 50% de acetona obtuvo la mayor cantidad de polifenoles (Turkmen y col., 2006). Los compuestos polifenólicos de infusiones de yerba mate difieren significativamente de los del té verde debido a la alta concentración de ácido clorogénico y a la ausencia de catequinas respecto de este último (Chandra y De Mejía Gonzalez, 2004).

2.7.1.1. Flavonoides

Los flavonoides comprenden una amplia clase de compuestos fenólicos, metabolitos secundarios de planta superiores, de bajo peso molecular. Los flavonoides se caracterizan por contener el núcleo flavano. Estos compuestos protegen a las plantas contra la radiación ultravioleta, los patógenos y herbívoros. Sus principales efectos para la salud son atribuidos a su capacidad antioxidante y como agente quelante. Es así que su actividad antioxidante le otorga a los flavonoides un rol muy importante en la nutrición humana y prevención de enfermedades.

Los flavonoides son derivados benzo- γ -pirona con anillos fenólicos y piranos. En los alimentos, los flavonoides se encuentran principalmente como 3-O-glicósidos, que difieren en la disposición de las cadenas laterales hidroxí, metoxi y glicosídicas, y en la conjugación entre los anillos A y B.

Los flavonoides alimenticios pueden ser clasificados según su estructura en flavanoles, flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas y antocianidinas. De hecho, la capacidad antioxidante de los flavonoides y sus metabolitos está relacionada con la disposición de los grupos funcionales en base a la misma estructura nuclear.

La capacidad antioxidante de un compuesto puede ser expresada mediante el valor de actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC): aquellos valores TEAC más altos indican una mayor capacidad antioxidante. La quercetina es un flavonol presente en la yerba mate y tiene uno de los valores TEAC más altos, de 4.7. La quercetina se encuentra generalmente en la lechuga, brócoli, cebolla, tomate, té, vino tinto, fresas, aceite de oliva y cáscara de manzana.

También se encuentran otros flavonoides en mate, como ser rutina y miricetina. La rutina es una flavona con un valor TEAC de 2.4 que también está presente en el vino tinto, trigo

sarraceno, frutos cítricos y cáscara de tomate. La miricetina, encontrada en arándanos, uvas y vino tinto, tiene un valor TEAC de 3.1. Por otra parte, se ha informado que múltiples grupos hidroxilos pueden también presentar actividad prooxidativa, lo que podría acentuar el estrés oxidativo y el daño a moléculas funcionales y estructurales.

2.7.1.2 Cafeoil derivados

Los ácidos hidroxicinámicos son otra clase de compuestos fenólicos que se encuentran en casi todas las plantas. El representante principal de dicho grupo es el ácido cafeico, que se encuentran en alimentos como un éster del ácido quínico llamado ácido clorogénico (ácido 5-cafeoilquínico).

Los cafeoil derivados presentes en el mate incluyen el ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, el ácido 3,5-dicafeoilquínico y el 4,5-dicafeoilquínico (Filip y col., 2000). A estos compuestos se les atribuye principalmente el poder antioxidante de la yerba mate. La Fig. 2.14 muestra la estructura química del ácido clorogénico, el ácido 3,4 dicafeoilquínico, el ácido 3,5 dicafeoilquínico y el ácido 4,5 dicafeoilquínico. Los mismos han sido analizados por dos métodos diferentes, espectrofotométricamente (330 nm) y por HPLC, y usualmente se los correlaciona con el ácido clorogénico como estándar, con una concentración de 6.90 ± 0.09 mg de ácido clorogénico. g^{-1} de hojas secas (Filip y col., 2000). Esto representa 0.48 mg de ácido clorogénico. mL^{-1} y aproximadamente 72 mg por taza (150 mL) de infusión de mate cuando es preparado usando 1.5 g para 50 mL de agua (Mazzafera, 1997).

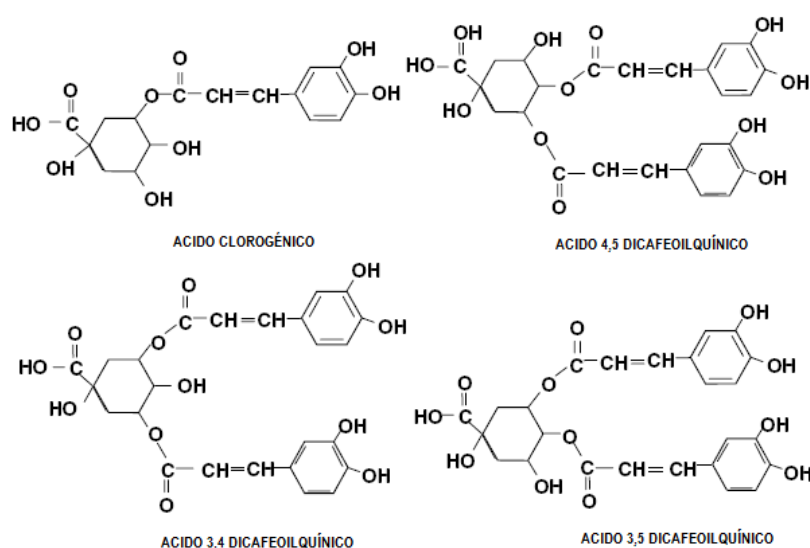


Figura 2.14: Estructura de compuestos cafeoil derivados: ácido clorogénico, ácido 4,5 dicafeoilquínico, ácido 3,4 dicafeoilquínico y ácido 3,5 dicafeoilquínico.

La Tabla 2.4 compara las concentraciones de cafeoil derivados en *Ilex paraguariensis* con las de otras especies de *Ilex*: *I. dumosa*, *I. brevicuspis* e *I. argentina*. En ella se muestra que *Ilex paraguariensis* contiene las concentraciones más altas de estos compuestos mientras que en las otras especies las cantidades son mucho menores y varían en sus concentraciones de ácido dicafeoilquínico (Filip y col., 2001). Estos hallazgos se han correlacionado con la alta capacidad antioxidante de la yerba mate (Filip y col. 2000).

Tabla 2.4: Concentración de cafeoil derivados en varias especies de *Ilex* (% en peso seco).^a

| Especies | Acido clorogénico | Acido cafeico | 3,4-DCQ | 3,5-DCQ | 4,5-DCQ |
|--------------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>I. paraguariensis</i> | 2,800 ± 0,300 | 0,023 ± 0,004 | 0,855 ± 0,064 | 3,040 ± 0,180 | 2,890 ± 0,060 |
| <i>I. brevicuspis</i> | 0,915 ± 0,064 | 0,005 ± 0,001 | 0,130 ± 0,010 | 0,360 ± 0,060 | 0,490 ± 0,040 |
| <i>I. argentina</i> | 0,090 ± 0,015 | 0,003 ± 0,001 | 0,047 ± 0,010 | 0,545 ± 0,049 | 0,043 ± 0,003 |
| <i>I. dumosa</i> | 0,042 ± 0,009 | 0,012 ± 0,001 | 0,017 ± 0,001 | 0,147 ± 0,060 | 0,070 ± 0,014 |

^a Adaptado de Filip y col. (2001)

3,4-DCQ = 3,4 ácido dicafeoilquínico; 3,5-DCQ = 3,5 ácido dicafeoilquínico; 4,5-DCQ = 4,5 ácido dicafeoilquínico

2.7.2. Xantinas

Las xantinas son una clase de alcaloides de purina encontradas en muchos tipos de plantas, incluyendo el té, el café y el chocolate. Las xantinas presentes en la yerba mate son la teofilina (1,3 dimetil xantina), la teobromina (3,7 dimetilxantina) y la cafeína (1,3,7 trimetil xantina) (Athayde y col., 2000). La Figura 2.15 muestra las fórmulas estructurales de estos compuestos. De las tres, la cafeína es aquella que se encuentra en mayor concentración, 1 a 2% en masa seca, seguida de la teobromina, 0.3 a 0.9% en masa seca (Ito y col., 1997). Estos dos compuestos se encuentran principalmente en las hojas de la planta y en menor concentración en los brotes de los tallos (Athayde y col., 2000). La concentración de cafeína en relación a su consumo es de 78 mg de la misma en una taza de mate cocido (aproximadamente 150 mL). Esta cantidad es similar a la presente en una taza de café (85 mg por taza). Sin embargo el grado de consumo de mate, preparado por el método tradicional presenta ingestas de aproximadamente 500 mL, consumiéndose 260 mg o más de cafeína (Mazzafera 1997). A diferencia de la teobromina y la cafeína, la teofilina se ha encontrado en las hojas sólo en pequeñas cantidades. Esto puede deberse al hecho de que la teofilina parece ser un intermediario en el catabolismo de la cafeína en la planta. Se cree que la ruta principal de catabolismo de la teofilina involucra la conversión a 3-metil xantina, la cual es demetilada a xantina antes de seguir la ruta de catabolismo de la purina, siendo degradada siguiendo la vía: xantina → ácido úrico → alantoína → ácido alantóico → CO₂ + NH₃.

Se ha visto que cuando la teofilina es marcada radiactivamente, la marca aparece en la cafeína y la teobromina a través de la resíntesis de cafeína por la vía teofilina → -metilxantina → teobromina → cafeína (Ito y col., 1997). El hecho de que haya sido difícil encontrar la teofilina en distintos ensayos realizados sobre *Ilex paraguariensis* puede deberse a la metabolización de teofilina a cafeína y teobromina.

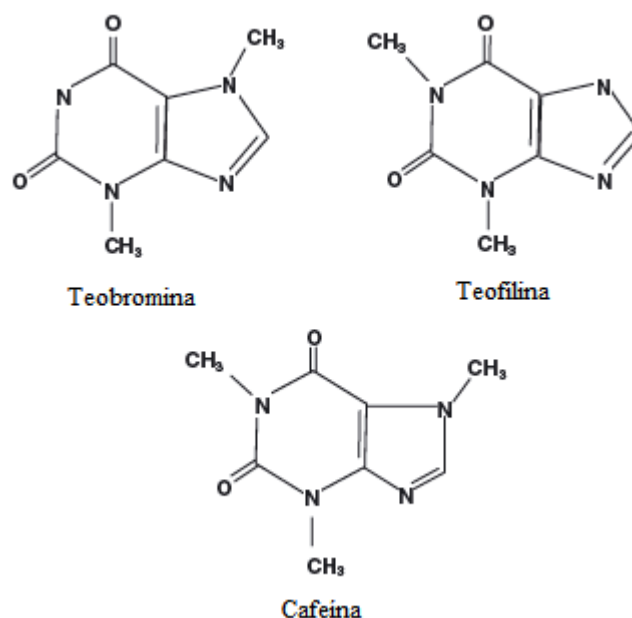


Figura 2.15: Estructura de las xantinas presentes en *Ilex paraguariensis*

La yerba mate es vendida generalmente como hojas secas; se ha sugerido que el proceso de secado puede afectar significativamente la concentración de cafeína así como el color y el contenido de clorofila en las hojas. Schmalko y colaboradores (2001) examinaron la cafeína, el color y el contenido de clorofila de hojas de yerba mate luego de tres pasos de secado. El primer paso fue el sapecado, con una temperatura de 500 a 550°C por 2 a 4 minutos; el segundo y tercer paso fueron los pasos de secado en barbacoá, con una temperatura de aproximadamente 110°C. Estos pasos de secado mostraron una disminución importante en las concentraciones de cafeína (30%) y clorofila (70 a 80%) y una disminución en el color verde. Sin embargo, aunque la concentración de cafeína es menor en el producto con el proceso de secado que en las hojas frescas, hay evidencias aportadas por Bastos y colaboradores (2006) que muestran que al preparar la infusión (mate), se extrae significativamente más cafeína y ácidos cafeoilquínicos cuando se usan hojas secas. Este aumento en la extracción de compuestos se debe a la disrupción de las células durante el proceso de secado. También puede explicarse debido a la disminución de la humedad de las

hojas y un aumento en los sólidos solubles durante el secado, llevando a un aumento la cantidad de compuestos disueltos en la infusión. También hay evidencias de que el tiempo de cosecha incide en la concentración de las metilxantinas en yerba mate, hallándose en el rango de 1 a 10 mg de metilxantinas totales.g⁻¹ según el tiempo de cosecha (Schubert y col., 2006).

2.7.3. Saponinas

Las saponinas son compuestos amargos y altamente solubles en agua que pueden encontrarse en gran variedad de plantas y se cree que cumplen un papel importante en el sabor de la infusiones de yerba mate. También se les han atribuido propiedades anti inflamatorias e hipocoleterolémicas (Gnoatto y col., 2005). Algunos de estos compuestos, llamados saponinas triterpenoides con grupos funcionales ursólico y oleanólico, han sido aislados de las hojas de yerba mate. Las principales saponinas identificadas, conteniendo ácido ursólico como grupo funcional fueron llamadas Metasaponinas 1, 2, 3, 4, y 5 (Gosmann y col., 1995; Kraemer y col., 1996).

La Tabla 2.5 muestra las principales saponinas identificadas en *Ilex paraguariensis* y otras especies de *Ilex*, incluyendo los grupos R comunes.

La Figura 2.16 muestra la estructura genérica de una saponina aglicona en la que están unidos los grupos R. Las propiedades hipocolesterolémicas pueden estar atribuidas a que las saponinas de la yerba mate inhiben la difusión pasiva de ácido cólico y la formación de micelas que no pueden ser absorbidas y por lo tanto son excretadas (Ferreira, 1997).

Gnoatto y col. (2005) desarrollaron un método utilizando HPLC con detección ultravioleta (UV) para el análisis de saponinas en plantas. En yerba mate, la recuperación total de Metasaponina 1 fue 94.5% y la concentración total de saponinas en el extracto acuoso fue 352 µg.mL⁻¹ de 15 gramos de hojas secas en 100 mL de agua.

Aunque las principales saponinas están formadas por agliconas de ácido ursólico, se encontraron dos saponinas menores que contenían ácido oleanoico (Martinet y col., 2001). Pavei y col. (2007) también desarrollaron y validaron un método de HPLC para caracterizar saponinas de frutos de *Ilex paraguariensis*.

Se informó que ciertas saponinas de especies *Ilex* han mostrado propiedades antiparasitarias, incluyendo las Metasaponinas 1,3 y 4. También se ha confirmado que triterpenoides de especies *Ilex* actúan contra el parásito *Trypanosoma brucei* (Taketa y col., 2004).

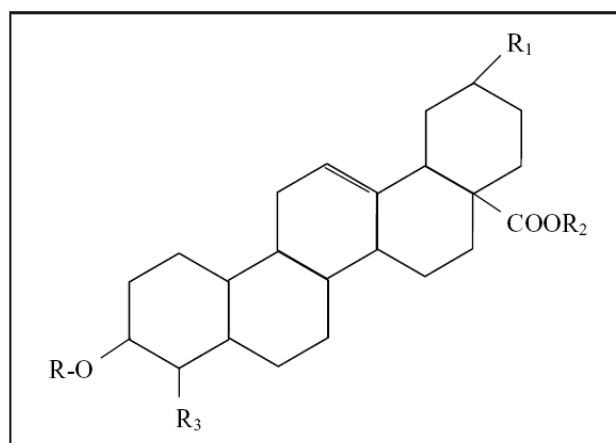


Figura 2.16: Estructura genérica de una saponina con la ubicación de los grupos sustituidos comunes

Tabla 2.5: Saponinas de especies *Ilex* y sus diferencias en la estructura, según los grupos sustituyentes R.

| Especie <i>Ilex</i> | Saponina | Grupo funcional | R | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|------------------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------|---------------------|--------------------|
| <i>paraguariensis</i> ^a | Metasaponina 1 | Acido ursólico | glc (1→3)ara | H | glc | H |
| | Metasaponina 2 | Acido ursólico | glc (1→3)rha(1→2)ara | H | glc | H |
| | Metasaponina 3 | Acido ursólico | glc (1→3)ara | H | glc(1→6)glc | H |
| | Metasaponina 4 | Acido ursólico | glc (1→3)rha(1→2)ara | H | glc(1→6)glc | H |
| | Metasaponina 5 | Acido ursólico | glc (1→3)rha(1→2)ara | H | glc(1→4)glc(1→6)glc | H |
| <i>affinis</i> ^b | Affinosido I | Acido pomólico | glc (1→3)ara | H | glc | H |
| <i>crenata</i> ^c | Ilexosido II | Acido pomólico | glc (1→3)ara | H | glc | H |
| <i>integra</i> ^d | Ilexosido XXV | Acido hidroxieursólico | glc | H | glc | CH ₂ OH |
| | Ilexosido XXVI | Acido hidroxieursólico | glc (1→6)glc | H | glc | CH ₂ OH |
| | Ilexosido XXVII | Acido rotúndico | ara | H | glc | CH ₂ OH |
| <i>buxifolia</i> ^b | Buxifoliósido I | Acido dihidroxieursendioico | H | H | glc | CH ₃ |
| <i>dumosa</i> ^e | Chikusetsusaponina Iva | Acido oleanólico | gluA | H | glc | H |
| | Dumosaponina 5 | Acido oleanólico | glc (1→2)gal | OH | glc | H |
| | Dumosaponina 6 | Acido oleanólico | ara (1→2)ara | H | glc | H |
| | Dumosaponina 7 | Acido oleanólico | gal | H | glc | H |
| <i>latifolia</i> ^f | Latifoliósido F | Ilexgenina | rha (1→2)glc(1→3)ara | H | rha(1→2)glc | H |
| | Latifoliósido G | Acido pomólico | rha (1→2)glc(1→3)ara | H | rha(1→2)glc | H |
| | Latifoliósido H | Acido siarecinolico | rha (1→2)glc(1→3)ara | H | rha(1→2)glc | H |
| <i>argentina</i> ^g | N/A | Acido rotundioico | H | H | glc | COOH |
| <i>rotunda</i> ^h | Ilexosidos XXXIII | Acido oxosiarecinolico | GlcA | H | H | CHO |
| | Ilexosidos XXXIV | Pedunculósido | SO ₃ Na | H | glc | H |
| | Ilexosidos XXXV | Acido rotungénico | SO ₃ Na | H | glc | CH ₂ OH |
| | Ilexosidos XXXVI | Acido rotungénico | glc | H | glc | CH ₂ OH |
| | Ilexosidos XXXVII | Acido rotúndico | glc | H | glc | H |
| <i>brevicuspis</i> ⁱ | Brevicuspisapinina I | Acido hidroxieursólico | ara | H | H | CH ₃ |
| | Brevicuspisapinina II | Acido hidroxieursólico | ara | H | H | CH ₂ OH |

gluA= acido glucurónico; glc= glucosa; gal= galactosa; ara: arabinosa; rha: rhamnosa; SO₃Na: sulfato.

^aGnoatto y colaboradores (2005); ^{b,c}Taketa y colaboradores (2004); ^dYano y colaboradores (1993); ^ePires y colaboradores (1997)

^fOuyang y colaboradores (1998); ^gPires y colaboradores (2002); ^hAmimoto y colaboradores (1993); ⁱTaketa y colaboradores (2000)

2.7.4. Minerales

La yerba mate contiene altas concentraciones de compuestos inorgánicos. Los minerales aluminio, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel, potasio, y cinc son de particular interés

debido a su importancia en el metabolismo y desarrollo humano. Usando electroforesis capilar de iones con detección indirecta de UV (Carducci y col., 2000) y espectrometría de absorción atómica (Tenorio Sanz y col., 1991; Vera García y col., 1997), estos minerales han sido identificados en concentraciones variables y esta variación se debe a factores como el suelo y las estaciones del año. Usando emisión de rayos X inducida partícula inducida (PIXE), Giulian y col. (2007) hicieron ensayos en distintas marcas de té de yerba mate antes y después de la infusión y encontraron un amplio rango de minerales y que algunas concentraciones dependían de la temperatura y el volumen usado en la infusión, caso del cloro y el potasio. Wrobel y col. (2000) hallaron concentraciones de manganeso de $2223 \pm 110 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, indicando que la yerba mate podría ser una buena fuente dietaria de metal, dependiendo de su biodisponibilidad. También se halló una correlación inversa (coeficiente de correlación mayor a 0.82) entre la cantidad de lixiviados de estos minerales en la infusión y la concentración de taninos; a baja concentración de taninos se observó el mejor lixiviado, excepto en el caso del níquel. Se han encontrado contaminantes tóxicos que también pueden estar presentes en la yerba mate. Marchisio y col. (2005) desarrollaron un método de análisis de plomo usando nebulización ultrasónica asociada a espectrometría de emisión óptica de inductividad acoplada a plasma (USN-ICP-OES) y espuma de poliuretano. El método permitió determinar plomo rápidamente y en pequeñas cantidades. Las concentraciones en infusiones de la planta encontradas estuvieron en un rango de 7.6 y 8.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La concentración promedio en muestras té de Mate comercial analizada fue de 8.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. El límite para plomo en agua de bebida según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) es 15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, estando los niveles por debajo del mismo (EPA 2003).

2.8. Código Alimentario Argentino e *Ilex paraguariensis*

El Código Alimentario Argentino (CAA) define a la yerba mate como el producto formado por las hojas del "*Ilex paraguariensis*" (Saint Hilaire) desecadas, ligeramente tostadas, rotas o groseramente pulverizadas, a veces con fragmentos de ramas secas jóvenes, pecíolos y pedúnculos florales (Artículo 1193).

El artículo 1195 establece que la yerba mate, para ser considerada apta para al consumo, deberá presentar las siguientes características:

1. Contener menos del nueve punto cinco por ciento (9.5%) de humedad.
2. Encontrarse en buen estado de conservación y contener como máximo un 1.0% de sustancias vegetales extrañas.
3. Contener menos del nueve por ciento (9%) de cenizas totales.

4. Contener menos del uno y medio por ciento (1.5%) de cenizas insolubles en ácido clorhídrico al diez por ciento.
5. Contener un mínimo de 0.6% de cafeína (sobre producto seco)
6. El extracto acuoso, sobre el producto seco, debe ser como mínimo del 25%.

El artículo 1194 da las características de las distintas formas de comercialización de la yerba mate:

1. Yerba Mate Canchada: es la yerba zapecada, secada y groseramente triturada.
2. Yerba Mate Elaborada: es la yerba canchada que ha sido sometida a procesos de zarandeo, trituración y molienda, tal que se ajuste a las siguientes clasificaciones:
3. Yerba Mate Elaborada o Yerba Mate Elaborada con Palo: es la yerba que contiene no menos del 65 % de hojas desecadas, rotas o pulverizadas y no más del 35 % de palo grosera y finamente triturada, astillas y fibras del mismo. Con el fin de determinar la cantidad total de palo, se utilizarán los tamices de abertura de 1 x 20 mm. y N° 40 (cuarenta mallas, por pulgada). La fracción retenida sobre el tamiz de 1 x 20 mm. será considerada palo y no deberá ser inferior, al 12,5 % en peso de la muestra analizada. La fracción que pasa por el tamiz N° 40 será considerada hoja. Con una alícuota de la fracción retenida en el tamiz N° 40 proveniente de sucesivos cuarteos, se procederá a extraer con pinza las astillas y cáscaras de palo presentes con lo que se cuantificará la cantidad de palo en dicha fracción. Este porcentaje, más el retenido en el tamiz de 1 x 20 mm. conformará el porcentaje total de palo de la muestra analizada. El cien por ciento de la muestra analizada deberá pasar por un tamiz cuya abertura sea de 5 x 70 mm.
4. Yerba mate tostada: Es la yerba mate elaborada sometida posteriormente a un proceso de tostación.
5. Yerba Soluble, Mate Instantáneo, Extracto de Mate en Polvo, Concentrado de Mate: Es el producto en polvo resultante de la deshidratación de los extractos acuosos obtenidos exclusivamente de la yerba mate".

2.9. Adulterantes de yerba mate

Adulterantes de otras especies de *Ilex* pueden ser incorporados en el producto final, intencionalmente o no. Se investigaron en seis especies de *Ilex* encontradas como adulterantes de té de yerba las cantidades de teobromina, teofilina y cafeína. Las especies analizadas fueron *I. dumosa*, *I. pseudobuxus*, *I. brevicuspis*, *I. theezans*, *I. microdonta*, e *I. argentina*. Como resultado se obtuvo que estas especies contenían pequeñas cantidades o ninguna de los

compuestos investigados. Sólo se encontraron trazas de cafeína se encontró en *I. theezans*, *I. dumosa*, *I. microdonta* e *I. pseudobuxus*. Sólo trazas de teobromina se encontró en *I. argentina* e *I. microdonta*. La teofilina fue sólo cuantificable en *I. pseudobuxus* a 6 ppm (Filip y col., 1998). Utilizando HPLC y NMR para analizar cafeína y teobromina de variedades de *Ilex*, se encontraron estas xantinas sólo en *Ilex paraguariensis* al compararse con sus adulterantes (Reginatto y col., 1999; Choi y col., 2005).

Las especies de *Ilex* adulterantes pueden ser problemáticas en la calidad del té de yerba debido a sus diferencias en la concentración de saponinas. El té de yerba preparado con la planta de *Ilex paraguariensis* demostró ser menos amargo que todos los extractos preparados con las especies adulterantes. Por lo tanto, es posible que la adición de estas especies pueda tener un efecto significativo en el sabor amargo de las bebidas hechas con yerba mate. No sólo las plantas adulterantes pueden tener grandes concentraciones de compuestos amargos, sino que los frutos de la planta de *Ilex paraguariensis* también contienen saponinas amargas. Si estos frutos fueron incorporados a los productos del mate, esto incrementaría el sabor amargo disminuyendo su calidad (Taketa, 2004).

A una cantidad de especies comúnmente usadas como adulterantes, se les analizó la concentración de saponinas y se encontró que en la mayoría de estas especies, incluyendo *I. buxifolia*, *I. crenata*, *I. affinis*, *I. rotunda*, *I. brevicuspis*, *I. argentina* e *I. integra*, tienen saponinas agliconas que no se hallan en *I. paraguariensis* e *I. dumosa*; en lugar de agliconas de ácido ursólico y ácido oleanólico, poseen ácido hidroursólico o sus derivados. De todas las especies de *Ilex*, *I. dumosa* es el adulterante más importante y con saponinas de estructura similar a *Ilex paraguariensis*. Debido a la especificidad de las saponinas, es posible identificar adulterantes yerba mate basándose en la concentración de estas sustancias (Pires y col., 1997).

2.10. Características de la planta *Ilex dumosa* var. *dumosa*

Habita lugares pantanosos, en campos o selva húmeda es frecuente en la ribera de arroyos. Se distribuye en Brasil (Rio Grande do Sul, Mina gerais, Paraná, Santa Catarina) Uruguay Paraguay y en la Argentina en Misiones sobre la ribera del Río Uruguay.

2.10. 1. Morfología externa

Es un árbol o arbusto pequeño (1-8m de altura). Sus ramas jóvenes son generalmente pubescentes, de corteza de color pardo o castaño oscuro a veces grisáceo o verdoso. Dioico.

Sus hojas poseen pecíolo casi siempre pubescente, limbo coriáceo, forma obovada, oblanceolada o elíptica. Margen aserrado, revoluto, base aguda (Fig.2.17). Ápice retuso, retuso mucronato u obtuso raramente agudo.



Figura 2.17: Hoja de *Ilex dumosa* Reissek

2.10. 2. Morfología interna

En la hoja en vista superficial se observa unas cutículas ornamentadas, con una epidermis superior con células de contornos ondulados, epidermis inferior con células con contornos levemente ondulados, posee tricomas en ambas epidermis, estomas anomocíticos o ciclocíticos en la epidermis inferior.

En un corte transversal de la hoja se observa una estructura dorsiventral o bifacial con una cutícula gruesa y ornamentada, epidermis superior uniestratificada, sin estomas.

En el mesófilo dos hileras de parénquima en empalizada hacia la epidermis superior y parénquima lagunosos braciiforme hacia la epidermis inferior.

Contiene sustancias cristalinas como oxalato de calcio en forma de drusas dispuestas en el parénquima lagunoso.

El sistema vascular de la nervadura principal constituido por un haz colateral con un casquete de esclerenquima y vaina del haz completa de células parenquimáticas

Hacia la epidermis inferior cutícula gruesa con estomas e hidatodes.

2.10.3. *Ilex dumosa* y el Código Alimentario Argentino

- Debates sobre la incorporación de *Ilex dumosa* al Código Alimentario Argentino (CAA)

La gestión de la empresa correntina Las Marías para que la Comisión Nacional de Alimentación de la Nación (CONAL) reconozca a la variedad *Ilex dumosa* como yerba mate

dentro del Código Alimentario generó una polémica en la tomaron partido abiertamente algunos medios.

El diario EL TERRITORIO de Misiones, por ejemplo, editorializó en su columna dominical "La Marcha de los Días" un severa crítica al Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM), sobre el que ironiza llamándolo "IPYM SA" (léase Instituto Provincial de la Yerba Mate Sociedad Anónima). El medio periodístico provincial, que fuera adquirido hace algunos años por la familia Navajas Artaza (propietaria de Las Marías) y que pasa por enormes dificultades financieras, tomó partido decididamente por el grupo empresario que lo sostiene y embistió contra el representante del sector de la molinería en el INYM, porque "pretendía impedir que la Comisión Nacional de Alimentación de la Nación (CONAL) reconozca a la variedad *Ilex dumosa* como yerba mate dentro del Código Alimentario".

"El detractor de *Ilex dumosa* advirtió que la principal característica de este tipo de yerba es que se la puede cultivar tanto en suelos rojos profundos como en bajos y húmedos, a diferencia de *Ilex paraguariensis*, que sólo se desarrolla en la tierra colorada característica de Misiones y el norte correntino. También dijo que si la CONAL la igualaba a la yerba mate como alimento, podrían surgir nuevas zonas productoras e ingresar al mercado para competir con la yerba tradicional; además que, consecuentemente, fomentaría la competencia con los productores misioneros y elaboradores locales", detalló el diario.

Por su parte Las Marías afirmó que la variante *Ilex dumosa* permitiría ampliar el consumo de yerba mate. El establecimiento correntino pidió que se incorpore esta variedad al Código Alimentario Nacional. "Abriría una oportunidad para la actividad yerbatera", sostuvo la empresa.

Señaló un comunicado de la empresa que "la especie investigada presenta excelentes características agronómicas y adaptación a la región yerbatera argentina, específicamente en los mismos suelos rojos y profundos que *Ilex paraguariensis*; su composición química y la de sus infusiones presentan un reducido contenido de xantinas (cafeína, teobromina y teofilina) y los estudios nutricionales, farmacológicos y toxicológicos realizados concluyen que es apta para el consumo humano".

Argumentaron también que desde 1995, con la colaboración de instituciones académicas y científicas del país, como el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), la Universidad Nacional de Misiones UNaM, la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), la Universidad de Buenos Aires (UBA) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), el Establecimiento Las Marías inició un proyecto de investigación y desarrollo tendiente a obtener una innovación de la yerba mate, con características similares a

la tradicional en cuanto a presentación, sabor, aroma y color, pero que naturalmente tuviera menos cafeína. “Y todo esto con el único objetivo de permitir la incorporación al consumo del mate a quienes hoy no lo toman, y a otros que - por diferentes razones - se están alejando o disminuyendo su consumo, y que podrían volcarse nuevamente tras comprobar las bondades de la nueva alternativa”, sostuvo la empresa. Para ello estudiaron las otras especies del género *Ilex*, al que pertenece la yerba mate, incluyendo una exhaustiva revisión bibliográfica y de las reseñas históricas de las Misiones Jesuíticas y época colonial, para luego evaluar las plantas de la Colección de Ejemplares del INTA Misiones. Así eligieron la especie *Ilex dumosa*, conocida como "caá-miní" por los guaraníes y jesuitas; "Yerba señorita" para los criollos o "congonha miuda" en el Brasil, teniendo en cuenta que cubría los requerimientos básicos para el producto buscado y existían contundentes antecedentes de su cultivo, elaboración y consumo antaño.

Mediante un acuerdo con el INTA, propietario de las plantas, se llevó a cabo la cosecha y elaboración experimental de "yerba señorita", al estilo de la yerba mate a fin de efectuar todos los análisis químicos, nutricionales y de aptitud para el consumo humano. Esos estudios se llevaron adelante en las Facultades de Ciencias Exactas y Naturales y de Medicina, de la UNNE, como así también en la UBA y CONICET.

Tal como lo indica la legislación argentina, la información obtenida y los resultados de los ensayos se presentaron a las diferentes instancias y autoridades de Bromatología provinciales, regionales y nacionales, a partir de febrero de 1998, solicitando su incorporación al Código Alimentario Argentino en el Capítulo XV "Productos Estimulantes o Fruitivos". Cinco años después, completados los requisitos exigidos, el tema fue elevado al tratamiento en la CONAL (Comisión Nacional de Alimentos), cuyos miembros tuvieron la responsabilidad de evaluar la propuesta presentada por Las Marías.

Mientras tanto, se concretaron Acuerdos de Trabajo con el INTA Regional Misiones para desarrollar las técnicas de cultivo, financiados por Las Marías, que culminaron en agosto de 2002 con la firma del Convenio de Vinculación Tecnológica INTA - LAS MARÍAS, para la "Selección, multiplicación, evaluación, manejo y difusión del cultivo de la especie".

Según la Dirección de Industria, "la modificación propuesta al artículo 1193 coloca en condición de producto genuino a ambas especies y sus mezclas en cualquier proporción, con lo cual se modificaría la esencia del producto yerba mate porque su contenido de cafeína sería incierto. Consecuentemente debería modificarse también el artículo 1195", que indica que la yerba mate elaborada debe poseer un mínimo de 0,6 por ciento de cafeína. La provincia sugirió entonces que la CONAL -la única entidad facultada para modificar el

Código Alimentario-, no sólo mantenga inalterado el artículo 1193; recomienda además que autorice la elaboración de la dumosa como sustituto, pero que especifique "claramente" que las mezclas no declaradas, "o las que no se ajusten a lo declarado y/o legislado, serán adulteraciones de la yerba mate genuina".

Pero el documento del Gobierno "carece de pretensiones científicas", según lo admitió el ingeniero químico Rodolfo Kanzig, titular de la Coordinación Técnica de la Dirección de Industria que depende del Ministerio del Agro. Contradictorio, el informe aseguró que "no existe seguridad sobre el contenido o no de cafeína en el producto y eventualmente cuáles son los contenidos máximos y mínimos". Ni el departamento de bromatología de la provincia, cuyo Departamento Laboratorio está ubicado en la misma sede de la Dirección, analizó jamás una muestra de *Ilex dumosa* para elaborar el informe.

Sin embargo, el mismo Kanzig conocía la planta desde hace por lo menos diez años. En 1993 publicó junto a Bertoni, Prat Kricun y Cattaneo un estudio financiado por la Secretaría de Estado de Ciencia y Técnica (SECYT) y el CONICET en el que anticipaba que "la elaboración de un producto sin cafeína sería viable partiendo de hojas de especies *Ilex* que no la contengan y siempre que los procesos de elaboración (que comprenden las mismas etapas para la producción de "yerba mate") lleven a un producto final con características organolépticas aceptables para el consumidor".

"La expresión 'yerba mate' o 'yerba', esta última sin otro calificativo (según definición impresa en el CAA desde 1971 al presente), implica que son términos equivalentes respecto de la materia prima usada en su elaboración y de las exigencias físico-químicas a las que deberá responder, entre ellas el contenido mínimo de cafeína (0,6 por ciento). Ello lleva a pensar que indiscutiblemente en el producto yerba mate o simplemente yerba, su elaboración deberá partir de hojas de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire y no de otras especies de *Ilex* que no contengan cafeína y un tenor al antes señalado por el código", precisó el trabajo de Kanzig, lo que potencialmente dejaría excluida, a *Ilex dumosa* "por no contener cafeína y que entrarían a considerarse como adulterantes".

Sin embargo, el mismo documento científico planteó un interrogante. "Similar problema presentan aquellos productos llamados "yerba mate compuesta" o "yerba mate aromatizada" que comprenden a las que contienen "yerba mate" elaborada y un porcentaje (del 40 por ciento según el artículo 1198, de la resolución 307 del 29 de noviembre de 1990) de una o varias hierbas sápidas aromáticas de reconocida inocuidad fisiológica, en la forma habitual de su uso, etc. etc. ya que el efecto diluyente (presencia de otras hierbas sápidas aromáticas carentes de cafeína) el nivel de la primera (yerba mate) podría resultar inferior al mínimo

antes mencionado, valor sobre el cual, por otra parte, no hace mención alguna dicha resolución". El ingeniero químico lo dijo en 1993 puesto que tres años antes de haber sido publicada su tesis científica, una de las tantas resoluciones que modificó del concepto de yerba mate en el CAA, había añadido la autorización de la "inclusión de otras especies de igual género, tan pronto como se disponga de estudios que avalen su inocuidad y sean aprobadas por la Autoridad Sanitaria Nacional".

- Incorporación de *Ilex dumosa* al CAA

Luego de tres años de análisis y debates, la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) decidió preservar la denominación de "yerba mate" de manera exclusiva para *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire; desestimando de esta manera incorporar otras variedades como *Ilex dumosa*. La Resolución Conjunta de las secretarías de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias, y la de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SACIF y A) fue firmada el 29 de septiembre de 2006. Mediante este documento se modificaron los artículos 1192 y 1193 del Código Alimentario Argentino. De esta manera, por un lado, se determinó la inclusión de la *Ilex dumosa* en el capítulo de "Hierbas para Infusiones", donde comparte la denominación con vegetales utilizados para infusiones como anís, boldo, Cedrón y menta; entre otros. Por otro lado, la resolución dejó en claro que la denominación "yerba mate" es exclusiva para *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire; es decir, la variedad que tradicionalmente se utiliza para la elaborar la infusión.

En sus consideraciones, la resolución 41/2006 y 641/2006 indicaron que la firma Establecimiento Las Marías solicitó la inclusión al Código Alimentario Argentino de la especie *Ilex dumosa* Reissek en el Capítulo XV "Productos Estimulantes o Fruitivos", donde se aborda el tema yerba mate.

Al momento de presentar la propuesta, la empresa correntina argumentó que *Ilex dumosa* podía ser una variante de la tradicional infusión, sobre todo debido a su menor contenido de cafeína. Sin embargo, prácticamente todo el resto del universo yerbatero se opuso a la iniciativa, ya que consideró (al igual que los yerbateros del Brasil) a esa variedad ajena a la yerba mate. "La yerba mate se produce única y exclusivamente a partir de *Ilex paraguariensis* y no de otra planta, y es evidente que las modificaciones propuestas a los artículos 1193 y 1194 del CAA constituyen un intento de usurpación y utilización del nombre de un producto que se encuentra impuesto en el mercado, cual es la Yerba Mate, para lograr la introducción y expansión en el mercado de otro producto que ninguna relación tiene con la Yerba Mate o *Ilex paraguariensis* y no es igual a ésta en sus características físicas y

químicas", había remarcado el INYM, a fines del año 2003, cuando salió a sentar postura sobre la cuestión.

Finalmente, los organismos responsables optaron por aceptar las recomendaciones efectuadas por la Comisión Nacional de Alimentos y dieron un cierre definitivo a uno de los temas que habían generado polémica en el ámbito yerbatero.

Textos corregidos:

Artículo 1° - Sustitúyese el artículo 1192 del Código Alimentario Argentino el que quedará redactado de la siguiente manera: "*Art. 1192: Con la denominación de Hierbas para Infusiones se entienden los siguientes vegetales: Anís, Boldo, Carqueja, Cedrón, Dumosa (Ilex dumosa R.), Incayuyo, Lusera, Manzanilla, Marcela, Melisa, Menta, Peperina, Poleo, Rosa Mosqueta, Romero, Salvia, Tilo, Tomillo, Zarzaparrilla y otros que en el futuro se incorporen, solos o mezclados.(...)Estos productos se rotularán con el nombre del vegetal correspondiente como: Boldo, Poleo, Manzanilla o mezcla de hierbas.*

Art. 2° - Sustitúyese el artículo 1193 del Código Alimentario Argentino, que quedará redactado de la siguiente manera: "*Art. 1193: Con la denominación de Yerba Mate o Yerba se entiende el producto formado por las hojas desecadas, ligeramente tostadas y desmenuzadas, de Ilex paraguariensis Saint Hilaire (Aquifoliácea) exclusivamente, mezcladas o no con fragmentos de ramas secas jóvenes, pecíolos y pedúnculos florales.*"

El agregado de otra especie, aún del mismo género, en la elaboración de yerba mate constituiría una adulteración.

2.11. Yerba mate: Actividad biológica y efectos a la salud

La Tabla 2.6 muestra una lista de compuestos que han sido identificados en yerba mate y sus actividades biológicas más importantes informadas

2.11.1. Capacidad antioxidante

Se ha encontrado que el consumo de té de yerba mate contribuye significativamente a la ingesta de sustancias antioxidantes y provee altas cantidades de derivados de ácido cafeoilquínico, con efectos potencialmente benéficos para la salud humana (Bravo y col., 2007). De todas las especies de *Ilex*, *I. paraguariensis* ha mostrado contener una alta actividad antioxidante, correlacionada con la concentración de cafeoil derivados (Filip y col., 2000; Schinella y col., 2000; Bracesco y col. 2003; Bixby y col., 2005). El estudio de la habilidad del mate para eliminar especies reactivas de oxígeno (ERO) ha sido correlacionado con una actividad similar a la peroxidasa. Esto está altamente relacionado con la

concentración de polifenol en la planta; a mayor concentración de polifenoles, mayor actividad peroxidasa. Esto significa que los polifenoles actuarían de forma similar a las enzimas antioxidantes del cuerpo actuando como apoyo de las mismas. El componente que puede ser responsable primariamente de esta actividad es el ácido clorogénico (Anesini y col., 2006).

Los extractos acuosos de yerba mate han mostrado ser potentes inhibidores del estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ERO), en el hígado y el corazón.

El corazón es susceptible al estrés oxidativo durante la reperusión post isquémica, el retorno del flujo de sangre al órgano y al tejido luego de un ataque al corazón, causado por la generación de ERO. A través de la administración de extractos acuosos de yerba mate disminuyó la oxidación lipídica en el corazón protegiendo el tejido miocárdico (Schinella y col. 2005).

Estudios recientes han mostrado que el estrés nitrosativo, provocada por la reacción de superóxidos con óxido nitroso (NO) formando peroxinitrilo (ONOO), causa la nitración o la nitrosilación de proteínas, peroxidación lipídica, daño al DNA y muerte celular. El té de yerba previno el 95% de la nitración proteica cuando se ensayó en albúmina de suero bovino, siendo su acción mayor que cuando se realizó con té verde y vino tinto. También se hicieron ensayos contra citotoxicidad inducida por peroxinitrilo, asociada a accidentes cerebrovasculares, isquemia miocárdica, restricción en el suministro de sangre, y el té de yerba mate mostró una mayor inhibición sobre la citotoxicidad, comparado con té verde y vino tinto (Bixby y col., 2005). Se ha informado que el Mate reduce la hidrólisis de ATP, ADP y AMP ayudando al balance del sistema circulatorio (Gorgen y col., 2005).

Se ha informado que la hiperglicemia es una causa de complicaciones de la diabetes debido a dicarbonilos involucrados en formación de productos finales de glicación avanzada. La oxidación ha sido vinculada a la glicación y extractos acuosos de yerba mate mostraron una inhibición de la acción de los dicarbonilos dependiente de la dosis (Gugliucci y Menini 2002; Lunceford y Gugliucci, 2005).

Los extractos acuosos de *Ilex paraguariensis* inhibieron significativamente la peroxidación enzimática y no enzimática en microsomas de hígado de rata (Schinella y col., 2000). Se ha sugerido que la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida por radicales libres juegan un rol importante en la aterosclerosis. Se mostró que el mate inhibe la propagación de la oxidación de las LDL por inhibición de la peroxidación lipídica así como la oxidación del DNA (Gugliucci y Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Bracesco y col., 2003). Este mecanismo ha demostrado ser posible *in vitro*.

Evidencia también muestra que el mate posee mayor capacidad antioxidante que el té verde, 13.1 nmol capacidad antioxidante equivalente a Trolox⁶ (TEAC). μg^{-1} equivalentes de ácido gálico comparado con 9.1 nmol TEAC. μg^{-1} equivalentes de ácido gálico, respectivamente (Newell y col. 2007).

Tabla 2.6: Compuestos identificados en hojas de Yerba Mate y algunas de sus actividades biológicas.^a

| Compuesto | Actividades Biológicas |
|-------------------|--|
| Cafeína | Anticarcinogénico, antiobesidad, antioxidante, antitumoral, diurético, energizante de 20 a 200 mg, estimulante, inhibidor -I-topoisomerasa 0.1M, inhibidor -II-topoisomerasa 99mM, vasodilatador |
| Acido Clorogénico | Antioxidante IC_{50} = 54.2 μM , analgésico, antiaterosclerótico, antibacterial, antidiabético, antitumoral, colerético ^b |
| Clorofila | Antibacterial, anticáncer |
| Colina | Antidiabético, colinérgico, lipotrópico |
| Acido Nicotínico | Colerético, hipocolesterolémico de 1 a 6 g/día |
| Acido Pantoténico | Antialérgico de 100 a 500 mg/día, antiartrítico de 500 a 2000 mg/día, antifatiga Antioxidante IC_{28} = 30 ppm IC_{50} = 120 μM , antitumor, promotor antitumor, ^{b, c} |
| Rutina | antiúlceras, inhibidor AMP_c - fosfodiesterasa, inhibidor -II-topoisomerasa IC_{50} = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, vasodilatador ^b |
| Tanino | Antioxidante 1/3 quercitina IC_{50} = 1.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$, antitumor, promotor antitumor ^f |
| Teobromina | Inhibidor AMP_c IC_{50} = 0,06 mg/mL, inhibidor AMP_c - fosfodiesterasa, diurético de 300 a 600 mg/día, estimulante, miorelajante. ^b |
| Teofilina | Inhibidor AMP_c IC_{50} = 0,06 mg/mL, inhibidor AMP_c - fosfodiesterasa, diurético, colerético, estimulante, vasodilatador, miorelajante a 100 μM Analgésico, antioxidante IC_{50} = 10 μM , antiperoxidante IC_{35} = 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ^{b, d} |
| Acido Ursólico | inhibidor de proteasa IC_{85} = 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inhibidor-II- topoisomerasa, antiaritmico, anticáncer, antialzheimer ^e |

^a Adaptado de Duke (1992)

^b IC_{50} , Concentración máxima inhibitoria media: medida de la cantidad de sustancia para inhibir un proceso biológico a la mitad.

^c IC_{28} , Concentración máxima inhibitoria que inhibe el 28% de un proceso biológico.

^d IC_{35} , Concentración máxima inhibitoria que inhibe el 35% de un proceso biológico

^e IC_{85} , Concentración máxima inhibitoria que inhibe el 85% de un proceso biológico.

^f Antioxidante 1/3 quercitina: la sustancia tiene un poder antioxidante correspondiente a 1/3 del mostrado por la quercitina.

⁶ Medida de la capacidad antioxidante de una sustancia, comparada con el estándar Trolox. Este es el nombre comercial del ácido 6-hidroxi-2-tetrametilcroman-2-carboxílico, un derivado soluble de la vitamina E. La equivalencia Trolox es usada como una referencia para determinar la capacidad antioxidante de una mezcla.

2.11.2. Control de peso y obesidad

La obesidad es un tema de preocupación en muchos países y se hacen investigaciones en forma corriente en distintas áreas para hallar la forma de frenar esta enfermedad. Hay evidencias de que el té de yerba mate podría tener efecto sobre el área de pérdida de peso. Hombres y mujeres obesos que consumen infusiones de mate, han mostrado una disminución en el cociente respiratorio, indicando un aumento en la oxidación de la grasa (Martinet y col., 1999). En un estudio sobre 30 personas obesas, se demostró que la infusión de mate reduce el apetito, atribuyéndoselo principalmente a la presencia de xantinas, sinergizadas por la presencia de terpenos, resinas y ácido clorogénico. También se demostró una aceleración del metabolismo hepático y un incremento de la diuresis (De Pasquale, 1991). Una infusión de hierbas hecha con yerba mate, guarana y damiana mostró una drástica lentitud del vaciado gástrico así como una disminución en el tiempo percibido para el llenado gástrico y por lo tanto un aumento de la saciedad. A esto siguió una disminución dramática en el peso, luego de 45 días, en el peso general de los pacientes (Andersen y Fogh, 2001). El mate mostró tener potencial en la pérdida de peso y está siendo considerado como suplemento dietario. El agregado de mate, guarana y damiana en suplementos, fue efectivo en la pérdida de peso corporal (Pittler y Ernest, 2004). En una experiencia al azar, con doble ciego, con placebo, controlada por un jurado clínico se suministró Mate en forma de suplemento junto con té verde, asparagus, té negro, guarana y extractos de poroto arriñonado. Los resultados de este estudio mostraron que aquellos que tomaron el suplemento, habían reducido la grasa corporal y habían cambiado sus índices de masa corporal (Opala y col., 2006). Se ha citado que el efecto del Mate en la pérdida de peso podría ser debido a su concentración de cafeína, contribuyendo a la actividad lipolítica, o a la concentración de saponinas, interfiriendo con el metabolismo del colesterol y retrasando la absorción intestinal de la grasa dietaria (Dickel y col., 2007). El té de mate puede afectar también otros aspectos del metabolismo lipídico.

Tiene la habilidad de inhibir la aterosclerosis en conejos cuando son alimentados con una dieta de colesterol alta y extracto acuoso de yerba mate (Mosimann y col., 2006). Cuando se les suministró extractos de Mate a ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica, se encontró una reducción en las concentraciones de colesterol y triglicéridos en suero (Paganini Stein y col., 2005). El Mate también mostró tener potencial en la digestión debido al efecto colerético, aumentando la velocidad del fluido biliar (Golzalczany y col., 2001). Un estudio demostró que puede actuar como vaso relajador de lechos arteriales en ratas. Esto sugiere que este té puede disminuir el riesgo de enfermedad coronaria, así como lo hace el vino tinto

(Muchillo y col., 1998). La yerba mate se ha indicado como coadyuvante en tratamientos de sobrepeso (Vanaclocha, 1998; Cañigueral y col., 1998).

2.11. 3. Protección dental

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de hoja de mate se ensayó contra microorganismos seleccionados (Kubo y col., 1993), pero fundamentalmente contra *Streptococcus mutans* por su importancia en la formación de caries dentales (Hamada y Slade, 1980). Todos los constituyentes de dicha fracción volátil ensayados mostraron alguna actividad contra esta bacteria cariogénica, indicando su posible interés para la protección dental, sin embargo el rango de actividad de cada compuesto fue de moderado a leve.

2.11. 4. Efectos de la cafeína en el mate

Existen algunos trabajos publicados que indican efectos adversos del mate cuando se usa como bebida habitual, o por su uso crónico o prolongado. A dosis altas cabe la posibilidad de que aparezca excitación, insomnio, gastritis, náuseas y taquicardia por su alto contenido de cafeína. Por este mismo motivo, está contraindicado en caso de ansiedad, insomnio, taquicardia e hipertensión. También debería contraindicarse en el caso de gastritis y úlceras gastroduodenales.

En el sistema cardiovascular la cafeína produce taquicardia, extrasístoles y presión arterial elevada. A nivel del sistema digestivo, produce aumento de la acidez gástrica lo que ha sido comprobado en la población de Uruguay por el aspecto congestivo del estómago en estudios de fibrogastroscopía, indicando una gastritis superficial crónica (Pronczuk y col., 1987).

2.11. 5. Actividad mutagénica y genotóxica

2.11.5. 1. Determinación *in vitro* de mutagenicidad: Ensayo de *Salmonella* (Test de Ames)

La identificación de agentes capaces de inducir mutaciones constituye un importante procedimiento para evaluar la seguridad y los riesgos para la salud humana. Los agentes mutagénicos, ya sean físicos o químicos, son capaces de inducir el cáncer y ello ha derivado a la implementación de ensayos para evaluar la mutagenicidad. Las mutaciones génicas pueden ser detectadas en sistemas bacterianos u otras células debido a que la mutación causa algún cambio en los requerimientos necesarios para el crecimiento bacteriano mientras que un daño en el cromosoma de una célula de un mamífero puede ser evaluado mediante la observación de la ruptura o reordenamiento los cromosomas celulares.

Uno de los ensayos más utilizados para evaluar mutagenicidad es el de Ames: *Salmonella* /microsome mutagénesis assay (Ensayo de *Salmonella microsoma*, Ensayo de Ames). El "Test de Ames" es un ensayo de genotoxicidad *in vitro* que apunta a cuantificar el daño ocasionado al material genético y fue específicamente diseñado para detectar mutagénesis inducida químicamente (Ames y col. 1975). Este ensayo de mutagenicidad, es considerado una prueba primaria, ya que se realiza en bacterias. La cepa *Salmonella typhimurium* His⁻, o sea posee una mutación que no le permite crecer en ausencia de éste aminoácido. Estas cepas poseen características genotípicas y fenotípicas que le son propias (Tabla 2.7). Entre ellas, la capacidad de revertir espontáneamente la mutación His⁻ en His⁺, en un número repetible de colonias. Cuando son inducidas por sustancias de diversos orígenes (fármacos, aceites, alimentos, drogas etc.) aumenta el número de colonias por encima de la reversión espontánea determinando la actividad mutagénica del compuesto, en relación a la dosis del mismo. Se considera que una sustancia es mutagénica, cuando duplica el número de la reversión espontánea de éstas cepas.

Las distintas cepas *Salmonella* genéticamente modificadas, detectan diferentes tipos de mutágenos, compuestos que producen intercambio de pares de base o corrimiento de marco de lectura (TA100 y TA98 respectivamente). El "Ensayo de Ames" ha sido ampliamente aplicado para evaluar el potencial mutagénico de una variedad de compuestos de origen natural o artificial (Ames y col., 1975, Mortelmans y Zeiger 2000, Yen y Chen, 1996; Choi y col, 1997). Las cepas de *Salmonella* empleadas en el ensayo presentan diferentes mutaciones en varios genes en el operón histidina; cada una de estas mutaciones fue diseñada para presentar una respuesta al mutágeno que actúa por diversos mecanismos. Mutaciones adicionales fueron introducidas por ingeniería genética en esas cepas para hacerlas más sensibles a una amplia variedad de sustancias (Ames, 1971; Ames y col., 1973a; Levin y col., 1982a; Levin y col. 1982b; Maron y Ames, 1983). Como las bacterias pueden metabolizar los químicos vía citocromo P450, como en mamíferos y en otros vertebrados, un componente clave que hace útil a este ensayo es la inclusión de un sistema de activación metabólico de mamífero exógeno (Ames y col., 1973b; Mallin, 1971).

Por muchos años ha sido reconocido el "Ensayo de Ames clásico" por la comunidad científica, agencias de gobierno y corporaciones, actualmente, todos los grandes mercados internacionales, tales como OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), U.S.A. EC, (NIEHS, National Institute of Environmental Health Sciences, U.S.A.), (FDSC Food and Drug Safety Center, NIHS National Institute of Environmental

Health Sciences, Japon) Japon y Canadá exigen para el registro certificación, e implementación o licencia de productos, el Test de Ames clásico.

El "Ensayo de Ames" es empleado en todo el mundo como ensayo inicial para determinar el potencial mutagénico de nuevas sustancias químicas y drogas debido a su alto valor predictivo de carcinogenicidad en roedores (Mc Cann y col., 1975; Sugimura y col., 1976; Zeiger, 1985; Zeiger y col., 1990).

Tabla 2.7: Características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *Salmonella thyphimurium* empleadas en el Ensayo de Ames

| Cepa <i>Salmonella thyphimurium</i> | Genotipo | Fenotipo Rev/Esp | Mutágenos Diagnósticos |
|-------------------------------------|---|------------------|--|
| TA98 | HisD3052/uvrB/rfa/ pkM101 | 30 - 50 | 2AF +S9 2NF -S9 |
| TA100 | HisG46/uvrB ^r /rfa/ pkM101 | 120 - 200 | <i>B(a) pireno</i> +S9 MMS -S9 |
| TA102 | His428/uvrB ^r /rfa/ pkM101 y pAQ1 | 240 - 320 | MMS -S9 |
| TA97a | His01242/uvr/rfa/ pkM101 | 90 - 180 | Dex on -S9 |
| TA104 | His428/uvr/rfa/ pkM101 | 350 ± 75 | Crotonaldehido -S9 Methylglioxal - S9 |

2NF, 2 nitrofluoreno; 2AF, 2 aminofluoreno; MMS, sulfonato de metil metano
Dexon: pesticida

Las sustancias presentes en plantas medicinales resultan ser una fuente potencial de compuestos biológicos activos. No todas las especies son beneficiosas o saludables y pueden estar presentes sustancias tóxicas y mutagénicas en su composición fitoquímica (Vargas y col., 1991, Sá Ferreira y Vargas, 1999; Piloto Ferrer y col., 2009).

El ensayo con preincubación fue descrito primero por Yahagi et al. (1975), en el cual compuestos azo carcinógenos fueron encontrados mutagénicos. Este procedimiento se usó para detectar la mutagenicidad de nitrosaminas y algunos alcaloides hábiles y series de químicos volátiles. El aumento de la actividad fue atribuido al hecho de que el compuesto a ensayar, S9 mix y la bacteria son incubados a altas concentraciones durante la preincubación.

2.11.5. 2. Test de Ames y la actividad antimutagénica

El término “antimutagénesis” fue usado inicialmente por Novik y Szilard en el año 1951 cuando notaron que, la presencia de nucleótidos normales de purinas en un medio de crecimiento causaba una reducción significativa de la frecuencia de mutaciones de resistencia a los fagos en la población bacteriana. Kada en el 1984, postuló que la antimutagénesis es el proceso mediante el cual se reduce la frecuencia de mutaciones espontáneas o inducidas. Tomando como referencia este concepto, la acción antimutagénica de un compuesto queda definida como la característica o acción de esta sustancia para disminuir o evitar el daño mutacional en el ADN de la célula (antimutágeno).

Las frutas y vegetales contienen varias clases de fitoquímicos que presentan efectos antioxidativos, antimutagénicos y anticancerígenos (Kusamran y col., 1998; Nakamura y col. 1998) haciendo que la plantas sean útiles para el tratamiento de enfermedades como la aterosclerosis, cáncer y otros daños en humanos (Yen y col., 2001). Gran número de compuestos bioactivos se han identificado en nutrientes de origen vegetal y en bebidas que resultan ser protectores en los diferentes estadios del desarrollo del cáncer. Debido a los efectos reconocidos sobre la salud, tanto los vegetales como las plantas no contaminadas han ido incrementado su consumo en la población de algunos países, pero existe poca información acerca de su potencial riesgo en la salud de los humanos.

El uso de plantas consumidas como infusiones para el tratamiento de daños crónicos carecen de evidencia científica y sólo muy pocas plantas medicinales han atraído el interés de los científicos. Recientes investigaciones en esta área indican que metabolitos secundarios de las plantas identificadas como antimutágenos/ anticarcinogénicos son importantes constituyentes de las plantas medicinales. Sólo recientemente se le ha prestado atención a sustancias del ambiente o de la dieta que pueden presentar efecto protector contra sustancias químicas mutagénicas o carcinogénicas que actúan como iniciadores del proceso de la carcinogénesis. Se han informado una amplia variedad de compuestos fenólicos, particularmente los presentes en la dieta y plantas medicinales, que poseen actividades antimutagénicas y anticarcinogénicas siendo el mecanismo propuesto el bloqueo de carcinógenos electrofílicos en una reacción química nucleofílica para formar productos inocuos. Un continuo flujo de estos compuestos puede servir como regulador frente al daño del ADN.

Teniendo en cuenta que el Test de Ames, es un ensayo de reversión de la mutación del gen *his⁻* en las cepas testigo *Salmonella typhimurium*, estas cepas pueden revertir su condición mutante *His⁻* a *His⁺*, de forma espontánea o inducida. La reversión espontánea se produce en un número contable y con un rango repetible de colonias conforme a la especificidad de la

mutación de cada cepa testigo. Cuando las bacterias son expuestas a sustancias capaces de revertir la mutación His⁻ a His⁺ (reversión inducida), aumentan el número de colonias que sobreviven, volviendo a su forma salvaje. Es por esto que este ensayo evalúa la potencialidad mutagénica de diferentes sustancias, a través del mecanismo de mutagénesis (revirtiendo esta mutación). Existen químicos (mutágenos) de acción conocida (capaces de revertir la mutación his⁻ a his⁺), que son utilizados como control positivo y así poder comparar con la reversión espontánea de mutación de las cepas de *Salmonella typhimurium*. Así de esta manera este ensayo permite evaluar la mutagenicidad de diferentes sustancias (químicos, sustancias, compuestos, alimentos, aire particulado, aguas etc.) de origen desconocido. Estas cepas de *Salmonella typhimurium*, también permiten identificar el tipo de mutación que está involucrada, según la cepa empleada: Ej TA98 (*His D3052*): mutación de corrimiento de marco de lectura o TA100 (*HisG46*): intercambio de pares de base.

La evaluación de la antimutagenicidad, con el Test de Ames, se basa en el proceso inverso, donde alguna o algunas moléculas son capaces de interferir a través de algún o algunos mecanismos, e impedir la mutagénesis inducida por mutágenos de acción ya conocida (factor de riesgo para el material genético e inductor de mutagénesis). Esto hace que las bacterias *Salmonella* del ensayo de Ames, inducidas por un mutágeno, no puedan revertir la mutación del gen histidina (His⁻). Estas sustancias llamadas “quimioprotectoras”, se dividen en forma general en desmutágenos y bio-antimutágenos.

El término desmutágeno se refiere a aquellos agentes que actúan en forma directa con el mutágeno, modificando su estructura química o actuando bioquímicamente, es decir trayendo consigo reacciones de metabolización dentro del organismo antes de que el mismo alcance la molécula blanco.

Los bioantimutágenos, son agentes biológicamente activos que interfieren con las funciones celulares que determinan los procesos de mutagénesis o reparación del ADN dañado, conllevando a una disminución de la frecuencia de las mutaciones tanto inducidas como espontáneas. El efecto protector de los bioantimutágenos puede estar dado por el incremento en la fidelidad de la replicación del ADN, la estimulación de la reparación libre de errores y por la inhibición de los sistemas de reparo proclive a error (Simic y col., 1997).

En la bibliografía encontramos que muchos de estos compuestos (desmutágenos y bio-antimutágenos) se encuentran en las plantas, como los vegetales (frutas, semillas, jugos, hortalizas, infusiones con hierbas, tes, etc). Sin embargo se debe tener cuenta, que algunas sustancias en las plantas, expresan o pueden producir un efecto citotóxico o actividad genotóxica e inclusive mutagénica, y muestran una correlación con la incidencia de tumores

(Ames, 1983). Por esto, es indispensable el conocimiento profundo, tanto de la potencialidad tóxica de las plantas como de las propiedades beneficiosas de las plantas. Antimutagenicidad ha sido reportada en extractos de hierbas europeas (Natake y col. 1989), en plantas en la medicina china (Niikawa y col. 1995), vegetales y frutas (Morita y col. 1978), tes (Kojima y col. 1989), y especies (Watanabe y col. 1989)

Desde el punto de vista genético, el Test de Ames nos permite, por un lado una evaluación directa de la actividad o capacidad antimutagénico/a de ciertos alimentos específicamente infusiones en general, midiendo la capacidad de los mismos de inhibir la mutagenicidad de agentes mutagénicos (mutágenos). Las cepas de *Salmonella typhimurium* del ensayo de Ames, nos permiten además, inferir cual sería el probable mecanismo de acción involucrado, así como que tipo de mutación que no ha sido revertida (si un mutágeno revierte una mutación de intercambio de pares de base, o de corrimiento de marco de lectura, ya que cada cepa lleva con ella la especificidad de cada mutación).

2.11.5.3. Determinación *in vivo* del efecto clastogénico de los compuestos: Ensayo de Micronúcleo

El ensayo de Micronúcleo es un ensayo de mutagenesis *in vivo* que permite evaluar la capacidad de un compuesto para inducir alteraciones cromosómicas, tanto de tipo estructural como numérico. Es un ensayo que se realiza en roedores – ratas o ratones fundamentalmente- y, por lo tanto, como todos los ensayos *in vivo*, tiene la ventaja de que en él se pueden reproducir los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción del tóxico. No obstante, como todos ellos, también tiene la desventaja del problema de la extrapolación interespecífica.

Los micronúcleos (Mn), se originan a partir de la cromatina que se ha retardado en una fase de la división celular, la anafase; en el curso de la telofase este material se incluye dentro de una de las células hijas donde puede fusionarse con el núcleo principal o formar unos o varios núcleos secundarios. Estos, por ser considerablemente menores que el núcleo principal, son llamados micronúcleos (Fig. 2.18) (Schmid, 1975).

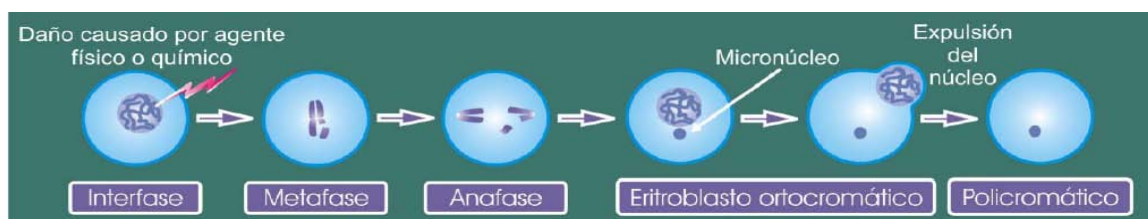


Figura 2.18: Representación esquemática de la formación de un micronúcleo.

Los micronúcleos se pueden formar en cualquier tipo de células de tejido proliferativo, pero la característica que hace practicable este ensayo de micronúcleos para el estudio de mutágenos, reside en que la gran mayoría de los Mn se presentan en los eritrocitos jóvenes anucleados (PCE) (Schmid, 1975) (Figura 2.19).



Figura 2.19: Imagen al microscopio óptico de eritrocitos anucleados con micronúcleo (400 X)

Los micronúcleos son cuerpos que contienen cromatina citoplasmática, se forman cuando los fragmentos de cromosomas acéntricos o cromosomas retrasados durante la anafase fallan al incorporarse en el núcleo de la célula hija durante la división celular. El daño genético que resulta en la ruptura del cromosoma genera cromosomas estructuralmente anormales, o anomalías del huso llevan a la formación de micronúcleos. La incidencia de los mismos sirve como índice de estos tipos de daño.

Se ha establecido que esencialmente todos los agentes que causan ruptura de la doble cadena de un cromosoma (clastógenos), inducen la formación de micronúcleos. La enumeración de micronúcleos es más rápida y menos demandante técnicamente que detectar aberraciones cromosómicas y como los micronúcleos se originan de dos tipos importantes de daño genético (clastogénesis y disrupción del huso), el ensayo de micronúcleo ha sido ampliamente usado para el estudio de químicos que causan estos tipos de daño.

El ensayo de micronúcleo *in vivo* es usado para la detección de daños inducidos por la sustancia a ensayar en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos a través del análisis de eritrocitos de médula ósea y/o células de sangre periférica de animales, usualmente roedores.

El propósito del ensayo de micronúcleo es identificar sustancias que causen daño genético el cual resulta en la formación de micronúcleos conteniendo fragmentos de cromosoma retrasados o cromosomas enteros.

Cuando un eritroblasto de médula ósea se convierte en eritrocito policromático, el núcleo principal es expulsado; los micronúcleos que han sido formados pueden permanecer detrás en el otro lado de el citoplasma. La visualización de micronúcleos es fácil en estas células usando técnicas específicas de tinción y también porque carecen de un núcleo principal. Un aumento en la frecuencia de eritrocitos policromáticos en animales tratados es índice de daño cromosómico inducido.

Este ensayo de micronúcleo *in vivo* de mamíferos es especialmente relevante para evaluar el riesgo mutagénico considerando los factores del metabolismo *in vivo*, farmacocinéticas y procesos de reparación de DNA aunque éstos pueden variar entre especies, entre tejidos y entre puntos finales genéticos. Un ensayo *in vivo* es también muy útil en la mayoría de las investigaciones de un efecto mutagénico que fue detectado por un sistema *in vitro*. Si hay evidencia que la sustancia a ensayar, o el metabolito reactivo no afecta al tejido blanco, no es apropiado usar este ensayo

Los aspectos más atractivos de esta prueba son su rapidez y fácil ejecución, siendo entre los ensayos *in vivo* a corto plazo uno de los más empleados para la detección de clastógenos potenciales y venenos del huso mitótico (Salamone y col., 1980; Mc Gregor y col., 1980; Hayashi y col., 1993).

Esto permite predecir con un 91% de sensibilidad el potencial clastogénico en los eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón de una sustancia determinada.

2.11.5.4. Mutagenicidad y genotoxicidad en *Ilex paraguariensis*

Existen pocos estudios que informan la mutagenicidad de los extractos de yerba mate en ensayos *in vitro*. En una investigación, extractos acuosos de *I. paraguariensis* mostraron ser genotóxicos en células bacterianas a través de la inducción de funciones que regulan respuestas al daño del DNA y mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*. El ensayo de Ames mostró actividad mutagénica a concentraciones de 20 a 50 mg/placa de extracto acuoso/placa y fue genotóxico a concentraciones de 10 a 20 mg de extracto acuoso/placa. Cuando se agregaba fracción microsomal (S9 mix), catalasa, tiourea o dipiridilo al ensayo, la actividad genotóxica del Mate era contrarrestada sugiriendo la presencia de especies oxígeno reactivas como factores responsables de la genotoxicidad (Leitao y Braga, 1994; Fonseca y col. 2000). Fonseca y colaboradores (2000) realizaron estudios clastogénicos *in vitro* con linfocitos periféricos humanos observándose un aumento en la frecuencia de metafases con aberraciones cromosómicas por la presencia del extracto de yerba mate (100 a 750 µg de extracto acuoso de yerba mate por mL de cultivo de sangre entera). La actividad clastogénica no fue

suprimida por la presencia de S9 mix pero sí disminuyó el índice mitótico. También realizaron ensayos *in vivo* con células de médula ósea de ratas. Las ratas fueron alimentadas con extracto de la planta por vía oral (1 o 2 g/kg/día) durante 4 días consecutivos y luego de sacrificadas siguiendo el procedimiento del Test de micronúcleo. La administración de extracto de yerba mate causó una pequeña reducción en el índice mitótico, indicando la detección de un posible efecto tóxico del mate sobre las células de médula ósea. No encontraron otros signos de toxicidad en las ratas tratadas.

No hay datos en la bibliografía sobre ensayos de mutagenicidad *in vitro* e *in vivo* de *Ilex paraguariensis* en extractos orgánicos (clorofórmicos, acetónicos).

2.11. 6. Asociación de *Ilex paraguariensis* con carcinogénesis

2.11. 6. 1. Prevención del cáncer

Experimentos *in vitro* y con animales han mostrado un efecto protector del Mate contra el cáncer. Se han comparado estas propiedades del té de esta planta con la del té verde, mostrando un mayor potencial el primero (Yamamoto y col., 1997). Ramirez-Mares y col. (2004) realizaron ensayos *in vitro* estudiando la actividad quimioprotectora de yerba mate sobre citotoxicidad, actividades ornitina decarboxilasa inducida por 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) y quinona reductasa usando células HepG2 y actividad inhibitoria topoisomerasa usando *Saccharomyces cerevisiae*. Estas investigaciones son de particular importancia porque la citotoxicidad está estrechamente ligada con la actividad anticáncer. La ornitina decarboxilasa es un promotor de crecimiento tumoral; células tumorales suelen tener grandes concentraciones de esta enzima. La quinona reductasa es otro método para la actividad anticancer y la topoisomerasa es usada en la mitosis; las células cancerígenas muestran mayor concentración de topoisomerasa II (Topo II) que las células normales debido a sus altas tasas de división celular. La yerba mate ha mostrado poseer mayor citotoxicidad contra células cancerígenas de hígado humano en comparación con el té verde, con un valor de IC_{50} de 12.01 g eq.(+) catequina.mL⁻¹ para Mate comparado con 72 g eq. (+) catequina.mL⁻¹ para el té verde. La Tabla 2.8 muestra las concentraciones de té necesarias para varias actividades inhibitorias sobre células HepG2.

La actividad antitopoisomerasa II humana fue significativa y mostró una inhibición del 65% comparado con el 15% para el té verde (Ramirez-Mares y col. 2004). La inhibición topoisomerasa catalítica fue sólo sobre Topo II y no sobre topoisomerasa I (Topo I). Un estudio *in vitro* sobre células de carcinoma oral mostró que concentraciones mayores que 375 µg de extracto sólido.mL⁻¹ había inhibido completamente el crecimiento celular cancerígeno

(Gonzalez de Mejía y col., 2005). La infusión de yerba mate fue un potente inhibidor de Topo II, mostrando una inhibición del crecimiento celular significativa también a bajas concentraciones.

Tabla 2.8: Efecto inhibitorio del té de yerba mate, té verde y el té de ardisia contra el crecimiento de células cancerígenas HepG2.^a

| | $\mu\text{g eq. (+) catequina mL}^{-1} \pm \text{SD}$ | | |
|------------------|---|-------------|--------------|
| | Mate | Te verde | Ardisia |
| IC ₁₀ | 9,3 ± 0,6 | 50,7 ± 2,5 | 4,9 ± 1,4 |
| IC ₅₀ | 12,0 ± 0,2 | 72,0 ± 1,8 | 46,9 ± 3,3 |
| IC ₉₀ | 17,6 ± 0,8 | 113,6 ± 5,5 | 177,2 ± 33,4 |

Adaptado de Ramirez-Mares y col. (2004)³

IC₁₀, IC₅₀, IC₉₀ = concentración necesaria para inhibir el 10%, 50% y 90% del crecimiento celular, respectivamente
SD = desviación estándar

Los inhibidores de proteosoma forman parte importante de las investigaciones de cáncer (Osanai y col., 2007). Se ha demostrado que el compuesto galato de epigallocatequina (EGCG), hallado en té verde, inhibe proteosomas (Osanai y col., 2007). De forma similar, se han encontrado compuestos en Mate que muestran inhibición de proteosomas (Arbiser y col., 2005). Los compuestos identificados fueron ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5 DCQ), ácido 5-cafeoilquínico (5-CQ) y ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4 DCQ), los cuales actúan inhibiendo la actividad quimotripsina de los proteosomas purificados 20S y 26S de extractos de células Jurkat T (leucemia de sangre periférica humana). Entre todos estos compuestos, 3,5-DCQ evidenció la mayor habilidad inhibitoria. Se cree que actuaría de forma similar a EGCG debido a su similitud en la estructura (Arbiser y col., 2005).

Otros compuestos hallados en *I. paraguariensis* también han sido estudiados por sus propiedades quimioprotectoras. Rutina y quercitina mostraron citotoxicidad en células HepG2 (Alfá y col., 2006). Aunque estos compuestos se encuentran en bajas cantidades en Mate, muestran la diversidad de flavonoides presentes y su potencial como anticancerígeno.

2.11. 6. 2. Estudios epidemiológicos

Algunos estudios epidemiológicos sugieren una asociación entre el consumo de infusiones de *Ilex paraguariensis* y el aumento de riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer como el

esofágico, oral, pulmonar, de vejiga, renal y otros de cabeza y cuello (Pintos y col., 1994; De Stefani y col., 1996, 1998; Goldenberg y col., 2003; Bates y col., 2007) (Figura 2.20).

Estas incidencias han sido altamente correlacionadas en regiones donde el consumo de mate es alto y persistente, como en partes de Brasil y Uruguay. Sin embargo se ha reconocido también que otros factores habituales pueden influir como el consumo de tabaco y alcohol, altamente asociados con la cultura de estas regiones.

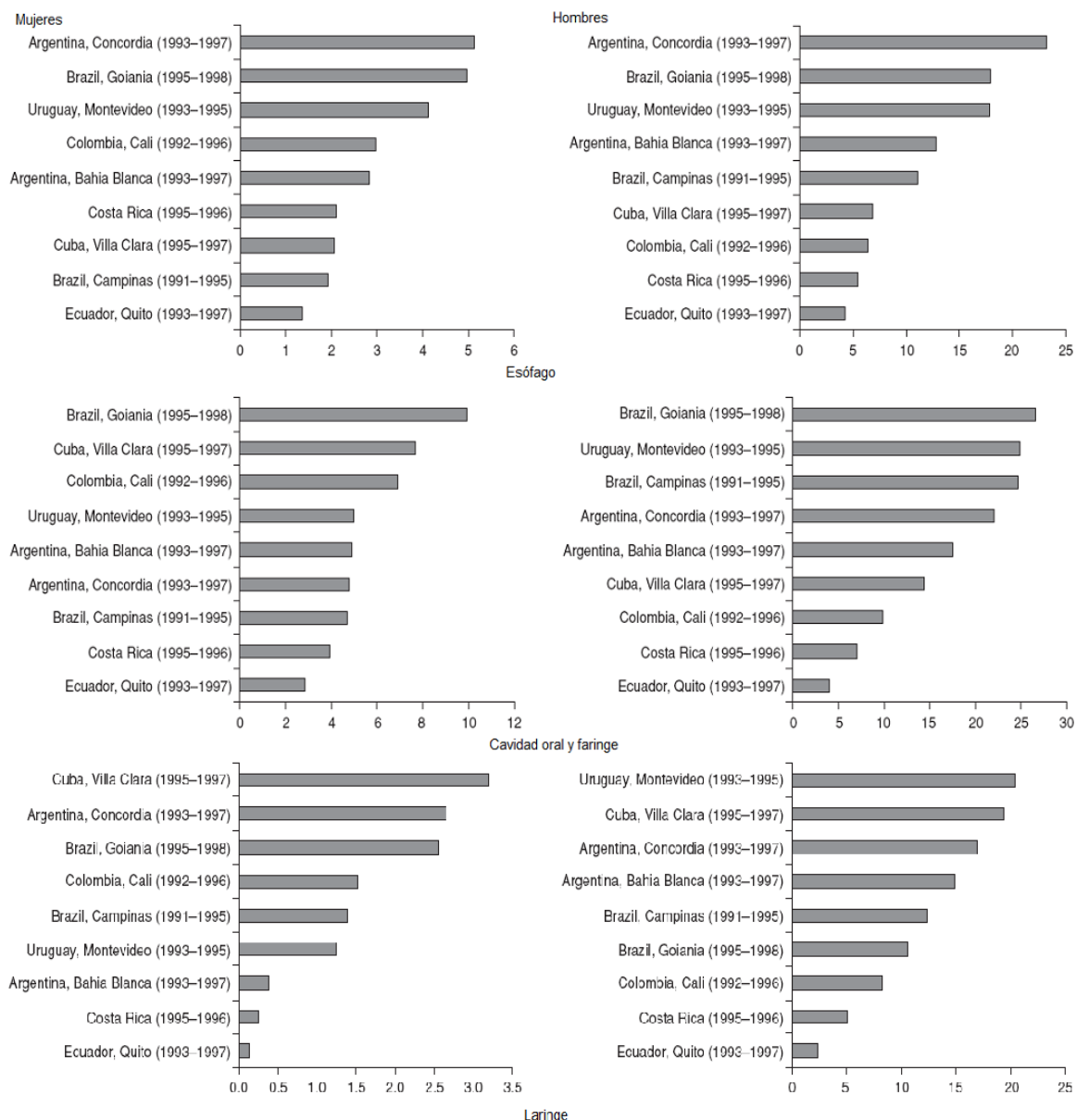


Figura 2.20: Grado de incidencia de cáncer de esófago, cavidad oral, o laringe, ajustado por edad (población mundial estándar) y expresado como número de casos por 100000 individuos de 20 a 85 años o más edad (4). (Loria y col. 2009).

Los estudios epidemiológicos informados por Goldenberg (2002) y Goldenberg y col. (2003, 2004) mostraron un aumento en las tasas de células escamosas de carcinoma con el incremento del consumo de mate incluso cuando otros factores como el tabaco estuvieron presentes. Los resultados de estos estudios indican que el consumo de más de un litro de mate por día puede aumentar el riesgo de cáncer de cerebro y cuello en un factor de 3 a 5 veces, así como una aparente asociación al cáncer de pulmón (Vassallo y col., 1985; De Stefani y col., 1996; Sewran y col., 2003). También se informó que el consumo de té fuerte y muy caliente puede aumentar el riesgo de cáncer oral. Consumiendo otras bebidas calientes como café y té verde, también este riesgo aumenta 2 a 4 veces. Por lo tanto, el riesgo de cáncer oral puede ser debido a la injuria térmica (Rolon y col., 1995; Castellsague y col., 2000). Con respecto al cáncer de vejiga, estudios epidemiológicos hechos por los mismos autores principales (De Stefani, 1991), llevados a cabo en Uruguay mostraron una relación entre el Mate y el cáncer de vejiga cuando se asociaba con el consumo de tabaco en fumadores y en cierto grado en no fumadores aunque menos definido. En el mismo estudio se encontró que consumidores de té negro y café habían aumentado el riesgo de cáncer de vejiga. Un estudio epidemiológico conducido en Argentina mostró un aumento en el cáncer de vejiga en tomadores de mate y fumadores, pero no en no fumadores (Bates y col., 2007). No está claro si la incidencia de este cáncer se debe al consumo de mate, al consumo de tabaco, o al consumo de ambos.

Se notó también que los casos estudiados de consumo de mate y el aumento de la incidencia de cáncer también incluye individuos que consumen tabaco y alcohol (vino).

De Stefani y col. (1988) establecieron una correlación entre el incremento de cáncer oral en aquellos individuos que consumían vino, mate, y fumaban. Este aumento fue mayor en aquellos que usaban tabaco negro respecto de los que usaban rubio. No se evidenció una implicancia directa de la contribución de un solo factor al aumento en el cáncer oral. El mate puede no ser carcinógeno en sí mismo, pero debido a la alta temperatura con que se consume, puede llegar a aumentar la absorción de carcinógenos que se consumen en el cigarrillo de los fumadores y otros contaminantes ambientales que son carcinógenos o promotores del cáncer (Goldenberg y col., 2004).

Por otro lado, puede haber compuestos presentes en el mate que contribuyan al cáncer. Fagundes y col. (2006) han hallado una correlación entre la cantidad de mate consumido y la cantidad de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en el cuerpo. Se conoce que los PAHs, particularmente benzo[a]pireno, tienen propiedades carcinogénicas y que el humo del tabaco, la carne a la parrilla contiene altas concentraciones de PAHs; al menos 15 compuestos PAHs han sido encontrados en variedades de mate. Estos compuestos fueron aislados e

identificados por el método de extracción por sorción sobre barras de agitación (SBSE) y cromatografía líquida de alta performance con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) (Zuin y col. 2005).

Las cantidades halladas de PAHs en muestras de Mate brasileiro, estaban en un rango de 600 a 2300 ng.L⁻¹, siendo el naftaleno, acenafteno y fenantreno los que mostraron mayor concentración.

La Tabla 2.9 muestra los compuestos encontrados y sus concentraciones promedio en 11 muestras de infusión de Yerba Mate.

Tabla 2.9: Concentración promedio de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (PHAs) encontrados en muestras de infusión de Yerba Mate brasileiro^a.

| Compuesto | ng/L | Compuesto | ng/L |
|----------------|-------|----------------------|------|
| Acenafteno | 426,3 | Benzo[b]fluoranteno | 11,4 |
| Fenantreno | 347,5 | Criseno | 10,5 |
| Naftaleno | 96,5 | Benzo[a]antraceno | 9,7 |
| Fluoranteno | 61,4 | Indeno(1,2,3)pireno | 9,5 |
| Pireno | 59,1 | Benzo(g,h,i)perileno | 7,7 |
| Antraceno | 50,9 | Dibenz(a,h)antraceno | 5,0 |
| Fluoreno | 29,7 | Benzo[k]fluoranteno | 3,6 |
| Benzo[a]pireno | 12,2 | | |

^a Adaptado de Zuin y col. (2005)

Es sabido que la exposición a PAHs a través del humo del tabaco y otras fuentes puede incrementar el riesgo de carcinoma de células escamosas esofágicas. Fagundes y col. (2006) evaluaron 200 consumidores de infusión de mate, mitad masculinos y mitad femeninos, a su vez, y dentro de esta clasificación, la mitad fumadores y la otra no fumadores, para determinar la concentración de 1-hidroxi pireno glucurónido (1-OHPG), un metabolito de detoxificación de PAH glucurónido excretado en orina. Su presencia indica que el individuo ha sido expuesto a PAHs. El compuesto 1-OHPG puede ser medido en orina usando cromatografía de inmunoafinidad y espectroscopía de fluorescencia sincrónica. Los ensayos fueron realizados por la Universidad Johns Hopkins y el Instituto Nacional de Cáncer encontrando una correlación directa entre el consumo de mate y la concentración de PAHs en orina, a mayor consumo, mayor concentración. La Tabla 2.10 muestra el incremento de concentración de 1-OHPG en orina con el aumento de consumo de mate.

Sin embargo, aparte de aumentar el metabolito con el consumo de mate solo, se observó que se obtenían concentraciones más altas de 1-OHPG cuando había una combinación de fumar y tomar mate. También se observó que la concentración de 1-OHPG producida por el consumo

de mate solo, es en promedio del mismo orden que el obtenido por fumar únicamente (Fagundes y col., 2006).

Cuando se examinó el mate y el café que consumía una población de Campinas, Brasil, se encontró PAHs en todos los productos en un rango de $0.70 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para el mate y $10.12 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para el café (Rojo de Camargo y col., 2002). Considerando el consumo diario per cápita promedio estimado en Brasil de 69.79 g de té de yerba mate, se puede asumir que el mate contribuye con aproximadamente 0.05 μg de PAHs totales a la ingesta dietaria de estos contaminantes para una población de estudio de 600 habitantes (Rojo de Camargo y col. 2002). Schelemitz y Pfannhauser (1997) habían informado cantidades de 542 ng.kg^{-1} de benzo[a]pireno en hojas tostadas y 225 ng.kg^{-1} en hojas verdes. Ruschenburg (1985) ya había informado la presencia de grandes cantidades ($24\text{-}461 \text{ ng.kg}^{-1}$) de benzo[a]pireno en 8 muestras comerciales de yerba mate. Kamangar y colaboradores (2008) midieron la concentración de 21 PAHs distintos en hojas secas de 8 marcas comerciales de yerba mate y en infusiones hechas con agua caliente (80°C) y agua fría (5°C). Las medidas fueron hechas por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas, usando PAHs deuterados como sustitutos. Las infusiones fueron hechas agregando el agua a las hojas, removiendo la infusión resultante luego de 5 minutos y luego agregando más agua a las hojas restantes. El proceso fue repetido 12 veces para cada temperatura de infusión. La concentración total de los 21 PAHs en las diferentes marcas de yerba mate estuvieron en el rango de 536 a 2906 ng.kg^{-1} de hojas secas. Concentraciones de benzo[a]pireno se situaron entre 8.03 y 53.3 ng.kg^{-1} de hojas secas. Para las infusiones preparadas usando agua caliente y la marca 1, se halló el 37% del contenido de PAHs medidos (1092 de 2906 ng) y el 50% de benzo[a]pireno (25.1 de 50 ng) en las 12 infusiones. Resultados similares se obtuvieron en las otras infusiones frías y calientes.

Aunque no está probada la correlación biológica entre el consumo de mate y el desarrollo del cáncer (Pereira Jotz y col., 2006), la contaminación con PAHs sería una explicación plausible de la relación entre el aumento en la ingestión de mate y el cáncer. Es altamente probable que los PAHs se obtengan en el procesamiento, cuando la planta se seca completamente sobre el fuego con madera. También parece haber un vacío de nueva información sobre la materia, requiriendo más investigaciones al respecto.

Tabla 2.10: Concentración de 1-hidroxipireno glucurónido (1-OHPG) en orina de humanos.^a

| Consumo de Mate (mL/día) | 1OHPG (pmol.mL ⁻¹) |
|--------------------------|--------------------------------|
| < 100 | 1,01 |
| > 100 | 1,97 |
| > 500 | 3,24 |
| > 1000 | 4,06 |

Adaptado de Fagundes y col. (2006)^a

2.12. Investigación de extractos de *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*

Las especies del género *Ilex* contienen numerosas sustancias químicas, algunas conocidas, caracterizadas químicamente y estudiadas en lo referente a sus acciones farmacológicas y otras aún sin identificarse ni clasificarse y por supuesto sin conocimiento de sus acciones biológicas.

Ante evidencias que las infusiones de *Ilex dumosa* podrían ofrecer algunas acciones diferentes a las infusiones de *Ilex paraguariensis*, principalmente un bajo o nulo contenido en cafeína y xantinas (Filip y col., 2001), las que serían desde el punto de vista industrial potencialmente convenientes, se propuso llevar a cabo la realización de investigaciones para profundizar en el conocimiento de las acciones de los extractos de *Ilex dumosa*.

Debe destacarse que la especie *Ilex dumosa* ha sido estudiada escasamente en cuanto a sus componentes químicos y sus acciones farmacológicas. Sin embargo, existirían algunas evidencias que los extractos de *Ilex dumosa* han producido en algunos experimentos en animales de laboratorio, efectos adversos hematológicos, principalmente hemólisis. (Bonfigli, N.y col., 1988). Estudios realizados administrando saponinas de ambas *Ilex* a animales de experimentación (Kchol RA y col., 1995) no registran alteraciones hematológicas, renales o hepáticas.

Debe tenerse en cuenta también los efectos benéficos pero sobre todo los adversos atribuidos a la yerba mate como carcinógeno principal de la cavidad oral y orofaríngea humana (Goldenberg 2002) y su actividad genotóxica y clastogénica cuando se lo consume como bebida caliente (Fonseca y col. 2000).

De lo anterior se desprende que el estudio de los riesgos y/ o beneficios toxicológicos que presenta el consumo de infusiones acuosas así como los extractos orgánicos de hojas *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y de sus adulterantes, es un tema poco explorado y de

gran importancia. Ensayos de laboratorio *in vitro* son usados como métodos preliminares para detectar compuestos químicos potencialmente tóxicos.

La presente investigación estudia los efectos mutagénicos y antimutágenos de extractos acuosos, clorofórmicos y acetónicos de hojas de *Ilex paraguariensis* y de uno de sus adulterantes más comunes: *Ilex dumosa var. dumosa*.

La detección mutágenos y antimutágenos *in vitro* (Ensayo de Salmonella microsoma) se realiza con cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* empleando o no activación metabólica (S9 MIX). En el caso de comprobarse mutagenicidad se determinará si del extracto con mayor mutagenicidad *in vitro* resultante tiene actividad clastogénica, a través del Ensayo de inducción de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón como experimento *in vivo* a corto plazo (Ensayo de micronúcleo).

2.13. Hipotesis de trabajo

Los constituyentes de los alimentos nutrientes, antinutrientes y compuestos bioactivos podrían interactuar con nuestros genes y sus productos, alterando los fenotipos. Las infusiones de origen herbal podrían ser un generador potencial de compuestos bioactivos que producirían un efecto mutagénico o quimioprotector sobre el material genético ejerciendo un efecto antimutagénico en presencia de mutágenos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Avanzar en el conocimiento sobre la mutagenicidad de las hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var. *dumosa* respecto de su acción mutagénica en sistemas *in vitro* (Test de Salmonella microsoma) e *in vivo* en animal entero (Ensayo del Micronúcleo).

3.2. Objetivos específicos

- Obtener extractos acuosos, clorofórmicos y acetónicos de las hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y de su adulterante más común, *Ilex dumosa* var. *dumosa*.
- Evaluar la inducción de actividad mutagénica de los extractos acuosos, clorofórmicos y acetónicos de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y de su adulterante más común, *Ilex dumosa* var. *dumosa* en ensayos *in vitro* (Salmonella microsoma).
- Obtener la curva de dosis- respuesta entre la dosis de los diferentes extractos de cada planta y el efecto mutagénico observado determinado por el ensayo de Salmonella microsoma.
- Evaluar la toxicidad de los extractos frente a cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*.
- Evaluar la inducción de la actividad mutagénica de los extractos de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y de su adulterante más común, *Ilex dumosa* var. *dumosa* mediante un ensayo *in vivo* (Test del Micronúcleo).
- Evaluar la curva dosis- respuesta en los ensayos realizados con Test de Micronúcleo.
- Comparar los resultados encontrados de mutagenicidad de los extractos ensayados mediante los Ensayos de mutagenicidad *in vivo* e *in vitro*.
- En caso de no encontrarse mutagenicidad se evaluará el poder antimutagénico de los extractos acuosos, clorofórmicos y acetónicos contra mutágenos conocidos a través del Ensayo de Salmonella microsoma.

4. Materiales y Métodos

4.1. Extractos de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var. *dumosa*.

4.1.1. Cultivares

Las plantas de *Ilex paraguariensis* St Hil. var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* Reissek var. *dumosa* utilizadas como material de estudio constituyeron ejemplares frescos provenientes de la Estación Experimental del INTA Cerro Azul (Misiones). Dichas muestras habían quedado depositadas en el Herbario del Museo de Botánica y Farmacognosia “Carlos Spegazzini” de la Facultad de Ciencias Exactas, La Plata, UNLP (LPE).

- *Ilex paraguariensis* St Hil. var. *paraguariensis*: Co. 01 hora de recolección: 09:00hs, 07/03/2003
- *Ilex dumosa* Reissek var. *dumosa*: Co.07, hora de recolección: 11:30hs 13/03/2003

4. 1.2 Preparación de extractos

- Extractos acuosos:

Para los preparación de los extractos acuosos, 5 gramos de hojas secas trituradas en molino a cuchillas, de cada una de las plantas (*Ilex paraguariensis* St Hil. var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* Reissek var. *dumosa*) se sometieron al proceso de cocción con 70 mL de agua destilada a 80°C, según se describe el la Farmacopea Nacional Argentina VI Ed. Se enfrió a 40-45°C y el líquido se filtró usando papel de filtro de filtración rápida (banda blanca). Luego se llevó a volumen en matraz de 100 mL. Posteriormente se liofilizó y se almacenó en criotubos en congelador (-20°C) hasta el momento del ensayo.

- Extractos orgánicos:

Para la obtención de los extractos orgánicos, se realizaron dos extracciones sucesivas en solventes orgánicos según se describe a continuación.

Se trituraron 120 gramos de hojas secas de cada una de las plantas (*Ilex paraguariensis* St Hil. var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* Reissek var. *dumosa*) en un molino a cuchillas. Se confeccionaron varios cartuchos con porciones de la muestra molida ubicándola en un papel de filtro y se envolvió en un segundo papel de filtro doblado de tal modo que se evite la pérdida de muestra (Fig. 4.1). El segundo papel se dejó abierto en la parte superior como si fuese un dedal. En la parte superior del dedal se colocó un trozo de algodón absorbente para distribuir el solvente según gotee sobre la muestra.

Se ubicó el dedal con la muestra envuelta en el aparato de extracción, y se montó el aparato tal como se muestra en la Figura 4.2. Se agregaron alrededor de 100 mL de cloroformo en el matraz de extracción que se une al tubo.

Se calentó en un baño de agua de tal forma que el solvente gotee desde el condensador al centro del dedal a una velocidad de al menos 150 gotas/min.

Se mantuvo el volumen del solvente prácticamente constante adicionando lo suficiente como para compensar cualquier pérdida debido a evaporación. Se continuó la extracción durante 16 hs. Luego se enfrió y se desconectó el matraz de extracción. Se recuperó el solvente en exceso. El remanente de las hojas trituradas encontrado en los cartuchos y la fracción clorofórmica obtenida, fueron evaporados a sequedad en estufa de convección forzada a 50°C durante 8 horas.

Una vez secos, se pesaron nuevamente dedales con 5 gramos del remanente de las hojas de ambas plantas extraídas con cloroformo y se volvió a realizar las extracciones sucesivas pero esta vez utilizando como solvente acetona y el procedimiento de secado. Una vez obtenidos los extractos orgánicos secos (acetónicos y clorofórmicos), se guardaron en criotubos en congelador a -20 °C hasta el momento del ensayo. La Figura 4.3 muestra en forma esquemática todo el proceso llevado a cabo para la obtención de las fracciones orgánicas de las hojas de *Ilex paraguariensis* St Hil. var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* Reissek var. *dumosa*.

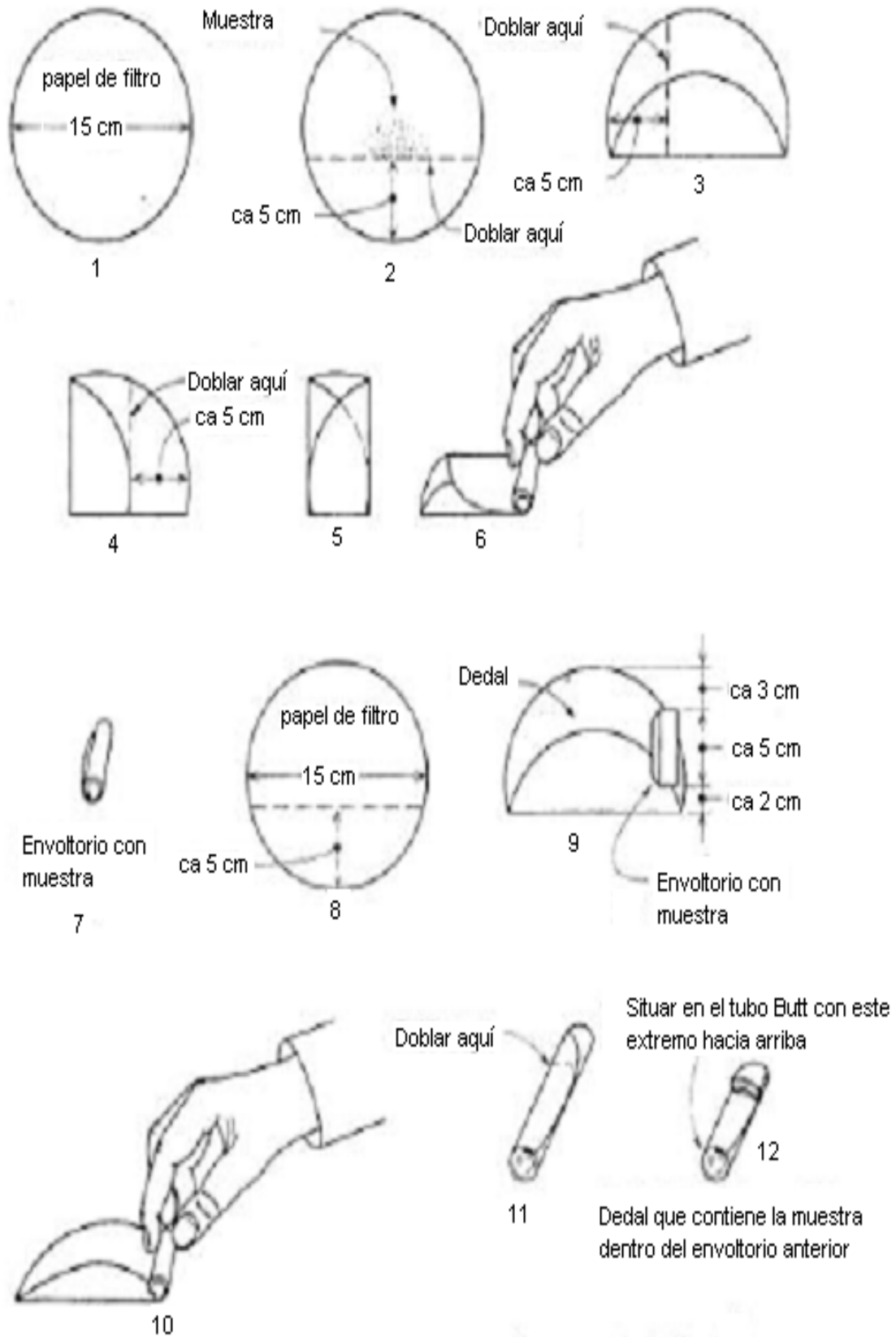


Figura 4.1: Forma en que se confeccionaron los cartuchos o dedales para contener la muestra a ser extraída en el equipo de extracción.

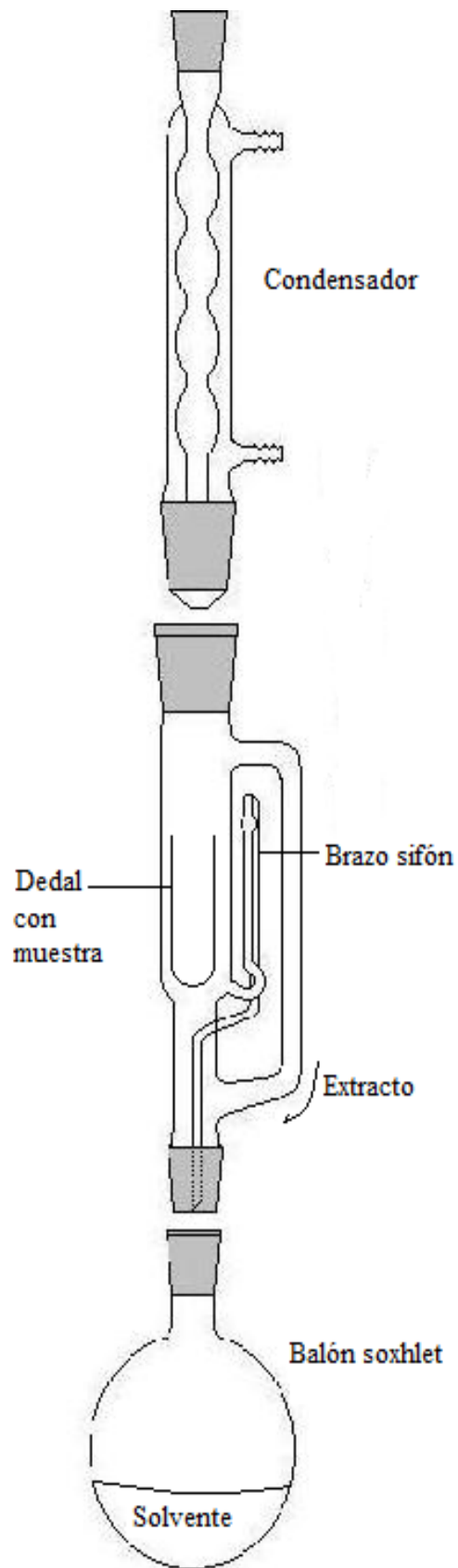
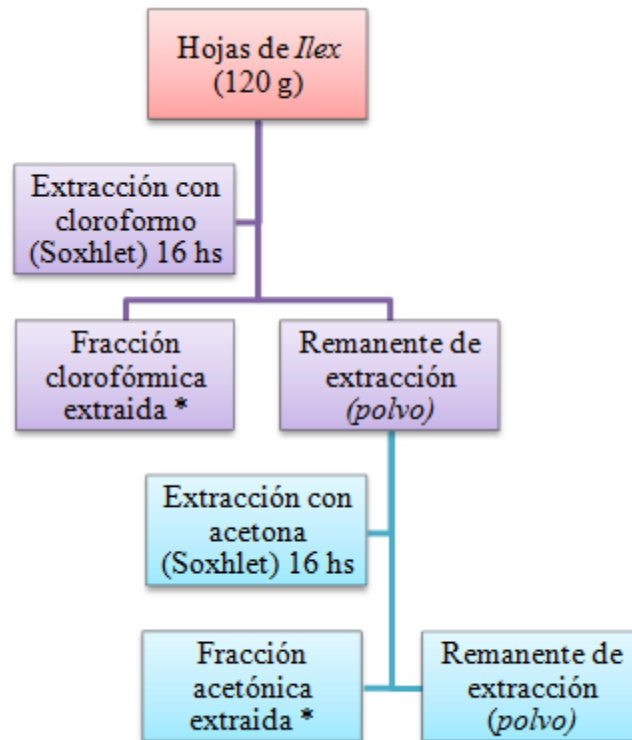


Figura 4.2: Aparato de extracción Soxhlet



*Secado en estufa convección forzada a 50°C durante 8 hs.

Figura 4.3: Representación esquemática del proceso de extracción y de las obtenciones de las diferentes fracciones orgánicas obtenidas a partir de las plantas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var. *dumosa*

4. 2. Ensayo de mutagenicidad con *Salmonella typhimurium* (Prueba de Ames) en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var. *dumosa*

4. 2.1. Material Biológico

4. 2.1.1. Cepas de Ensayo

- Genotipos

En el ensayo de mutagénesis se usó una colección de cepas de *Salmonella* histidina dependientes de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 provistas por B.N. Ames, Universidad de California, Berkeley, CA, USA.

Estas cepas derivan originalmente de *Salmonella typhimurium* LT2 y poseen un tipo de mutación distinto en el operón histidina, de forma que requieren histidina en el medio de crecimiento porque son incapaces de sintetizarla.

Las diferencias específicas entre las cepas vienen marcadas por la mutación en el operón de la histidina (Maron y Ames, 1983). Además de esta mutación, las cepas de ensayo poseen otras que aumentan su eficacia para detectar mutágenos. Una de ellas, es la rfa, que causa pérdida

parcial de la barrera de polisacáridos que protegen la superficie de la bacteria, causando un aumento de la permeabilidad para las moléculas voluminosas que normalmente no podrían atravesar la pared celular normal.

La mutación *uvrB*, causa la deleción de un gen que codifica el sistema de escisión de reparación para DNA. Puesto que esta región es necesaria para realizar la reparación por escisión, la eliminación de la misma implica la desaparición de este mecanismo de reparación en las cepas mutantes, confiriéndoles un aumento de sensibilidad para detectar agentes mutagénicos.

Por razones técnicas esta deleción se extiende al “bio” gen y como consecuencia estas cepas necesitan biotina para su crecimiento. Por último, las cepas poseen el plásmido factor R pKM 101, el cual les confiere resistencia al antibiótico Ampicilina y aumenta la mutación espontánea e inducida al incrementar el sistema de reparación con error, normalmente presente en estos organismos. Estas cepas con factor R revierten mejor que las cepas de las cuales proceden, detectando mejor los factores mutagénicos (Mc Cann y col., 1975; Walker y Dobson, 1979;Shanabruch y Walker, 1980).

La Tabla 4. 1 Lista los genotipos de las cepas usadas en el presente trabajo.

Tabla 4. 1: Genotipos de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA100 y TA98.^a

| Mutación (Cepa) | <i>bio chlD uvrB gal</i> | Defecto LPS | Plásmido |
|--------------------------|--------------------------|-------------|----------|
| <i>hisG46</i> TA100 | mutación por deleción | <i>rfa</i> | pKM101 |
| <i>hisD3052</i> TA 98 | mutación por deleción | <i>rfa</i> | pKM101 |

Adaptado de Mortelmans y Zeiger (2000)^b

- Secuencia de DNA blanco específica

La Tabla 4.2 lista las secuencias de DNA de mutaciones blanco de las cepas *Salmonella typhimurium* TA100 y TA98. La mutación *hisG46* en la cepa TA100 corresponde al gen *hisG* que codifica para la primera enzima en la biosíntesis de histidina. Esta mutación resulta de la sustitución de una leucina (GAG/CTC) por una prolina (GGG/CCC) (Barnes y col., 1982). Esta mutación es revertida al tipo salvaje por mutágenos que causan mutaciones por sustitución de pares de bases, principalmente en uno de los pares GC. La mutación ión *hisD3052* en la cepa TA98 corresponde al gen *hisD* que codifica para la enzima histidinol

deshidrogenasa y es una mutación de corrimiento del marco de lectura en -1 que afecta la lectura del marco en una secuencia repetitiva C-G-C-G-C-G-C-G (Isono y Yourno, 1974). Esta cepa detecta mutágenos que cambian el marco de lectura. Los mutágenos pueden estabilizar el par cambiado en secuencias repetitivas o “sitios calientes” del marco de lectura para la síntesis de histidina. La reversión de la mutación *hisD3052* al tipo salvaje es inducida por varios mutágenos que cambian el marco de lectura como el 2-nitrofluoreno y varios nitroso derivados aromáticos de amina.

Tabla 4.2: Especificidad de secuencia de DNA sobre las cepas TA100 y TA98.^a

| Alelo (Cepa) | DNA blanco | tipo de Reversión | Referencia |
|-----------------|------------------|-------------------------------|----------------------|
| <i>hisG46</i> | | | |
| TA100 | -G-G-G | sustitución de pares de bases | Barnes y col., 1982 |
| <i>hisD3052</i> | | | |
| TA 98 | -C-G-C-G-C-G-C-G | cambio del marco de lectura | Isono y Yourno, 1974 |

Adaptado de Mortelmans y Zeiger (2000)^a

4. 2.1.2. Fracción de homogenato de hígado de ratón S9mix

La fracción de homogenato de hígado S9 fue obtenida de Moltax Molecular Toxicology Inc. (Booen, NC, USA).

Los componentes de la concentración estándar de la fracción S9 mix para activación metabólica son: MgCl₂ 8 mM, KCl 33 mM, glucosa 6 fosfato 5 mM, NADP 4mM, fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4 y la fracción S9 de hígado de rata inducida con Aroclor 1254, en una concentración de 0.04 mL por cada mL de mezcla. El S9 mix fue preparado fresco para cada ensayo de mutagenicidad y se mantuvo en hielo varios minutos antes del ensayo sin pérdida de actividad según lo indica la técnica.

La fracción de hígado de mamífero S9 es muy utilizado por su eficiencia en la detección de un amplio rango de carcinógenos que requieren activación metabólica y es preparado de ratas inducidas con Aroclor 1254, carcinógeno de gran estabilidad.

4.2.2. Métodos

4. 2.2.1. Obtención y conservación de las cepas

- Conservación de cepas a largo plazo

Para la preservación por largo tiempo, las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 se almacenaron en congelador a -80°C.

Procedimiento

Las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 se recibieron en forma de cultivos liofilizados. Se agregó asépticamente 1 mL de caldo nutritivo Oxoid N°2 (composición en Anexo 1) a cada uno para rehidratarlos. Se transfirió una gota del cultivo rehidratado a una placa de agar nutritivo (composición en Anexo 1) y se dispersó con perlas de vidrio estériles para obtener colonias aisladas. Luego de incubar toda la noche a 37°C, se observó el crecimiento de las placas. Para cada cepa se tomó una colonia aislada y se sembró por estrías en placas con medio mínimo con glucosa (AGM) suplementado con un exceso de histidina y biotina y con ampicilina (composición en Anexo 1). Se volvió a realizar esta última operación en el mismo medio para asegurar un cultivo puro, procedimiento denominado repique. Se tomaron cinco colonias aisladas de la segunda placa de purificación y se transfirieron a una placa de AGM suplementado con histidina, biotina y ampicilina que se rotuló previamente con cinco localizaciones correspondientes a cada colonia sobre la parte de atrás de cada placa. Luego se incubaron a 37°C durante 48 hs. Cuando se observó un buen crecimiento, se inocularon las colonias aisladas de cada una de las localizaciones, en tubos separados con 5 mL de caldo nutritivo. Luego de incubar toda la noche a 37°C, se confirmó las características genotípicas (*his*, *rfa*, *uvrB-bio*) y la presencia del plásmido pKM101 de las cepas de ensayo en todos los tubos. Se seleccionó la colonia en cada placa que dio el mejor resultado en términos de características fenotípicas, incluyendo la mejor inducción de mutación espontánea. Se transfirió un pequeño inóculo a 4.5 mL de caldo nutritivo y se incubó durante toda la noche con agitación para obtener una cantidad de bacterias óptima de $1 \text{ a } 2 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹. Este valor se controló midiendo la Densidad Óptica (D.O.) a 650 nm. Se agregó 0.5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector al cultivo (concentración final, 10% v/v), se mezcló vigorosamente y luego se colocaron alícuotas de 1 mL en criotubos etiquetados con el número de la cepa y el día de preparación. Luego se almacenaron a -80°C.

- Preparación de cultivos de trabajo

La preparación de cultivos de trabajo se realizó raspando la superficie del contenido de un criotubo a -80°C con un ansa en anillo y colocando el inóculo en 5 mL de caldo nutritivo. Luego se incubó durante 12 horas a 37°C con agitación (100-120 rpm). Se sembró una ansada del cultivo crecido para obtener colonias aisladas de cada cepa, en placas de AGM suplementado con un exceso de biotina e histidina y con el antibiótico ampicilina. Este

procedimiento de purificación se realizó dos veces. Se tomaron cinco colonias aisladas de la segunda placa de purificación y se transfirieron a otra placa de AGM suplementado con histidina, biotina y ampicilina que se rotuló previamente con cinco localizaciones correspondientes a cada colonia sobre la parte posterior de cada placa. Los pasos subsecuentes fueron idénticos a aquellos descritos para la conservación de cepas a largo plazo excepto por lo siguiente. Los tubos criogénicos se etiquetaron como “cultivos de trabajo”, con el número de cepa, la fecha de preparación y la fecha de vencimiento (un año). Se prepararon gran cantidad de estos criotubos ya que se usó un cultivo de trabajo congelado en cada experimento.

4. 2.2.2. Verificación de las características genotípicas de las cepas

Fue esencial verificar periódicamente que las características de las cepas no habían sufrido modificaciones, es decir, realizar un control de calidad de las bacterias, para lo cual se efectuaron los siguientes controles:

- a. Inmediatamente después de recibir las cepas
- b. Cuando se prepararon congelados permanentes
- c. Cuando aumenta el número de revertantes espontáneas
- d. Junto con el ensayo de mutagenicidad

- Frecuencia de Reversión espontánea

Existen intervalos estándar de mutación espontánea y un experimento solo es aceptable si los valores de control negativo están dentro de éstos límites (Maron y Ames, 1983).

La reversión espontánea de las cepas TA98 y TA100 frente a la histidina, se expresa por el número de colonias revertidas espontáneamente por placa. Estas colonias se ven claramente, ya que asientan sobre el fondo opaco producido por el crecimiento de las bacterias auxótrofas. El número de revertantes espontáneos por placa es independiente del número inicial de células bacterianas plaqueadas, dentro de los límites: 10^5 a 10^8 células. Para asegurar el nivel de células en el rango citado, se construyeron curvas de densidad óptica (DO) vs. concentración de bacterias a 650 nm para las cepas TA98 y TA100. Para ello, se midió la absorbancia del cultivo durante 12 hs de crecimiento y se determinó la dilución adecuada a ser sembrada.

Cada cepa revierte espontáneamente con frecuencias características, que según:

- De Serres y Shelby (1979), son:

- Cepa TA 98: entre 15 y 75 revertantes/placa

- Cepa TA 100: entre 60 y 220 revertantes/placa (Fig. 4.4)

- Maron y Ames (1983) son:

- Cepa TA 98: entre 30 y 50 revertantes/placa
- Cepa TA 100: entre 120 y 200 revertantes/placa

Considerando que puede haber variabilidad en el número de revertantes espontáneos de un experimento a otro y de una placa a otra, se incluyó en el ensayo de mutagenicidad al menos 3 placas control de revertantes espontáneos para cada cepa (TA98 y TA100). Esto es esencial cuando los compuestos del ensayo son débiles mutágenos.

Una desviación que esté obviamente fuera del rango aceptable indica la necesidad de comprobar las características genéticas de la cepa cuestionada.

Una tasa muy elevada indica contaminación o acumulación de revertantes, en cuyo caso la cepa debe reaislarse de otro cultivo de trabajo congelado.

Una disminución en la frecuencia de revertantes espontáneos de cepas que llevan el factor R, sensibles a ampicilina, genera insensibilidad a los mutágenos de diagnóstico apropiados. El factor R pudo monitorearse y la pérdida completa del plásmido se previno por crecimiento del cultivo durante toda la noche (desde el criotubo de cultivo de trabajo) en un caldo Oxoid N°2 al que se le agregó $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Ampicilina. Para determinar la proporción de células que retuvieron el factor R, se diluyó un cultivo de 12 horas 10^6 veces con buffer fosfato estéril (composición en Anexo 1) y se plaqueó 100 μL por triplicado, sobre placas de Petri con agar nutritivo con y sin ampicilina. Se llevó a incubar durante 12 horas y luego se marcaron y contaron las colonias crecidas en las placas. Si el número promedio de colonias de las placas con ampicilina era igual al número de placas sin ampicilina, esto indicaba que todas las células bacterianas contenían el plásmido R.

La cantidad de revertantes espontáneos está influenciada por la concentración de histidina; en el agar Top (agar blando donde se siembra la cepa de *Salmonella typhimurium* en el ensayo de mutagenicidad, cuya composición se presenta en el Anexo 1)

Fluctuaciones en el contenido de este aminoácido se reflejarían en el número de revertantes espontáneos en las placas.

Altos valores de revertantes no atribuibles a la concentración de histidina pueden estar indicando mutágenos en el ambiente de la bacteria, por ejemplo, el óxido de etileno.

El óxido de etileno es usado para esterilizar las placas de Petri y otros materiales plásticos, es un potente mutágeno para TA100 y puede ser responsable de un aumento en el número de

revertantes espontáneos. Por esta razón se usaron placas de Petri descartables plásticas, esterilizadas por radiación *gamma*.

En la preparación de las placas de revertantes espontáneos, se añadió 100 µL de cultivo bacteriano a 2 mL de agar Top en una dilución conveniente de tal forma de tener 10^5 a 10^8 células por placa (para esto primero se midió la D.O. del cultivo de 12 hs a 650 nm); se mezcló y se vertió en la superficie de una placa de AGM (composición en Anexo 1). Si el ensayo se realizaba con activación metabólica, se añadía también al tubo de agar Top, 500 µL de homogenato de hígado de ratón, S9 mix; se dejó solidificar y se incubaron todas las placas en estufa a 37°C durante 48 horas.

Finalizado el período de incubación, se contaron las colonias revertidas en cada placa y si no se encontraban dentro del intervalo adecuado, es decir estaban fuera del rango de reversión espontánea que correspondiente a la cepa, se descartaban los resultados de los ensayos realizados y se volvía a repetir la experiencia.

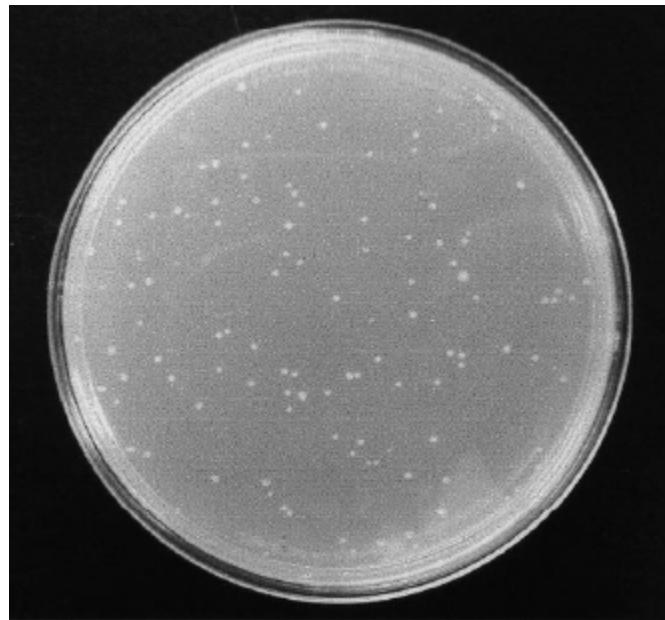


Figura 4.4: Revertantes espontáneos de la cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*

- Respuesta ante testigos positivos

En cada experimento de mutagénesis se incluyeron controles de mutagénesis positivos usando mutágenos diagnóstico para confirmar las propiedades de reversión y especificidad de cada cepa y la eficiencia del S9 mix (Fig. 4.5).

Los controles positivos de compuestos químicos que requieren activación metabólica confirman que el S9 mix es activo.

Para este propósito se utilizaron los siguientes controles positivos (mutagenos):

- En los ensayos sin S9 mix, se utilizó Azida de sodio (SAZ, 1.50 $\mu\text{g/placa}$) para la cepa TA100 y 2 nitro fluoreno (2NF, 2.5 $\mu\text{g/placa}$) para la cepa TA98.

- En los ensayos con S9 mix, se utilizó 2 amino fluoreno (2AF, 2.50 $\mu\text{g/placa}$) para ambas cepas.

El procedimiento de preparación de las placas se realizó de forma similar al caso anterior pero añadiendo además 100 μL del control positivo en el tubo de agar Top.

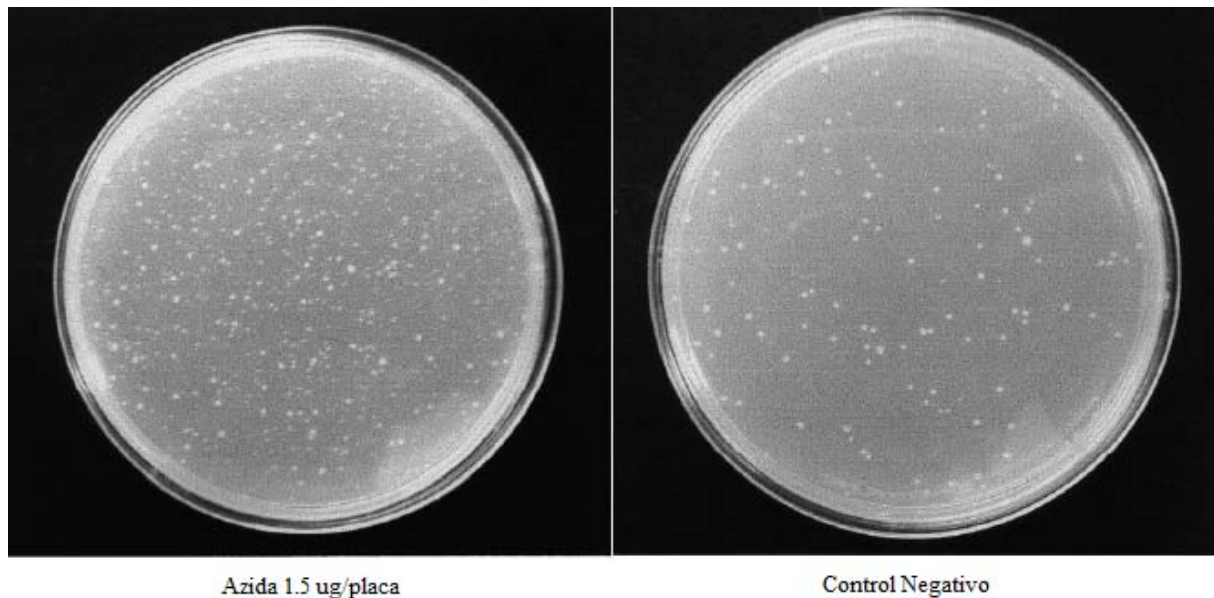


Figura 4.5: Control positivo de mutagénesis usando azida de sodio en dosis de 1.5 $\mu\text{g/placa}$ y comparación con el Control negativo de revertantes espontáneos para la cepa TA100.

- Confirmación de genotipos de cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100

o Requerimientos de Histidina:

El carácter His⁻ de las cepas se confirmó mediante el crecimiento de las mismas sólo en un medio que contiene histidina. También se requirió biotina pues la delección que escinde el gen *uvrB* se extiende a través del gen *bio*. Se agregaron estos nutrientes a AGM (placas his/biotina). También se prepararon placas control negativo: una con AGM con biotina y sin histidina.

Procedimiento:

A partir de un cultivo puro de 24 hs se tomó una ansada de cultivo y se realizó una estría simple en una placa con AGM con biotina y sin histidina y luego en otra de AGM con biotina e histidina.

Las placas se llevaron a incubar a 37°C toda la noche y se examinó el crecimiento sobre el medio con histidina/biotina y la falta de crecimiento en el control negativo que contenía únicamente biotina.

○ **Mutación rfa:**

Se controló la sensibilidad al colorante cristal violeta. Se sembraron las cepas a ser caracterizadas en una placa de Petri con agar nutritivo, se colocó un disco de papel de filtro estéril conteniendo una solución de 1 mg.mL⁻¹ de cristal violeta sobre la superficie y se observó la inhibición, ya que esta mutación permite la penetración de grandes moléculas en la bacteria provocando su muerte.

Procedimiento:

Se agregó 100 µL de cultivo fresco de 12 horas de incubación de cada cepa de *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100) en un tubo conteniendo 2 mL de agar Top fundido, mantenido en baño de agua a 45°C. Se mezcló en vortex durante 3 segundos a baja velocidad y luego fue vertido en la placa de Petri que contenía agar nutritivo. Se inclinó y rotó la placa para distribuir el agar Top homogéneamente, y luego se lo situó en superficie, esperando unos minutos a que el agar se afirme. Se embebió con 10 µl de una solución de cristal violeta de 1 mg.mL⁻¹ el centro de un disco de papel de filtro estéril (1/4 pulgada). Luego se colocó el disco con la solución de cristal violeta sobre la placa de agar nutritivo que había sido sembrada, utilizando pinzas estériles. Cada disco se presionó levemente con la pinza y se llevó a incubar la placa en estufa a 37°C. Luego de 12 hs una zona clara de inhibición apareció alrededor del disco indicando la presencia de la mutación rfa.

○ **Mutación uvrB:**

Se confirmó por demostración de sensibilidad a la luz UV.

Procedimiento:

Se estriaron cultivos de las cepas a ensayar en una placa de Petri conteniendo agar nutritivo, haciendo franjas o bandas paralelas. Luego se cubrió la placa con una pieza de cartón de tal forma que se cubra la mitad de cada estriado bacteriano. Se irradió la placa con una lámpara germicida de 15 watts a una distancia de 33 cm durante 8 segundos según recomendación para cepas factor R. Se sembró también una cepa con enzimas de reparación por escisión de tipo salvaje, *Salmonella no typhimurium ATCC 18684* sobre la misma placa como control positivo para la dosis de UV. Se incubó la placa irradiada en estufa a 37°C durante 12 a 24 hs.

Las cepas con la delección *uvrB* crecieron sólo en el sitio de la placa no irradiada mientras que la cepa de tipo salvaje, creció a ambos lados de la placa.

○ **Factor R:**

Las cepas factor R se ensayaron de forma rutinaria para poner en evidencia la presencia del factor de resistencia a ampicilina debido a la inestabilidad del plásmido. La resistencia a ampicilina es simplemente un marcador conveniente para hacer posible el monitoreo de la presencia del plásmido y no influye en la sensibilidad de las cepas R para la reversión de mutágenos. Regiones específicas del DNA *pKM101* son esenciales para realizar la mutagénesis por UV, mutagénesis química, replicación y resistencia a ampicilina.

Procedimiento:

Una estría de cultivos frescos de las cepas a ensayar se sembraron con ansa sobre la superficie de una placa con medio con ampicilina usando el mismo procedimiento empleado para confirmar los requerimientos de histidina. Ambas cepas pudieron ensayarse sobre la misma placa. Se sembró una cepa no factor R: *Salmonella no typhimurium* ATCC 18684 sobre la misma placa como control de la actividad de la ampicilina. Luego incubar la placa en estufa a 37°C por 12 a 24 hs, se observó crecimiento a lo largo de las estrías de las cepas factor R y no se observó crecimiento en la estría de la cepa control.

4.2.2.3. Determinación de la correlación entre el valor de densidad óptica medido a 650 nm y el recuento de cada cepa en UFC.mL⁻¹ (TA98 y TA100)

En los ensayos de mutagenicidad es necesario contar con cultivos de *S. thyphimurium* (TA98 y TA100) en una concentración del orden de 1 a 2.10⁹ células.mL⁻¹; para ello se realizó un ensayo para determinar la correlación entre el número de células.mL⁻¹ y DO del cultivo en función del tiempo.

Se construyeron curvas de densidad óptica a 650 nm (DO) vs. Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC.mL⁻¹).

Procedimiento:

Se tomaron dos colonias aisladas características de las placas maestras y se sembraron en un tubo de ensayo de 18mm x 150mm con 5 mL de Caldo Oxoid N°2. Se llevó a incubar a 37°C con agitación de 210 rpm. Se midió la densidad óptica luego de 4 horas y después se repitieron las medidas cada 45 minutos a 650 nm. Se sembraron por duplicado placas de Petri con agar nutritivo con distintas diluciones del cultivo para cada tiempo. Las diluciones se

realizaron sembrando 1mL del caldo en 9 mL de peptona 0.1% en agua destilada estéril. Se realizaron siembras en superficie tomando 100 μ L de la dilución y se esparcieron con perlas de vidrio estériles haciendo diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Luego se llevaron a incubar a estufa a 37° durante 24-48hs. El recuento en placa se realizó determinando el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC.mL⁻¹) considerando cada dilución sembrada y los valores tomados en la curva fueron resultado del promedio de recuento de los duplicados.

4.2.2.4. Procedimiento para la obtención de cultivos en fase estacionaria

Es lo que se conoce como cultivo de toda la noche o de 12 hs.

Procedimiento:

Para cada experimento, los cultivos de las cepas de ensayo (TA98 y TA100) fueron crecidos en caldo nutritivo Oxoid N° 2 durante toda la noche (12 horas) para obtener una densidad de 1 a 2 x 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC.mL⁻¹). Esta cantidad se verificó midiendo la turbidez del cultivo a 650 nm y se interpoló su valor en la curva de UFC.mL⁻¹ vs. D.O. a esa longitud de onda. Cuando este valor se superaba, se agregaba una cantidad determinada de caldo estéril, de tal forma que se llegara a la cifra de bacterias.mL⁻¹ buscada. Se usaron en los ensayos 100 μ L de cultivo por placa. Para experimentos pequeños se crecieron los cultivos en 5 mL de medio en tubos de 18 x 150 mm con tapa. Para grandes volúmenes se usaron frascos de 100 cm³ con 20 ml de medio. Los cultivos se inocularon raspando la superficie de un criotubo de cultivo de trabajo para cada cepa y se incubaron a 37°C en un equipo rotatorio durante toda la noche. Para asegurarse una aireación adecuada, los mismos se agitaron a 210 rpm aproximadamente. Cuando se usaron frascos, la velocidad de rotación se disminuyó a 120 rpm para evitar la formación de espuma. Se colocaron los tubos o los frascos crecidos en un recipiente con hielo cuando eran sacados de la estufa y se mantuvieron allí hasta su uso en el ensayo de mutagenicidad.

El ensayo de mutagenicidad con *Salmonella typhimurium*, puede realizarse mediante dos métodos:

- a. Método de incorporación en placa también llamado Ames Clásico.
- b. Método de preincubación.

- Determinación de mutagenicidad por el Método de incorporación en placa

En el ensayo de incorporación en placa, las cepas *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 de (His⁻) fueron crecidas en caldo nutritivo Oxoid N°2 durante toda la noche (12 hs, a 37°C).

Luego se sembraron 100 µL de cultivo junto con el extracto vegetal (acuoso, clorófmico o acetónico) de *Ilex paraguariensis var. paraguariensis* o *Ilex dumosa var. dumosa* (dilución correspondiente a una concentración final de 0.45, 4.50 y 45.00 mg/placa) en tubos de 13 x 100 mm con tapa, que contenían 2.0 mL de agar Top con solución de 0.5 mM de histidina/biotina.

Los ensayos de mutagenicidad se desarrollaron con y sin activación metabólica, es decir, con 500 µL de S9 mix o 500 µL de buffer fosfato (composición en Anexo 1) respectivamente. El contenido de cada tubo fue vertido sobre placas de AGM. Después de un período de incubación de 48 horas (37°C), se contaron las colonias revertantes His⁺. Se realizaron placas por triplicado en cada ensayo experimental. Los datos fueron expresados como la medio del número de colonias ± la desviación estándar de la media (S.D.). Se seleccionaron los controles negativos (número de revertantes espontáneos) y positivos (mutágenos diagnóstico) para el test de Ames de acuerdo a la cepa de *Salmonella typhimurium* (His⁻) usada en presencia/ausencia de S9 mix. En los casos donde se realizaron ensayos con extractos orgánicos de las plantas, se agregó un control de solvente, dimetilsulfóxido (DMSO, 500 µL) en lugar de buffer fosfato. Se usó 2AF (2.50 µg/placa) y 2NF (2.5 µg/placa) como mutágenos diagnóstico en TA98 con y sin S9 mix, respectivamente. Para TA100 con y sin S9 mix, se trabajó con 2AF (2.50 µg/placa) y SAZ (1.50 µg/placa), respectivamente.

- Determinación de mutagenicidad por el Método de preincubación

En el ensayo de preincubación, las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* (His⁻) fueron crecidas en caldo nutritivo Oxoid N°2 durante toda la noche (12 hs, a 37°C). Las cepas del cultivo de toda la noche (100 µL) fueron mezcladas con S9 mix (500 µL) o con 500 µL de buffer fosfato y el extracto acuoso, clorófmico o acetónico de hojas de *Ilex paraguariensis var. paraguariensis* o *Ilex dumosa var. dumosa* (100 µL de la dilución correspondiente a una concentración final de 0.45, 4.50 y 45.00 mg/placa).

La mezcla entera (Volumen final de 700µL) se homogeneizó y se preincubó a 37°C durante 20 minutos sin agitación. Luego la misma se vertió en un tubo que contenía 2.0 mL de agar Top con solución 0.5 mM de histidina/biotina y se mantenía a 45°C en un baño de agua a esa temperatura.

El contenido de cada tubo fue vertido sobre placas de AGM. Después de un período de incubación de 48 horas (37°C), se contaron las colonias revertantes His⁺. El grado de reversión se comparó con las placas de control positivo y negativo. Se realizaron placas por triplicado en cada ensayo experimental. Los datos fueron expresados como la medio del

número de colonias \pm desviación estándar de la media (S.D.). Se seleccionaron los controles negativos (número de revertantes espontáneos) y positivos (mutágenos diagnóstico) para el test de Ames de acuerdo a la cepa de *Salmonella typhimurium* (His⁻) usada en presencia/ausencia de S9 mix. En los casos donde se realizaron ensayos con extractos orgánicos de las plantas, se agregó un control de solvente, dimetilsulfóxido (DMSO, 500 μ L) en lugar de buffer fosfato. Se usó 2AF (2.50 μ g/placa) y 2NF (2.5 μ g/placa) como mutágenos diagnóstico en TA98 con y sin S9 mix, respectivamente. Para TA100 con y sin S9 mix, se trabajó con 2AF (2.50 μ g/placa) y SAZ (1.50 μ g/placa), respectivamente.

- Consideraciones e interpretaciones de resultados

Para el estudio inicial de una sustancia química, se recomienda ensayar concentraciones en rango mayor a **3 logaritmos** de dosis en presencia y ausencia de S9 mix, por eso se realizaron las primeras determinaciones utilizando 0.45, 4.50, 45.00 mg/ placa para cada extracto de cada una de las plantas de *Ilex paraguariensis* St Hil. var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* Reissek var. *dumosa*. Cada resultado positivo o cuestionable fue confirmado por demostración de la relación dosis respuesta, usando un rango más angosto de concentración.

Se determinó el **factor de mutagenicidad (FM)** para las dos variedades de *Ilex* ensayadas así como para cada uno de los extractos estudiados: En valor de FM constituye la relación entre la frecuencia de revertantes His⁺ y la frecuencia de revertantes espontáneos. Una sustancia es considerada mutagénica cuando el factor de mutagenicidad es mayor a 2 (Mattern, 1981).

$$\text{F.M.} = \frac{\text{Revertantes (a cierta conc. de sustancia)}}{\text{Revertantes espontáneos}}$$

Los datos obtenidos en los resultados fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) y a través de la prueba *t* de Student. El nivel de significación elegido fue de 0.05. Un análisis de tendencia se llevó a cabo para evaluar si la relación dosis- respuesta que se evidenciaba en algunas concentraciones de los extractos era lineal.

4.3. Ensayo de toxicidad

En los ensayos de mutagenicidad, se observaron las características de la población final en el fondo de la placa AGM que contenía el agar top, luego de 48 horas de incubación. En caso de observarse las características típicas de toxicidad en las colonias, se realizó el ensayo de toxicidad.

Estas características de toxicidad son las siguientes:

- Adelgazamiento de la capa de fondo que puede estar acompañada de una disminución en el número de colonias revertantes.
- Ausencia de la capa de fondo (ausencia de crecimiento).
- Identificar la presencia de colonias no revertidas (en general en relacionadas con la ausencia de la capa de fondo).

Los cultivos de *Salmonella* en caldo nutritivo de toda la noche consisten en gran medida en bacterias histidina dependientes con unas pocas bacterias histidina independientes (His^+) preexistentes que crecen durante las 12 horas de incubación. La adición de pequeñas cantidades de histidina al agar top permite que todas las bacterias plaqueadas (aproximadamente 1×10^8 células) sufran entre 6 y 8 divisiones celulares antes de que la histidina se agote. En muchos casos, esta limitación de crecimiento es esencial para que la mutagénesis ocurra permitiendo la fijación de lesiones mutacionales. Las bacterias His^+ así como las revertantes son fácilmente contadas contra una capa de fondo levemente opaca que se compone de microcolonias que dependen de histidina. Un examen al microscopio (40 X) de la capa de fondo en ausencia de toxicidad revela la presencia de una gran densidad de microcolonias las cuales forman una película fina granular que puede apreciarse en las Figuras 4.4 y 4.5. En esos casos, todas las bacterias histidina dependientes plaqueadas tuvieron de 6 a 8 divisiones celulares. Sin embargo, cuando la sustancia química investigada es tóxica, puede haber una “adelgazamiento” o ausencia completa de la capa de fondo comparado con el control negativo. Una toxicidad parcial del químico da lugar a un “adelgazamiento” de la capa ya que no todas las bacterias habrán muerto o tendrán inhibido su crecimiento. Las bacterias sobrevivientes todavía forman microcolonias pero no se ven densas y van a aparecer microcolonias esparcidas que serán las responsables de este efecto de “adelgazamiento”. Una disminución en el número de revertantes a niveles por debajo de los correspondientes a los de reversión espontánea en ocasiones también puede verse junto con el “adelgazamiento”. Una completa ausencia de capa de fondo indica altos niveles de toxicidad por no ser posible que las bacterias crezcan y formen la capa de fondo. Esa dosis tóxica no debe utilizarse.

Ocasionalmente, numerosas colonias pequeñas no revertantes están presentes en la placa. Estas colonias se conocen como “colonias de punta de alfiler” y consisten en bacterias histidina dependientes que han sobrevivido a altas toxicidades del compuesto químico. Estas colonias son visibles y pueden confundirse con revertantes. Sin embargo la observación microscópica revela una total ausencia de la capa de fondo. Estas “colonias de punta de alfiler” crecen debido al hecho de que altos niveles de toxicidad hacen que más histidina esté disponible para las bacterias His^- , pudiendo tener mayor cantidad de divisiones celulares antes

que la histidina se agote. La dependencia de histidina puede ser chequeada por siembra en estría de algunas “colonias de punta de alfiler” sobre placas de agar mínimo con biotina y sin histidina, en ausencia del compuesto químico.

En el ensayo toxicidad, es importante que se use el mismo número de bacterias que en el ensayo de mutagenicidad (Waleh y col., 1982).

Procedimiento:

Para examinar la toxicidad del extracto se agregó 500 µL de S9mix o 500 µL de buffer fosfato (según si el efecto se veía en el ensayo con o sin activación metabólica) y 100 µL de cultivo fresco de 12 hs de incubación de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98 o TA100 según correspondiera a 100 µL de la concentración del extracto acuoso, clorofórmico o acetónico de la planta (*Ilex paraguariensis var. paraguariensis* o *Ilex dumosa var. dumosa*). La mezcla entera (700 µL) fue preincubada a 37°C durante 60 minutos. Luego se realizó una dilución apropiada con buffer fosfato de forma de poder contar luego las UFC (dilución 1/10000) y se sembró en superficie 100 µL de la misma en placas de agar nutritivo. El mismo procedimiento se repitió buffer fosfato en la mezcla de preincubación como control negativo de toxicidad. También se realizaron los ensayos de toxicidad en 2NF (2.5 µg/placa), SAZ (1.50 µg/placa) y 2AF (2.5 µg/placa). Para las investigaciones en extractos ~~ácidos~~ ^{ácidos}, también se hizo un control de DMSO. El ensayo se realizó por triplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 hs. Pasado este plazo, se contaron las colonias en superficie de cada una de las placas y se calculó el promedio de los triplicados con su desviación estándar. La disminución significativa (P<0.05) en el número de UFC en las placas sembradas con el extracto de *Ilex* respecto de las contadas en las placas con buffer fosfato o DMSO, indicaron la presencia de toxicidad.

4.4. Ensayo de antimutagenicidad con *Salmonella typhimurium* (Prueba de Ames) en *Ilex paraguariensis var. paraguariensis* e *Ilex dumosa var. dumosa*

La investigación se desarrolló usando el ensayo de incorporación en placa y el de preincubación como se describe a continuación según el método de Maron y Ames, 1983

La capacidad antimutagénica de los extractos acuosos y orgánicos de *Ilex paraguariensis var. paraguariensis* e *Ilex dumosa var. dumosa* fue ensayada contra mutaciones inducidas por mutágenos directos e indirectos sobre cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* (His⁻). La actividad antimutagénica de los extractos de las dos variedades de *Ilex* (0.45, 4.50 y 45.00 mg/placa) fue evaluada contra 2AF (2.50 µg/placa), 2NF (2.5 µg/placa) and SAZ (1.50 µg/placa). Se emplearon controles negativos, en presencia y ausencia de S9 mix.

- Determinación de antimutagenicidad por el Método de incorporación en placa

En el ensayo de incorporación en placa, las cepas *Salmonella typhimurium* (TA98 o TA100) de (His⁻) fueron crecidas en caldo nutritivo Oxoid N°2 durante toda la noche (12 hs, a 37°C). Luego se sembraron 100 µL de cultivo y 100 µL de *dégenit* (2AF, 2NF o SAZ) a la concentración citada, junto con el extracto vegetal (acuoso, clorofórmico o acetónico) de *Ilex paraguariensis var. paraguariensis* o *Ilex dumosa var. dumosa* (100 µL de la dilución correspondiente a una concentración final de 0.45, 4.50 y 45.00 mg/placa) en tubos de 13 x 100 mm con tapa, que contenían 2.0 mL de agar Top con solución de 0.5 mM de histidina/biotina.

Los ensayos de antimutagenicidad se desarrollaron con y sin activación metabólica, es decir, con 500 µL de S9 mix o 500 µL de buffer fosfato respectivamente. El contenido de cada tubo fue vertido sobre placas de AGM. Después de un período de incubación de 48 horas (37°C), se contaron las colonias revertantes His⁺. Se realizaron placas por triplicado en cada ensayo experimental. Los datos fueron expresados como la media del número de colonias ± la desviación estándar de la media (S.D.). Se seleccionaron los controles negativos (revertantes espontáneos) y controles positivos (siembra con mutágenos diagnóstico únicamente) para el test de Ames de acuerdo a la cepa de *Salmonella typhimurium* (His⁻) usada en presencia/ausencia de S9 mix. En los casos donde se realizaron ensayos con extractos orgánicos de las plantas, se agregó un control de solvente, dimetilsulfóxido (DMSO, 500 µL) en lugar de buffer fosfato.

- Determinación de antimutagenicidad por el Método de preincubación

En el ensayo de preincubación, las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* (His⁻) fueron crecidas en caldo nutritivo Oxoid N°2 durante toda la noche (12 hs, a 37°C). Las cepas del cultivo de toda la noche (100 µL) fueron mezcladas con S9 mix (500 µL) o con 500 µL de buffer fosfato, 100 µL de mutágeno (2AF, 2NF o SAZ) a la concentración citada y el extracto acuoso, clorofórmico o acetónico de hojas de *Ilex paraguariensis var. paraguariensis* o *Ilex dumosa var. dumosa* (100 µL de la dilución correspondiente a una concentración final de 0.45, 4.50 y 45.00 mg/placa).

La mezcla entera (Volumen final de 800µL) se homogeneizó y se preincubó a 37°C durante 20 minutos sin agitación. Luego la misma se vertió en un tubo que contenía 2.0 mL de agar Top con solución 0.5 mM de histidina/biotina y se mantenía a 45°C en un baño de agua a esa temperatura.

El contenido de cada tubo fue vertido sobre placas de AGM. Después de un período de incubación de 48 horas (37°C), se contaron las colonias revertantes His⁺. El grado de reversión se comparó con las placas de control positivo y negativo. Se realizaron placas por triplicado en cada ensayo experimental. Los datos fueron expresados como la medio del número de colonias ± la desviación estándar de la media (S.D.). Se seleccionaron los controles negativos (revertantes espontáneos) y controles positivos (siembra con mutágenos diagnóstico únicamente) para el test de Ames de acuerdo a la cepa de *S. typhimurium* (His⁻) usada en presencia/ausencia de S9 mix.

La evaluación de la inhibición de la mutagenicidad fue calculada de acuerdo a Cariño-Cortez y colaboradores (2007) a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de mutagenicidad} = [1 - (\mathbf{R}_{\text{muestra investigada}} - \mathbf{R}_{\text{espontáneos}} / \mathbf{R}_{\text{mutágeno}} - \mathbf{R}_{\text{espontáneos}})] \times 100$$

Donde:

$\mathbf{R}_{\text{Muestra investigada}}$: número de revertantes/placa inducidos por la concentración del extracto de la variedad de *Ilex* investigada más el mutágeno.

$\mathbf{R}_{\text{Espontáneos}}$: número de revertantes espontáneos.

$\mathbf{R}_{\text{Mutágeno}}$: número de revertantes por placa inducidos por el mutágeno solo.

Se definió como 100% a la mutagenicidad de cada mutágeno en ausencia del extracto de *Ilex paraguariensis var. paraguariensis* o *Ilex dumosa var. dumosa*.

Un menor porcentaje de revertantes His⁺ en las muestras que contengan alguna de las concentraciones de los extractos de las dos variedades de *Ilex*, con respecto a los valores del control positivo, denota un efecto inhibitorio sobre el mutágeno.

4.5. Ensayo de Micronúcleo

4.5.1. Material Biológico: Grupo experimental

Se utilizaron 40 Ratones swiss machos, de 10 semanas de edad proveídos del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Los mismos fueron distribuidos en 8 grupos de 5 animales por cada uno. Un grupo se utilizó como control positivo y otro como control negativo. El control positivo fue inyectado con Ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.). El control negativo fue inyectado con solución isotónica de NaCl al 0.9%.

Los animales pesaban alrededor de 30 gramos y mostraban un buen estado de salud. Los pesos de los animales fueron obtenidos en balanza granataria.

Los animales se distribuyeron en 4 cajas enumeradas, con 10 ratones cada una, correspondiente a dos grupos, se les hizo una cama con aserrín que se cambiaba cada 48 horas. Los ratones tenían acceso a agua y comida sin restricciones (Figuras 4.6 y 4.7).

Se mantuvieron en un ambiente adecuado con temperatura controlada de 22 ± 3 °C y un ciclo de luz- oscuridad de 12 por 12 hs. La humedad relativa del recinto fue del 50-60%. Los animales fueron tratados de acuerdo con los procedimientos descritos en Principles of Laboratory Animal Care. National Institute of Health) Publication N 86-23 revised (1985).



Figura 4.6: Jaulas con 10 ratones cada una: JAULA 1: con ratones de cola verde, 1 a 5 marcas, inyectados con ciclofosfamida 50mg/kg peso corporal; ratones de cola roja, 1 a 5 marcas, inyectados con solución fisiológica (0.9% cloruro de sodio). JAULA 2 con ratones de cola verde, 1 a 5 marcas, inyectados con 1000 mg/kg de peso corporal de extracto de *Ilex paraguariensis*; ratones con cola roja, 1 a 5 marcas, inyectados con 2000 mg/kg de peso corporal de *Ilex paraguariensis*



Figura 4.7: Jaulas con 10 ratones cada una: JAULA 3: con ratones de cola verde, 1 a 5 marcas, inyectados con 500 mg/kg de peso corporal de extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis*; ratones de cola roja, 1 a 5 marcas, inyectados con 500 mg/kg de peso corporal de extracto de *Ilex dumosa* var. *dumosa*. JAULA 4: con ratones de cola verde, 1 a 5 marcas, inyectados con 1000 mg/kg de peso corporal de extracto de *Ilex dumosa* var. *dumosa*; ratones con cola roja, 1 a 5 marcas, inyectados con 2000 mg/kg de peso corporal de *Ilex dumosa* var. *dumosa*.

4.5.2. Selección de los niveles de dosis del extracto de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var. *dumosa* administrados a los ratones

Los criterios para la selección de la dosis se basan en los valores de la DL_{50} ¹. El mayor nivel de dosis debe mostrar cierta toxicidad en la médula ósea y se selecciona según alguno de los criterios siguientes:

- a- Dosis máxima tolerada.
- b- 80% de la DL_{50} .
- c- 2000 mg/kg p.c. (si el producto no es tóxico).

Las dosis restantes deben ser el 50% y 25% de la mayor dosis a efectos de demostrar el efecto relacionado con la dosis.

En el presente ensayo se trabajó con el extracto de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var. *dumosa* que arrojó mayor mutagenicidad en el ensayo de Ames en un nivel de dosis máximo de 2000 mg/ kg p.c. del animal (opción c), valor utilizado en la Guideline 401 de la OECD (1987) en los tests de toxicidad límite para estudios de dosis única en cualquier

compuesto. Las dosis restantes elegidas fueron 1000 mg/kg p.c. (50% del nivel máximo) y 500 mg/kg p.c.(25% de la dosis mayor), para tratar de demostrar la relación entre la dosis y el efecto.

Vías de administración y volumen

Se utilizó la vía intraperitoneal (i.p.) como vía de administración ya que ésta no presenta factores modificadores del compuesto.

El volumen administrado por animal fue de 0.1mL/10g/kg p.c., habiendo sido pesados previamente antes de ser inyectados.

Como vehículo, en el caso de elegirse un extracto orgánico de las plantas de *Ilex*, por ser una suspensión insoluble, se empleó aceite de maíz virgen.

Esquema de tratamiento y tiempo de sacrificio

La administración se realizó según lo planteado en la Guideline 474 de la OECD Mayo 1983 de 5 aplicaciones en cada ratón, separadas unas de otras por un tiempo de 24 hs.

Pasado el período de tratamiento, se realizó el sacrificio 24 hs después de la última aplicación. Luego los ratones fueron eutanizados por inhalación con dióxido de carbono y se removieron sus fémures (Fig. 4.8). Los animales fueron tratados de acuerdo con los procedimientos descritos en Principles of Laboratory Animal Care (National Institute of Health Publication N 86-23 revised (1985).

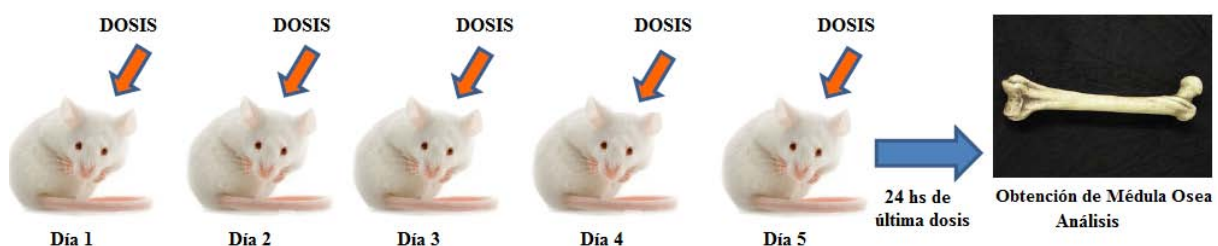


Figura 4.8: Esquema de administración de las dosis

¹Dosis Letal, 50%. Dosis de una sustancia que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba.

Procedimiento experimental

Se pesaron los animales el primer día de tratamiento.

Se siguió el procedimiento descrito por Maei y Schmid (1976).

Se realizó la administración intraperitoneal del extracto que mostró mayor mutagenicidad en el ensayo de Ames de las dos variedades de *Ilex* en las concentraciones citadas en el punto 4.5.2 a cada ratón, siguiendo el esquema de tratamiento indicado. El mismo procedimiento se realizó con Ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.) como control positivo y solución isotónica de NaCl al 0.9% (solución fisiológica) como control negativo.

Pasados los días de tratamiento, los animales fueron sacrificados 24 hs después por dislocación cervical en previa atmósfera de éter. Se realizó la disección del animal, agregando alcohol al 70%, a nivel del abdomen y las extremidades inferiores. Se cortó la piel que cubre las patas traseras. Se hizo un corte a nivel de la unión curso femoral y otro más debajo de la rodilla o rótula, con un movimiento en sentido contrario al de la articulación. Esto permitió desgarrar los músculos insertados y dejar el hueso al descubierto. Con gasa se limpió bien el fémur de los restos de músculo. Se cortó por un extremo el fémur. La Figura 4.9 muestra la separación del cuerpo de los fémures del ratón para obtener de ellos la médula ósea a las 24 hs de finalizado el tratamiento de administración de la sustancia durante 5 días. Se colocaron los huesos en el tubo de ensayo conteniendo aproximadamente 1 mL de albúmina bovina al 5% como diluyente. Se tomó la jeringa (previamente cargada con suero del tubo) y se introdujo la aguja por una de las partes cortadas del hueso. Se cargó y descargó el líquido aproximadamente 3 veces, hasta que el hueso perdiera su tonalidad rosada (Figuras 4.10, 4.11, 4.12 y 4.13). Se centrifugó a 100 rpm durante 10 minutos. Luego se eliminó el sobrenadante y se dejó aproximadamente de 0.1 a 0.3 mL sobre el botón celular que se resuspende. Se resuspendió el pellet de células con el resto de albúmina que quedaba en el tubo. Con una pipeta Pasteur se tomó la suspensión de células y se adicionó una gota en uno de los extremos de la lámina que se iba a extender (2 por animal). Se tomó el cubre objeto y se colocó en uno de los bordes encima de la gota (con un ángulo de 45°), se esperó a que ésta se extienda por toda la base el cubreobjeto. Se rotularon las láminas y se las dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 hs. Luego se fijaron y se tiñeron las láminas. Se rociaron las láminas con metanol a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se descartó el metanol escurriendo las láminas y se las dejó secar al aire. Se rociaron las láminas con solución de Giemsa al 5% durante 11 a 15 minutos (Schmid, 1976). Se descartó el metanol escurriendo las láminas, se enjuagaron con agua de la canilla y se las dejó secar. La Figura 4.14 muestra un esquema de la metodología de preparación de los extendidos de médula ósea y la Figura 4.15 muestra los

extendidos de médula ósea fijados y coloreados con metanol y colorante Giemsa al 5%. Se observaron al microscopio óptico 1000x. Se contaron 500 eritrocitos totales diferenciando los policromáticos (PCE) de los normocromáticos (NME) para hallar el índice PCE/NCE. Luego se completó hasta 1000 el número de PCE para determinar la frecuencia de Micronúcleos (Schmid, 1976).



Figura 4.9: Separación del cuerpo de los fémures del ratón para obtener de ellos la médula ósea a las 24 hs de finalizado el tratamiento de administración de la sustancia durante 5 días.

4.5.3. Interpretación de resultados

De acuerdo a los datos obtenidos en el conteo celular, se determinó la frecuencia de aparición de micronúcleos (MN) en los eritrocitos policromatófilos en los tratamientos (niveles de dosis) y su comparación con los controles (Schmid, 1976).

- Del conteo de MN se determinó la frecuencia de Mn por la relación Mn/PCE.

$$\%MN = \text{número de MN} / 1000 \text{ PCE}$$

- Del conteo de eritrocitos normocromáticos (NCE) se calculó el índice de toxicidad que se determina por la relación PCE/NCE.

$$I = \text{PCE} / \text{NCE}$$

4.5.4. Análisis de datos

Los datos de eritrocitos normocromáticos y policromáticos de médula ósea de ratón fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) y por la prueba *t* de *Student*.

4.5.5. Criterios de positividad

Según Schmid (1976), los criterios de positividad son los siguientes:

- a- Positivo: Al menos una dosis estadísticamente significativa y relación lineal entre el incremento de la dosis y la respuesta.
- b- Negativo: No hay diferencia entre las dosis y el control negativo y por tanto no hay curva dosis – respuesta.
- c- Equívoco: Cuando no se cumplen ninguna de las dos situaciones anteriores, por ejemplo: una dosis es significativa pero no hay curva dosis – respuesta.



Figura 4.10: Extracción de médula ósea de ratones de la jaula 1 en 1 mL de albúmina bovina.

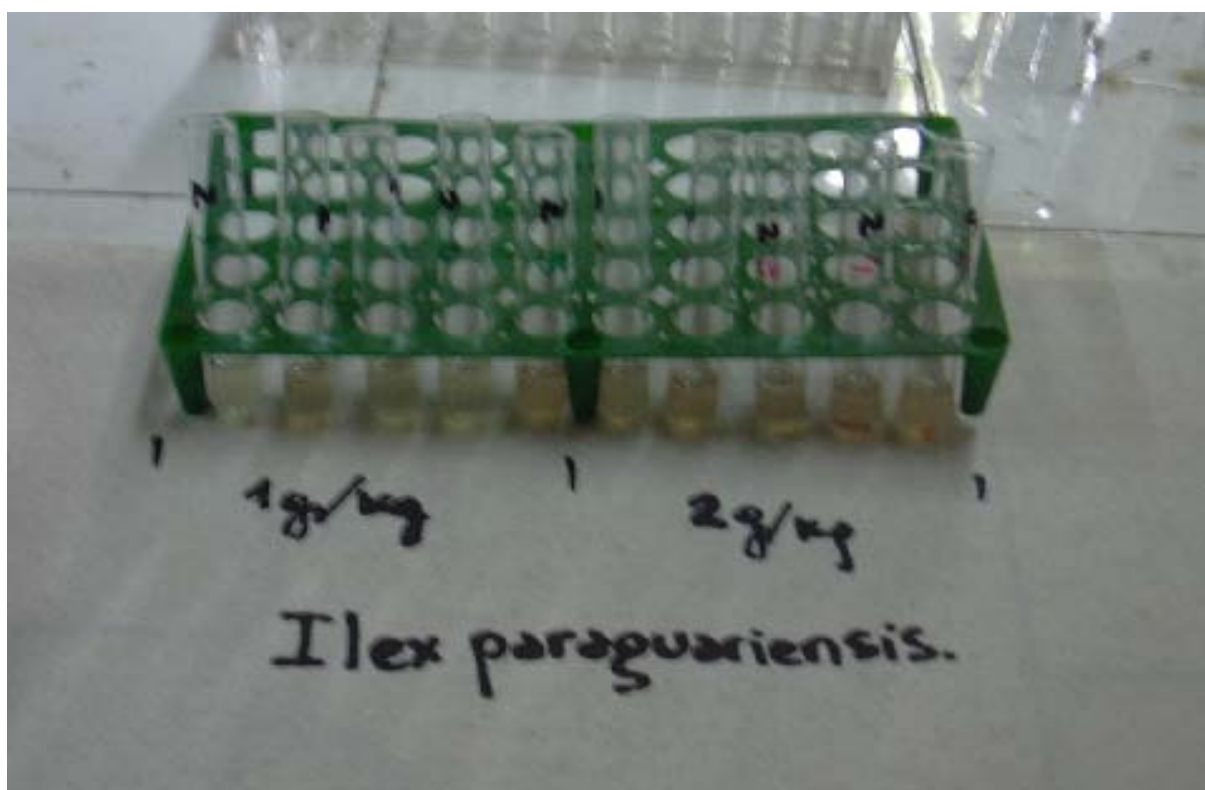


Figura 4.11: Extracción de médula ósea de ratones de la jaula 2 en 1 mL de albúmina bovina.

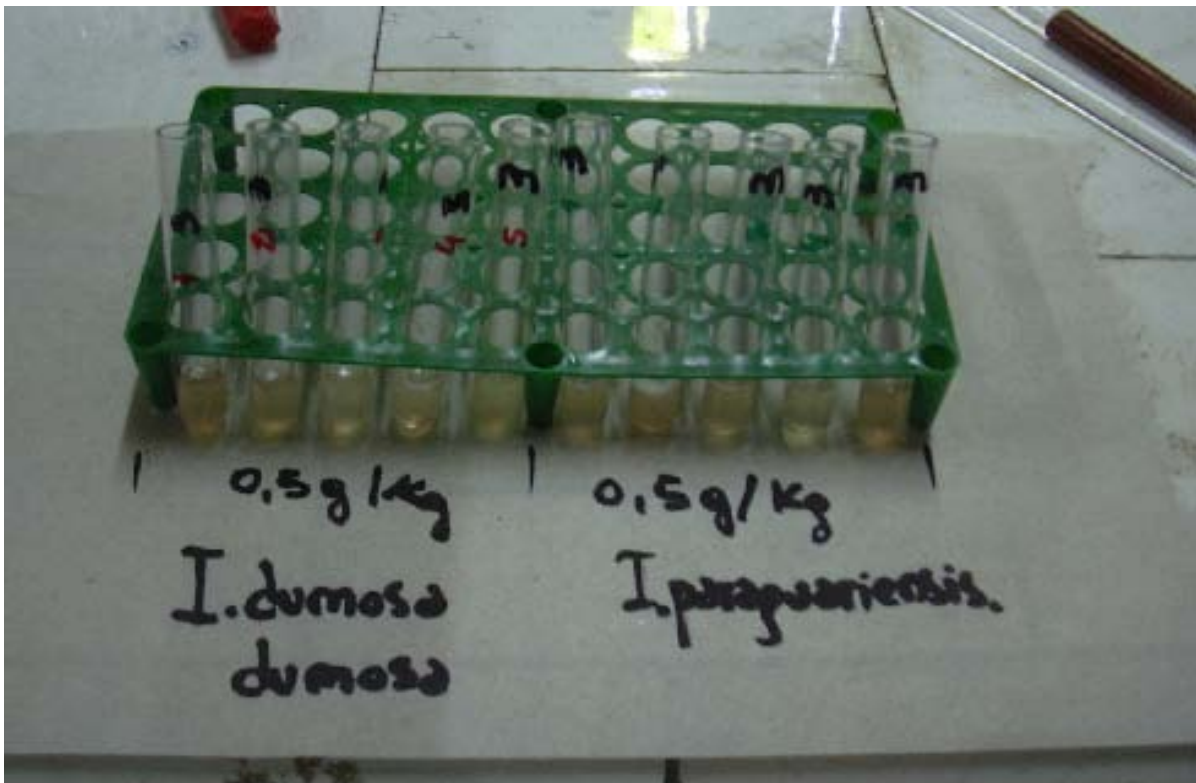


Figura 4.12: Extracción de médula ósea de ratones de la jaula 3 en 1 mL de albúmina bovina.

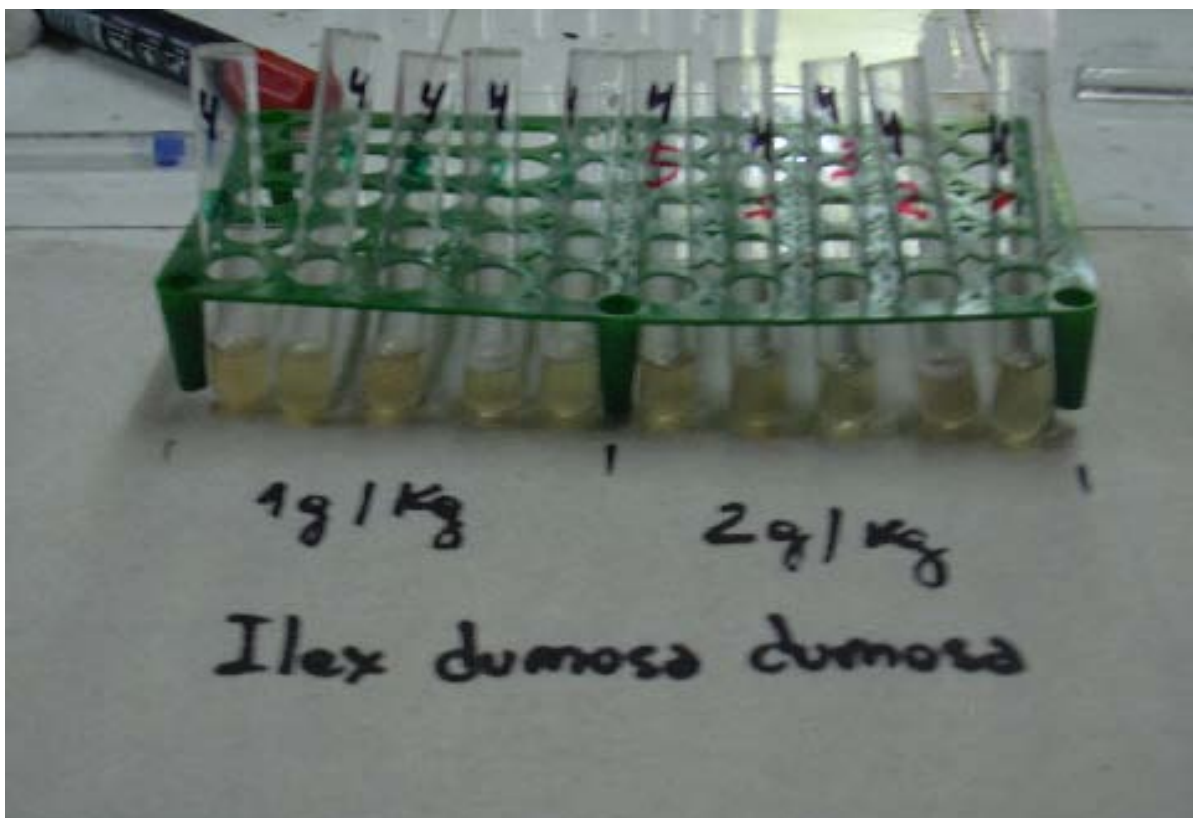


Figura 4.13: Extracción de médula ósea de ratones de la jaula 4 en 1 mL de albúmina bovina.

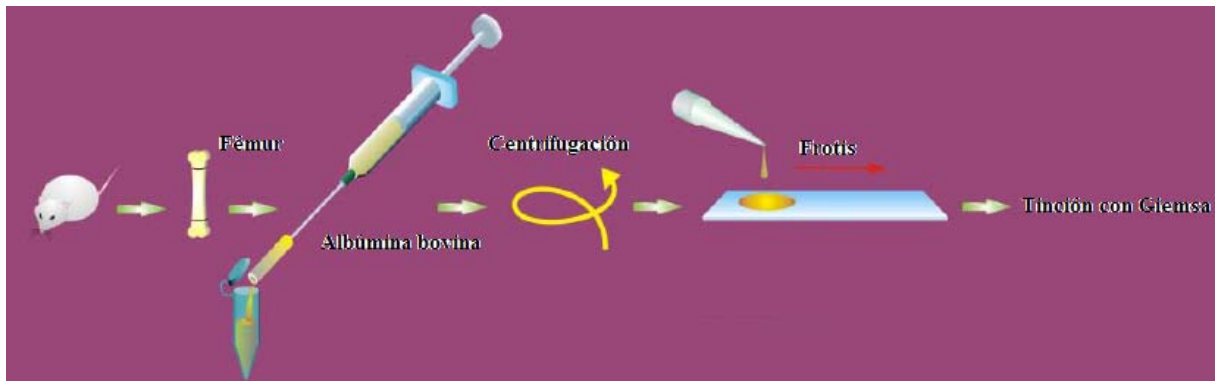


Figura 4.14: Esquema de la metodología de preparación de los preparados de médula ósea



Figura 4.15: Extendidos de médula ósea de ratón realizados por duplicado, fijados con metanol y teñidos con solución de Giemsa al 5%.

4.6. Material de laboratorio

4.6.1. Reactivos y soluciones

La preparación de las soluciones y los medios de cultivo para el Ensayo de Salmonella microsoma se encuentra en el Anexo 1 y preparación de las soluciones para el Test de micronúcleo se encuentra en el Anexo 2.

- Ciclofosfamida (CAS 50-18-0)(control positivo) (Endoxan,de la firma ASTA Pharma AG).
- Cloroformo (CAS 67-66-3) (MERCK KGaA).
- Coloración de Giemsa al 5%: Alcohol metílico (CAS 67-56-1), Eosina (CAS 17372-87-1), Azul de metileno (CAS 61-73-4) (MERCK KGaA), Glicerina (CAS 56-81-5).
- Solución isotónica de NaCl 0.9% (Solución fisiológica)
- Albúmina Bovina al 5%
- Mutágenos standard:
 - Azida sódica (SAZ, CAS 26628-22-8) (Sigma Chemical Co.).
 - 2-Aminofluoreno (2AF, CAS 153-78-6) (Sigma Chemical Co.).
 - 2-Nitrofluoreno (2NF, CAS 607-57-8) (Sigma Chemical Co.).
- Cloroformo (CAS 67-66-3) (MERCK KGaA).
- Acetona (CAS 67-64-1) ((MERCK KGaA).
- Dimetilsulfóxido (DMSO, CAS 67-68-5) (MERCK KGaA).
- L-histidina.HCl (CAS 71-00-1) (MERCK KGaA).
- D-biotina (CAS 58-85-5) (MERCK KGaA).
- Ampicilina (Amp, CAS 69-53-4) (MERCK KGaA).
- Glucosa 6- fosfato (G6P, CAS 56-73-5) (Sigma Chemical Co.).
- β -nicotin-amida-adenina dinucleótido fosfato (β -NADP, CAS 24292-60-2) (Sigma Chemical Co.).
- Fracción de homogenato de hígado S9 (Moltox Molecular Toxicology Inc.)
- Agua bidestilada
- Vogel Bonner medio E (50x). Uso: medio mínimo
- Solución 0.5mM histidina/biotina. Uso: ensayo de mutagenicidad
- Top agar. Uso: ensayo de mutagenicidad.
- Solución salina (1.65 M KCl y 0.4 M MgCl₂). Uso: ensayo de mutagenicidad con S9 mix.
- 0.2M Buffer fosfato de Sodio, pH7.4
- Solución 0.1 M NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) Uso: ensayo de mutagenicidad con S9 mix.
- Glucosa 6 fosfato 1 M. Uso: ensayo de mutagenicidad con S9 mix.
- S9 mix (enzimas microsomales de hígado de rata + cofactores)
- Solución de Ampicilina (8mg/mL). Uso: test de resistencia a Ampicilina – Placas maestras para cepas factor R.

- Solución de Cristal violeta (0.1%). Uso: Test de sensibilidad a cristal violeta (para confirmar mutación rfa).
- Placas de medio mínimo con glucosa. Uso: ensayo de mutagenicidad.
- Placas de agar nutritivo. Uso: Test para genotipo: sensibilidad a cristal violeta y sensibilidad a UV.
- Test de viabilidad de bacterias.- recuento de UFC.mL⁻¹ para establecer el valor de un cultivo midiendo su D.O.
- Placas de histidina/biotina. Uso: placas maestras para cepas no factor R. Test de requerimiento de histidina.
- Placas de Ampicilina. Uso: placas master para cepas que llevan plásmidos pKM101- Test para resistencia a Ampicilina.

4.6.2. Material y equipamiento de laboratorio

Material

- Discos de papel de filtro estériles (Difco)
- Ansas en punta y en anillo
- Cajas de Petri descartables estériles, de 100 mm de diámetro
- Puntas para micropipeta
- Pipetas de vidrio
- Puntas de micropipeta
- Tubos de vidrio
- Frascos con tapón de rosca
- Matraces
- Tubos estériles
- Agujas y jeringas descartables de 1 mL
- 4 Jaulas para ratones
- Aserrín o piedras absorbentes
- Bisturí
- Porta y cubreobjetos
- Pipetas de vidrio
- Puntas de micropipeta
- Tubos de vidrio
- Matraces

Equipamiento de laboratorio

- Balanza granataria.
- Micropipeta de 100 a 1000 μ l (Eppendorf)
- Microscopio Ortholux II Leitz con cámara fotográfica incorporada.
- Laboratorio de temperatura controlada.
- Flujo laminar FILTRAR.
- Espectrofotómetro UV-Vis con software automatizado.
- Cámara de refrigeración y congelación.
- Autoclaves.
- Estufas de incubación.
- Baño Selecta
- Placa magnética caliente agitadora
- Agitador de Tubos
- Micropipeta de 100 a 1000 μ l (Eppendorf)
- Shaker Rolco.
- Freezer a -20°C , -80°C .
- Balanza analítica y granataria.
- Estufa de secado.
- Equipo Soxhlet
- Liofilizador

5. Ilex paraguariensis
var. paraguariensis

5.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en yerba mate

- Ensayos Preliminares

En cada uno de los ensayos realizados se confirmaron los genotipos de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 a través de las siguientes determinaciones:

- Requerimiento de Histidina: Se observó crecimiento en el medio con histidina- biotina y falta de crecimiento en el control negativo con biotina.
- Mutación rfa: Hubo aparición de una zona clara de inhibición alrededor del disco embebido en solución cristal violeta 1 mg.mL⁻¹.
- Mutación uvrB: Las cepas TA98 y TA100 crecieron sólo en la zona no irradiada, cubierta con una pieza de cartón, mientras que la cepa *Salmonella typhimurium* ATCC 18684 utilizada como control positivo, creció en toda la placa.
- Factor R: Se evidenció la presencia del factor de resistencia a ampicilina en el medio con dicho antibiótico a través del crecimiento de las cepas TA98 y TA100 y la ausencia de crecimiento de la cepa de tipo salvaje ATCC 18684.

- Curva de crecimiento de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 vs. Densidad óptica

El objetivo de este ensayo fue estudiar la cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 en cultivos incubados a 37°C en caldo nutritivo Oxoid N°2 determinando simultáneamente en cada punto de muestreo los recuentos y la absorbancia. Se ajustó la concentración obtenida en el rango de 1 a 2.10⁹ células.mL⁻¹ (Maron y Ames, 1983).

Se construyeron curvas de densidad óptica (DO) vs. Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC.mL⁻¹) de las dos cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100)

La Figura 5.1a muestra la recta de regresión lineal expresada en Log (UFC.mL⁻¹) vs. DO a 650 nm para la cepa TA98 la cual mostró una pendiente b igual a 2.877 (log (UFC.mL⁻¹)/DO) y una ordenada al origen a igual a 6.34 (log(UFC.mL⁻¹)), con un coeficiente de correlación r² igual a 0.89.

La Figura 5.1b muestra la recta de regresión lineal expresada en Log (UFC.mL⁻¹) vs. DO a 650 nm para la cepa TA100 la cual presentó una pendiente b igual a 1.957 (log (UFC.mL⁻¹)/DO) y una ordenada al origen a igual a 7.45 (log(UFC.mL⁻¹)), con un coeficiente de determinación r² igual a 0.86.

Se observó que las velocidades de crecimiento de cada cepa son significativamente distintas (P<0.05) para valores de densidad óptica mayores a 1, debiéndose realizar distintas diluciones

de los cultivos de cada cepa en el momento de realizar el ensayo de incorporación en placa con preincubación.

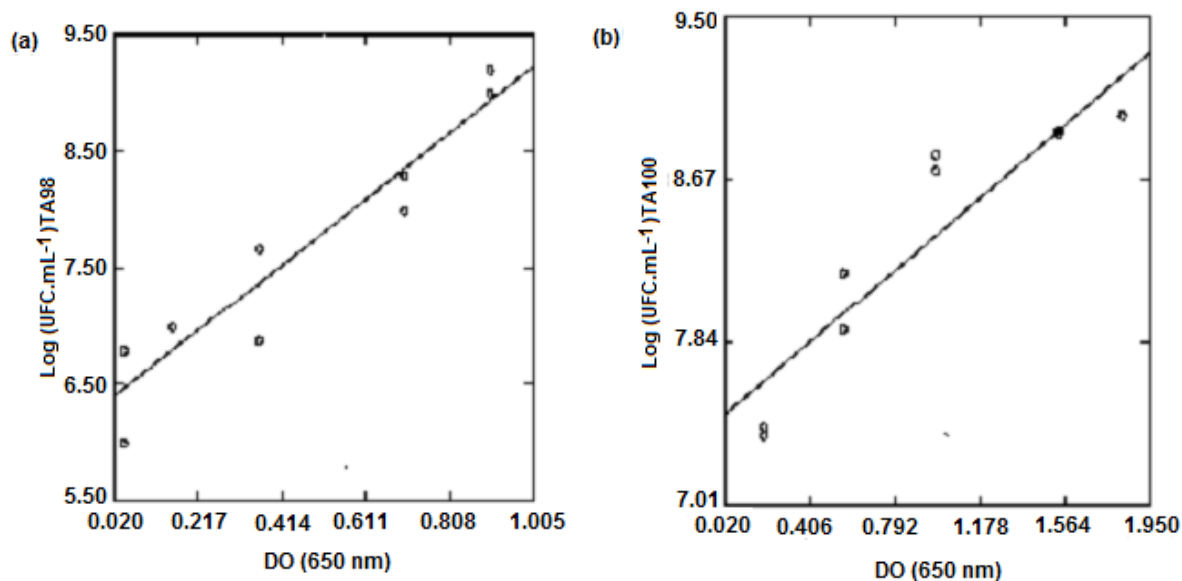


Figura 5.1: Relación entre log (UFC/ml) vs densidad óptica (DO) medida a 650 nm para para la cepa *Salmonella typhimurium* TA98 (a) y TA100(b).

- Ensayo de Salmonella Microsoma

La investigación de los efectos mutagénicos de los extractos de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* se realizaron utilizando el método de preincubación las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* (His⁻).

Se decidió usar este procedimiento porque, salvo algunas excepciones, el ensayo con preincubación es más sensible que el ensayo de incorporación en placa (Test de Ames clásico) debido a que los metabolitos de vida corta pueden tener mejor probabilidad de reaccionar con las cepas bacterianas en el pequeño volumen de la mezcla de preincubación. Asimismo, la concentración de S9 mix en el volumen de preincubación tiene mayor efectividad en su acción de modificar sustancias que en el ensayo de incorporación en placa (Haworth y col., 1983; Mortelans y col., 1986; Yahagi y col., 1975; Zeiger y col., 1987, 1988).

Este método se realizó con dos variantes:

1. Con incorporación de activación enzimática S9 mix (S9 +).
2. Sin incorporación de activación enzimática S9 mix (S9-).

Las cepas bacterianas se cultivaron a 37°C hasta el final de la fase estacionaria de crecimiento. La densidad celular osciló entre 1-2 por 10⁹ células.mL⁻¹. Esta densidad elevada fue necesaria por lo siguiente:

- El número de revertantes espontáneos para cada cepa, depende del número de auxótrofos para histidina que crecen luego de 48 horas de incubación. Este número viene determinado por la concentración de histidina del agar, y es independiente dentro de los límites (10^5 a 10^9 células) del número de bacterias del inóculo inicial.

-El número de revertantes inducidos depende del inóculo inicial, debido a la baja frecuencia de mutaciones, es esencial usar poblaciones de concentración elevada para poder detectarlas. Si el inóculo es bajo, el número de revertantes espontáneos podría ser normal, pero el número de los revertantes inducidos por el mutágeno podría ser menor e incluso pasar inadvertido.

Se realizó el ensayo de dosis respuesta (actividad mutagénica) utilizando tres niveles de dosis que abarquen tres logaritmos de concentración en cada uno de los extractos: acuoso, clorofórmico y acetónico sobre ambas cepas de *Salmonella typhimurium*.

En una segunda etapa, se identificó aquellas dosis de extractos que mostraron mutagenicidad y se confirmó la misma haciendo nuevamente ensayos que demostraron la relación lineal entre la dosis del extracto, en el orden de concentración seleccionado y la cantidad de revertantes por placa.

En cada grupo de experimentos se confirmó los genotipos de *Salmonella thiphymurium* TA98 y TA100. Se hicieron controles de esterilidad en el homogenato de hígado de ratón S9 mix, y los extractos clorofórmicos y acetónicos de las hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* que se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Los mismos mostraron estar estériles, sin embargo, las soluciones de los extractos acuosos debieron ser esterilizadas por filtración.

5.1.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*

5.1.1.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin activación metabólica

Los controles negativos usando buffer fosfato arrojaron un valor de 46.0 ± 1.0 y 191.0 ± 8.0 revertantes espontáneos por placa para las cepas TA98 y TA100, respectivamente.

Estos valores se encuentran dentro del rango esperado para la cepa TA98 ($P > 0.05$) (entre 15 y 75 revertantes/placa) (De Serres y Shelby, 1979), (entre 30 y 50 revertantes/ placa) (Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000) y la cepa TA100 ($P > 0.05$) (entre 60 y 220

revertantes/placa) (De Serres y Shelby, 1979), (entre 120 y 200 revertantes/ placa) (Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000).

El control positivo usando 2-nitrofluoreno (2 NF, 2.50 µg por placa) como inductor de mutagenicidad para la cepa TA98 sin S9 mix, arrojó un valor de 226.0 ± 16.0 revertantes por placa, siendo dicho recuento significativamente mayor al control negativo ($P < 0.05$). Este resultado confirmó las propiedades de reversión y especificidad de la cepa TA98 (Maron y Ames, 1983).

El control positivo usando Azida de Sodio (SAZ) en cantidades de 1.50 µg por placa, se usó como inductor de mutagenicidad para la cepa TA100 sin S9 mix, arrojando un valor de 486.0 ± 30.0 revertantes por placa. Este recuento fue significativamente mayor al control negativo ($P < 0.05$), confirmando las propiedades de reversión y especificidad de la cepa TA100 (Ames, 1983). Valores similares informan otros autores con las mismas concentraciones de mutagenos para *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 (González López y col., 2001; Vizoso Parra y col., 2002; Gutierrez Martinez y col., 2005; Piloto Ferrer y col., 2006). Sin embargo, Maron y Ames (1983) informaron una cantidad de 3000 revertantes por placa para la concentración de SAZ utilizada.

El extracto acuoso se obtuvo según el procedimiento descrito en la Farmacopea Nacional Argentina VI Ed descrito en la sección 4.1.2. a partir de 5 gramos de hojas secas trituradas con 70 mL de agua destilada y sometida a un proceso de cocción a 80°C. Un vez enfriado 40-45°C se filtró usando papel y se llevó a volumen en matraz de 100 mL. El extracto acuoso presentó un pH de 6.0.

Como investigación preliminar de mutagenicidad, se realizó un ensayo de preincubación sin S9 mix, tomando un amplio rango de dosis del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, para abarcar tres logaritmos de concentración: 0.45, 4.50 y 45.00 mg /placa. De esta forma se buscó el nivel de dosis que presentara mutagenicidad para luego corroborar el resultado a través de la realización del mismo ensayo pero en un rango de concentración más acotado para comprobar la linealidad de dosis-respuesta.

Se determinó el factor de mutagenicidad (F.M.), considerándose una sustancia mutagénica cuando este factor es igual o mayor a 2 (Mattern, 1981).

El F.M. es el cociente entre la frecuencia de revertantes His⁺/placa empleando la sustancia a ensayar y la frecuencia de mutagénesis espontánea.

La Tabla 5.1 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, tratadas con tres

logaritmos de concentración de extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en ausencia de S9 mix.

Tabla 5.1: Efecto mutagénico del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo de preincubación, sin activación metabólica, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

| Agente | | Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix - Preincubación | | | |
|---------------------|----------------------|--|-------------------|---------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP | 0.00 mg ^a | 46.0 ± 1.0 | | 191.0 ± 8.0 | |
| YPP | 0.45 mg | 47.0 ± 2.0 | 1.0 | 220.0 ± 14.0 | 1.2 |
| YPP | 4.50 mg | 309.5 ± 1.0 ^b | 6.7 | 221.0 ± 8.0 | 1.2 |
| YPP | 45.00 mg | 157.5 ± 20.5 ^b | 3.4 | 267.0 ± 6.0 | 1.4 |
| 2NF | 2.50 µg | 226.0 ± 16.0 ^b | 4.9 | | |
| SAZ | 1.50 µg | | | 486.0 ± 30.0 ^b | 2.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2NF, 2-Nitrofluoreno; SAZ, Azida de sodio

En presencia de la cepa TA98, la concentración del extracto acuoso de la planta de 0.45 mg/placa no mostró un aumento en el número de revertantes respecto al control negativo sin activación metabólica (P>0.05). Sin embargo, se observó un aumento significativo (P<0.05) en el número de revertantes para la concentración de 4.50 mg/placa (309.5 ± 1 revertantes por placa), dando un F.M. igual a 6.7 (mutagénico).

Luego, en la concentración de 45.00 mg/placa, estos valores también aumentaron significativamente la frecuencia de revertantes His⁺ respecto del control negativo (157.5 ± 20.5 revertantes por placa), pero la cantidad disminuyó en comparación con la concentración de 4.50 mg/placa (el F.M. disminuyó de 6.7 a 3.4), observándose en el cultivo la presencia de colonias deformadas, con disminución de la opacidad de la capa de fondo bacteriana.

Este hallazgo estaría indicando una posible toxicidad, por lo que se decidió realizar un ensayo de toxicidad en agar nutritivo para confirmarlo. También se decidió realizar una curva de dosis-respuesta en el rango de 4.50 a 20.00 mg/placa.

En presencia de la cepa TA100, las tres concentraciones del extracto acuoso de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo sin activación metabólica ($P > 0.05$). El factor de mutagenicidad (F.M.) arrojó valores cercanos a 1 siendo considerados como no mutagénicos (Ames y col., 1975). Esto estaría indicando que en el extracto acuoso, en las concentraciones ensayadas, no habría sustancias mutagénicas frente a esta cepa, cuyo mecanismo de acción sea la sustitución de pares de bases y por esta razón no se realizó una curva de dosis-respuesta.

- Ensayo de toxicidad sobre el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* en la dosis 45.00 mg/placa para la cepa TA98, sin activación metabólica

El efecto tóxico que pueden ejercer determinadas concentraciones de un producto químico sobre las bacterias podría enmascarar el efecto mutagénico, principalmente cuando la acción letal del compuesto sea elevada a concentraciones débilmente mutagénicas; o bien podría inducir a error en la interpretación de resultados, ya que las colonias revertantes crecen sobre un fondo de bacterias auxotróficas que aparecen debido a las trazas de histidina y biotina añadidas al medio, de forma que en el caso de que la concentración ensayada sea tóxica y, por tanto produzca una muerte masiva de las bacterias his-, habrá mayor cantidad de histidina disponible para las bacterias sobrevivientes.

A consecuencia de lo anterior, se producirá mayor división celular y aparecerán colonias pequeñas que pueden confundirse con revertantes inducidas, sin serlo. Por ello es por lo que debe examinarse siempre con atención el fondo bacteriano.

Para la concentración de 45.00 mg/placa de extracto acuoso de yerba mate se observó sobre las placas del ensayo de mutagenicidad la presencia de colonias deformadas, con disminución de la opacidad de la capa de fondo de bacterias auxotróficas.

Se realizó un ensayo de toxicidad siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos sección 4.3.

La Tabla 5.2 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de toxicidad para la concentración de 45.00 mg/placa de extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sin activación metabólica. Se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) en el recuento de colonias de TA98 (1121.0 ± 56.0 UFC.mL⁻¹) respecto del control negativo (2965.0 ± 45.0

UFC.mL⁻¹). Este resultado estaría indicando que la disminución en la concentración bacteriana se debe a toxicidad del extracto en la dosis ensayada.

El ensayo realizado con el control positivo utilizando 2NF (2.50 µg/placa) mostró un recuento de colonias (3120.0 ± 12.0 UFC.mL⁻¹) similar al control negativo (P>0.05) indicando la ausencia de toxicidad en la dosis ensayada. Además, la placa del mutágeno no mostró signos de toxicidad en la forma de las colonias o en la capa de fondo bacteriano durante el ensayo de mutagenicidad con preincubación.

Tabla 5.2: Efecto tóxico del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP) en la concentración de 45.00 mg/placa, sin activación metabólica, con la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

| Ensayo de Toxicidad | | |
|---------------------|----------------------|----------------------------|
| Agente | Cepa TA98 | |
| Concentración/placa | UFC.mL ⁻¹ | |
| YPP | 0.00 mg ^a | 2965.0 ± 45.0 |
| YPP | 45.00 mg | 1121.0 ± 56.0 ^b |
| 2NF | 2.5 µg | 3120.0 ± 12.0 |

^a, Control negativo de toxicidad

^b, P ≤ 0.05

UFC, Unidades Formadoras de Colonias

- Ensayo de linealidad de dosis-respuesta del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* con la cepa TA98 en ausencia de S9 mix

Se evaluó la relación entre la concentración de extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y los revertantes en placa en el rango de 4.50 a 20.00 mg/placa, usando 4 concentraciones: 4.50, 10.00, 15.00 y 20.00 mg/placa, sembrados sin activación metabólica (S9-).

La Tabla 5.3 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de *Salmonella* microsoma con preincubación con la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, tratada con las cuatro concentraciones crecientes de extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en ausencia de S9 mix. Se observó en todas las dosis ensayadas que el F.M. era superior a 2 y existía una correlación lineal entre la cantidad de revertantes y la concentración de extracto acuoso por placa (Fig.5.2).

Tabla 5.3: Efecto mutagénico del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP) en las dosis estudiadas para evaluar linealidad de efecto vs dosis, utilizando el ensayo de preincubación, sin activación metabólica, con *Salmonella typhimurium* TA98.

| Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix | | | |
|------------------------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|
| Agente | | Cepa TA98 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP | 0.00 mg ^a | 57.3 ± 1.0 | |
| YPP | 4.50 mg | 309.5 ± 1.0 ^b | 5.4 |
| YPP | 10.00 mg | 449.0 ± 38.0 ^b | 7.8 |
| YPP | 15.00 mg | 562.0 ± 21.0 ^b | 9.8 |
| YPP | 20.00 mg | 697.0 ± 41.0 ^b | 12.2 |
| 2NF | 2.50 µg | 250.0 ± 5.0 ^b | 4.4 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, $P \leq 0.05$

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2NF, 2-Nitrofluoreno

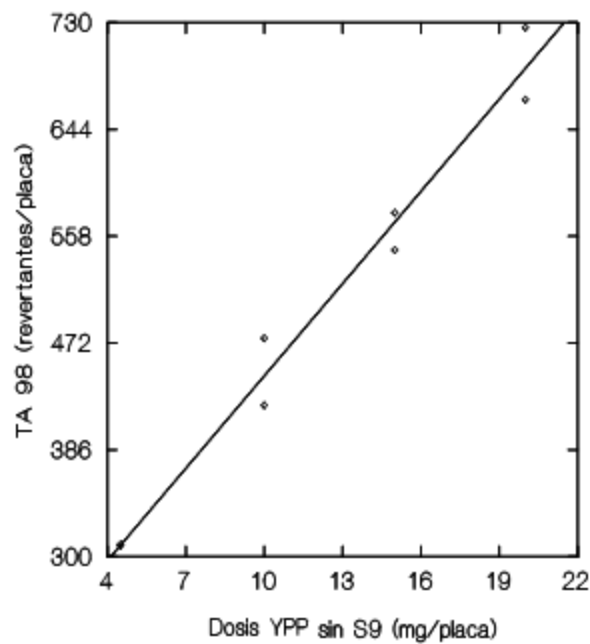


Figura 5.2: Correlación lineal entre Revertantes his⁺/placa de *Salmonella typhimurium* TA98 y la dosis en mg/placa del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP), sin activación metabólica.

La regresión lineal expresada en Revertantes/placa vs. Dosis en mg/placa para la cepa TA98 dio una pendiente b igual a 24.77 (revertantes por placa/dosis) y una ordenada al origen a igual a 197.89 (revertantes por placa), con un coeficiente de determinación r^2 igual a 0.977.

Esta correlación lineal dosis-respuesta confirmó la acción mutagénica de la o las sustancias en el extracto acuoso de la hoja de la planta de yerba mate sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, indicando que el mecanismo de acción es por desplazamiento en el marco de lectura.

5.1.1.2. Ensayo de Salmonella Microsomas en el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, con activación metabólica

Los controles negativos usando buffer fosfato arrojaron un valor de 47.0 ± 6.0 y 198.0 ± 15.0 revertantes espontáneos por placa para TA98 y TA100, respectivamente.

Estos valores se encontraban dentro del rango esperado para la cepa TA98 ($P > 0.05$) (entre 15 y 75 revertantes/placa) (De Serres y Shelby, 1979), (entre 30 y 50 revertantes/ placa) (Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000) y la cepa TA100 ($P > 0.05$) (entre 60 y 220 revertantes/placa) (De Serres y Shelby, 1979), (entre 120 y 200 revertantes/ placa) (Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000).

El control positivo, usando 2-aminofluoreno (2AF, 2.50 μg por placa) como inductor de mutagenicidad para el ensayo con S9 mix, arrojó un valor de 2880.0 ± 45.0 revertantes por placa para la cepa TA98 y 3022.0 ± 11.0 revertantes por placa para la cepa TA100, siendo dicho recuento de revertantes significativamente mayor al control negativo ($P < 0.05$).

Este resultado confirmó las propiedades de reversión y especificidad de la cepa TA98 y TA100 además de la eficacia del S9 mix. Maron y Ames (1983) informaron datos, para una concentración de 2AF de 10 μg por placa en presencia de S9 mix, de 6194 revertantes por placa en la cepa TA98, y de 3026 revertantes por placa para la cepa TA100.

Para la evaluación inicial de la mutagenicidad del extracto acuoso, se realizó el ensayo con dosis que abarquen tres logaritmos de concentración: 0.45, 4.50 y 45.00 mg sembrados en las placas con activación metabólica y se determinó el F.M.

La Tabla 5.4 resume los hallazgos encontrados en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, tratadas con tres logaritmos de concentración de extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en presencia de S9 mix.

En presencia de la cepa TA98, la dosis de 0.45 mg/placa del extracto acuoso de la planta no mostró un aumento en el número de revertantes respecto al control negativo con activación metabólica ($P > 0.05$). Sin embargo, se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en el número de revertantes para las concentraciones 4.50 y 45.00 mg/placa (446.0 ± 1.0 y 953.0 ± 41.0 revertantes por placa, respectivamente) siendo el F.M. superior a 2 (9.5 y 20.3, respectivamente). Las cantidades de revertantes His⁺ por placa para la dosis de 45.00 mg/placa fueron prácticamente el doble que los de la placa sembrada con la dosis de 4.50 mg/placa. Por lo expuesto anteriormente, se decidió determinar la linealidad de revertantes vs. concentración en un rango de 4.50 a 20.00 mg/placa.

En presencia de la cepa TA100, las tres concentraciones del extracto acuoso de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo con activación metabólica ($P > 0.05$).

Tabla 5.4: Efecto mutagénico del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo con preincubación, con activación metabólica, con las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*.

| Agente | | Ensayo de Mutagenicidad con S9 mix - Preincubación | | | |
|---------------------|----------------------|--|-------------------|----------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP | 0.00 mg ^a | 47.0 ± 6.0 | | 198.0 ± 15.0 | |
| YPP | 0.45 mg | 47.0 ± 2.0 | 1.0 | 202.0 ± 4.0 | 1.0 |
| YPP | 4.50 mg | 446.0 ± 1.0 ^b | 9.5 | 208.0 ± 9.0 | 1.1 |
| YPP | 45.00 mg | 953.0 ± 41.0 ^b | 20.3 | 210.0 ± 11.0 | 1.1 |
| 2AF | 2.50 µg | 2880.0 ± 45.0 ^b | 61.3 | 3022.0 ± 11.0 ^b | 15.3 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, $P \leq 0.05$

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2AF, 2-Aminofluoreno

El factor de mutagenicidad (F.M.) arrojó valores cercanos a 1 siendo considerados como no mutagénicos (Ames y col., 1975). Esto estaría indicando que en el extracto acuoso, en las concentraciones ensayadas, no habría sustancias que se modifiquen en presencia de S9 mix

haciéndolas mutagénicas frente a la cepa TA100 con un mecanismo de acción por sustitución de pares de bases, por esta razón no se realizó una curva de dosis-respuesta.

- Ensayo de linealidad dosis-respuesta del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* con la cepa TA98 en presencia de S9 mix

Se evaluó la relación entre la concentración de extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y los revertantes en placa en el rango de 4.50 a 20.00 mg/placa, usando 4 concentraciones: 4.50, 10.00, 15.00 y 20.00 mg/placa, sembrados con activación metabólica.

La Tabla 5.5 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación de la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*, tratada con las cuatro concentraciones de extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en presencia de S9 mix. Se observó que en todas las dosis ensayadas el valor de F.M. era superior a 2 y existía una correlación lineal entre la cantidad de revertantes y la concentración de extracto acuoso por placa (Fig.5.3).

Tabla 5.5: Ensayo de mutagenicidad del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP) en las dosis estudiadas para evaluar linealidad de efecto vs dosis, utilizando el ensayo de preincubación, con activación metabólica, la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

| Ensayo de Mutagenicidad con S9 mix | | | |
|------------------------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|
| Agente | | Cepa TA98 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP | 0.00 mg ^a | 57.0 ± 1.0 | |
| YPP | 4.50 mg | 446.0 ± 1.0 ^b | 7.8 |
| YPP | 10.00 mg | 528.0 ± 11.0 ^b | 9.3 |
| YPP | 15.00 mg | 591.0 ± 12.0 ^b | 10.4 |
| YPP | 20.00 mg | 653.0 ± 41.0 ^b | 11.5 |
| 2AF | 2.50 µg | 2186.0 ± 5.0 ^b | 38.4 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, $P \leq 0.05$

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2AF, 2-Aminofluoreno

La recta de regresión lineal expresada en Revertantes/placa vs Dosis en mg/placa para la cepa TA98 arrojó una pendiente b igual a 13.30 (revertantes por placa/dosis) y una ordenada al

origen a igual a 389.72 (revertantes por placa), con un coeficiente de determinación r^2 igual a 0.959.

Esta correlación lineal dosis-respuesta confirmó la acción mutagénica de la o las sustancias en extracto acuoso de la hoja de la planta de yerba mate sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, en presencia de activación metabólica, indicando un mecanismo de acción por desplazamiento en el marco de lectura.

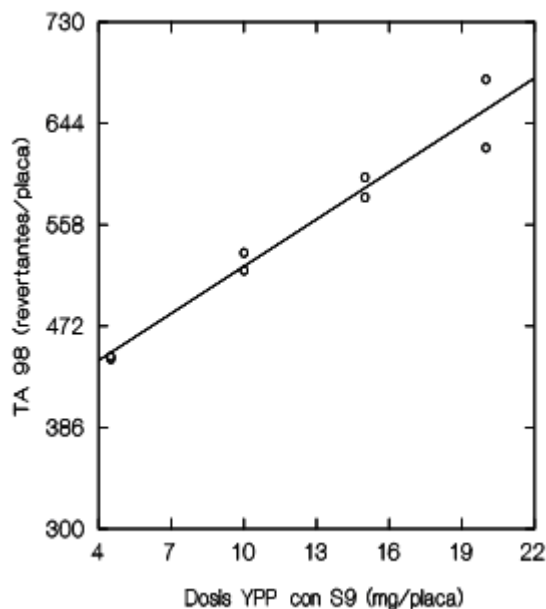


Figura 5.3: Ensayo de mutagénesis del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP), de *Salmonella typhimurium* TA98 con activación metabólica.

5.1.1.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin y con activación metabólica

Las cepas TA98 y TA100 se desarrollaron en 1972, transfiriendo el factor R de resistencia, a las cepas TA1538 (mutaciones de corrimiento de marco de lectura) y 1535 (mutaciones de intercambio de pares de base) respectivamente.

Estas nuevas cepas son extremadamente efectivas y mucho más sensibles en la detección de carcinógenos que anteriormente no eran detectados.

La cepa TA98 es un mutante his D3052, resultado de la delección de un par de bases haciendo imposible la biosíntesis de histidina. Presenta además, una deficiencia en el mecanismo de escisión reparación (uvrB), una mutación rfa que hace a la bacteria más permeable a

macromoléculas, y un plásmido pKM 101, el cual le confiere un aumento de la posibilidad de error durante la duplicación del ADN, además de la resistencia a Ampicilina. La reversión al fenotipo His⁺, lo efectúan aquellos mutágenos que lesionan dos pares de bases adyacentes, situadas a una zona próxima a la mutación que posea una secuencia repetitiva C-G-C-G-C-G, de forma que queda restaurado el marco de lectura original por desplazamiento o desfase genético. Se trata por tanto de una mutación “frameshift” (corrimiento en el marco de lectura). Los compuestos policíclicos aromáticos, como las acridinas, que son capaces de intercalarse en los pares de base apilados del ADN, son mutágenos que causan adiciones o pérdidas de nucleótidos. Estos errores son el resultado de la estabilización de un apareamiento incorrecto en una secuencia repetida del ADN, por intercalación de compuestos planares o planos y su subsecuente adición o deleción a los pares de bases durante la replicación o durante la activación del sistema de reparación. Los mutágenos con estas propiedades son llamados de corrimiento de marco de lectura, a causa de una lectura errada de ARN mensajero sintetizado de la cadena molde alterada del ADN; así es como se diferencian del intercambio de pares de bases. La potencia de un agente intercalante como un mutágeno de corrimiento de marco de lectura se incrementara 10 a 100 veces si además contiene una cadena contigua que puede reaccionar covalentemente con el ADN.

La cepa TA100 de *Salmonella typhimurium* es un mutante his G46, que presenta una sustitución de una base, haciendo imposible la biosíntesis de histidina. También tiene una deficiencia en el mecanismo de escisión reparación (uvrB), una mutación rfa que hace a la bacteria más permeable a macromoléculas, y un plásmido pKM 101, el cual le confiere un aumento de la posibilidad de error durante la duplicación del ADN, además de la resistencia a Ampicilina. La reversión al fenotipo His⁺, lo efectúan aquellos mutágenos que produzcan sustituciones de pares de bases, por lo que podemos pensar que las posibles mutaciones originadas por los compuestos del extracto acuoso ensayado no se llevarían a cabo por este mecanismo.

La investigación realizada indica que en el extracto acuoso de la hoja de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* habría sustancias que inducen la actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella Microsoma sin S9 mix empleando la cepa TA98 que actua mediante el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura y no por el mecanismo de sustitución de pares de bases (los ensayos con TA100 no mostraron ser mutagénicos para el rango de concentración de 0.45 a 45.00 mg/placa).

La observación de mutagenicidad con la cepa TA98 en presencia de S9 mix, sugiere que las enzimas microsomales hepáticas modificarían la o las sustancias contenidas en el extracto de

la planta desactivando la acción mutagénica a altas concentraciones, respecto del resultado encontrado sin activación metabólica (Fig.5.4).

La Figura 5.4 muestra las curvas de dosis-respuesta del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sin y con activación metabólica sobre la cepa de *Salmonella tiphymurium* TA98.

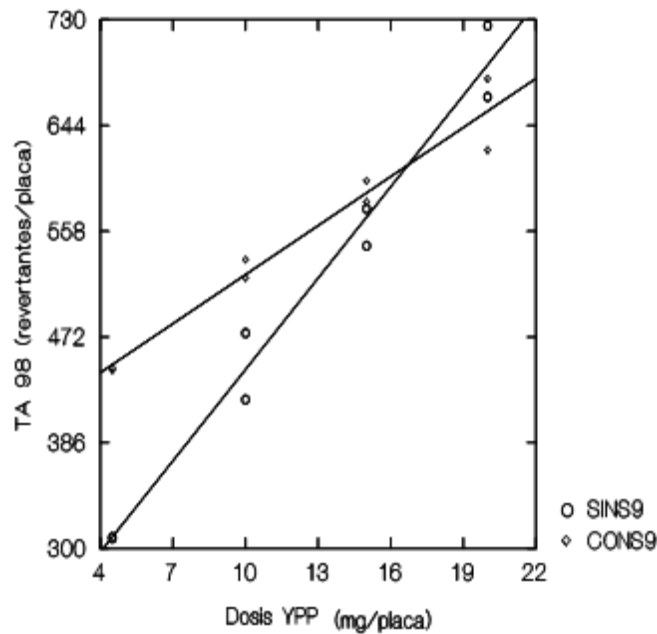


Figura 5.4: Ensayo de mutagénesis del extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP), de *Salmonella tiphymurium* TA98 ♦ con y sin ○ activación metabólica.

Se observó que a bajas dosis el o los compuestos generadores de mutagenicidad, en presencia de S9 mix, sufren alguna modificación que hace que sus efectos sean mayores usando el mecanismo de cambio en el marco de lectura. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración del extracto acuoso, esta modificación generada por la activación metabólica, hace que la cantidad de revertantes por placa disminuya respecto de los resultados encontrados sin S9 mix, si tenemos en cuenta las pendientes (revertantes por placa/dosis) de las curvas de comprobación de linealidad dosis- respuesta en el mismo rango de dosis (24.77 sin activación metabólica y 13.30 con activación metabólica).

La Tabla 5.6 resume los parámetros de las curvas de linealidad de dosis- respuesta realizadas sobre extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP) en el rango de 4.50 a 20.00 mg/placa, con la cepa TA98, sin y con S9 mix.

Tabla 5.6: Parámetros de las curvas de dosis-respuesta llevadas a cabo sobre el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP), con la cepa TA98, sin y con S9mix

| Cepa TA98 | | |
|-----------------------------------|------------|------------|
| YPP Linealidad dosis-respuesta | Sin S9 mix | Con S9 mix |
| a | 197.89 | 389.72 |
| b | 24.77 | 13.30 |
| r ² | 0.977 | 0.96 |
| Rango de concentración (mg/placa) | 4.50-20.00 | 4.50-20.00 |

a, ordenada al origen (revertantes por placa)
b, pendiente (revertantes por placa/dosis)
r², coeficiente de determinación

En los ensayos realizados en presencia de S9 mix se observa una disminución de la inducción de efecto mutagénico mediante el mecanismo de corrimiento en el marco de lectura (cepa TA98). Asimismo, las sustancias responsables de la actividad mutagénica sufrirían alguna modificación por acción de las enzimas microsomales que hace que su efecto disminuya a altas concentraciones de extracto acuoso.

Leitao y Braga (1994) investigaron los efectos genotóxicos y mutagénicos en soluciones acuosas de *Ilex paraguariensis* a distintas concentraciones. Para ello usaron el sobrenadante de la centrifugación a 10000 g durante 10 minutos de infusiones hechas con hojas secas o tostadas (yerba comercial) que hirvieron durante 10 minutos en agua destilada (200 mg.mL⁻¹). Los estudios mutagénicos fueron realizados con cepas de *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 y TA102. Encontraron que la máxima actividad mutagénica sin activación metabólica, se observaba a concentraciones de *Ilex paraguariensis* de 20 a 50 mg/placa para todas las cepas ensayadas. En particular, para la cepa TA98, hallaron mutagenicidad a concentraciones de sobrenadante de 50 mg/placa, obteniendo un F.M. de 5.6. También hallaron mutagenicidad con la cepa TA100 a concentraciones de 20 mg/placa y obtuvieron un

F.M. de 5.5. Además informaron actividad genotóxica en estudios de inducción lisogénica, observando una máxima inducción del fago WP2s (λ) en una cepa lisogénica de *E.coli*, en el rango de concentraciones de 10 a 20 mg/placa. Luego trataron los cultivos con antioxidantes para hallar el mecanismo de genotoxicidad. El uso de catalasa mostró ser efectiva en la prevención del efecto genotóxico, indicando la presencia de peróxido de hidrógeno (la enzima catalasa elimina el peróxido de hidrógeno sin necesidad de un agente reductor). Con la adición de S9 mix, activado o no con tiourea y dipiridilo, se previno la inducción del fago producida por el sobrenadante indicando que las enzimas microsomales tendrían una acción protectora de la genotoxicidad del mate. Frente a este resultado, se sugirió la presencia de especies oxígeno reactivas presentes como el peróxido de hidrógeno en el sobrenadante acuoso.

Fonseca y colaboradores (2000) trabajaron con extractos acuosos liofilizados de hojas secas *Ilex paraguariensis*. Las hojas secas fueron hervidas en agua destilada (200 g.L⁻¹) durante 10 minutos y la infusión filtrada fue liofilizada. Realizaron estudios de inducción lisogénica con cepas bacterianas WP2s(λ) y RJF013 de *Escherichia coli* y estudios mutagénicos con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 y TA102 a través del ensayo de incorporación en placa (Ames clásico). En este caso, no se informó acción mutagénica o tóxica con la cepa TA98 ni con TA97; sí lo hicieron con TA100 (en concentraciones de 10 mg/placa de extracto acuoso) y con TA102 (sensible a mutágenos que causan daño oxidativo y cross-linking de DNA). En presencia de S9 mix observaron la inhibición total del número de revertantes en la cepa TA100 y para TA102, observaron la reducción del efecto mutagénico en un 60%. En cuanto a la genotoxicidad, observaron una máxima inducción del fago WP2s (λ) a concentraciones de 150 mg/placa y toxicidad a concentraciones mayores. La adición de catalasa, tiourea y dipiridilo inhibió este efecto. La adición de S9 mix con y sin cofactores (β -NADP y glucosa 6-fosfato) previno la inducción del profago.

Fonseca y colaboradores encontraron sustancias mutagenicas que producen sustituciones de pares de bases en el extracto acuoso y las cuales eran de tipo oxidativo, teniendo en cuenta el efecto hallado sobre la cepa TA102, que detecta mutágenos oxidantes, alquilantes y formas activas de oxígeno. La genotoxicidad era inhibida por catalasa, indicando que el peróxido de hidrógeno jugaba un rol esencial en la genotoxicidad como parte de la mezcla compleja que podía haber en el extracto. El resultado encontrado con *Escherichia coli* fue similar al hallado por Leitao y Braga (1994).

Leitao y Braga (1994) o Fonseca y colaboradores (2000) no informaron haber hecho ensayos de confirmación de linealidad de dosis–respuesta en el rango de concentración que indicaron como mutagénico.

Las diferencias en los hallazgos presentados por estos autores respecto a los encontrados en el presente trabajo pueden deberse a varias razones:

- Las diferentes condiciones en que se prepararon los extractos acuosos (en el presente ensayo el extracto fue preparado por liofilizado de una infusión hecha con 5 gramos de hojas secas y 70 mL de agua destilada a 80°C, que luego fue filtrada y llevada a 100 mL).
- Las variaciones en los constituyentes de la misma especie de *Ilex* provenientes de distintos países (Brasil, Argentina).
- La diferencia en la metodología utilizada en los ensayos de mutagenicidad (los autores usaron el ensayo de incorporación en placa o Ames clásico y no el de preincubación)
- No se evidencia la presencia de mutagenicidad en el extracto acuoso de la hoja de yerba mate con la cepa TA100 pudiendo deberse a las variaciones importantes en la composición de una misma especie. Por ejemplo, Marx y colaboradores (2003) estudiaron el contenido de teobromina y cafeína por cromatografía gaseosa en hojas de 230 árboles de *Ilex paraguariensis* pertenecientes a cinco plantaciones de Misiones, Argentina. La variación en la concentración de cafeína dentro de una misma clase fue menor (coeficiente de variación del 28.6%) que para la teobromina (coeficiente de variación del 40.4%), sugiriendo que la teobromina es más dependiente de las condiciones ambientales o de la variabilidad genética dentro de una plantación.

Frente al resultado encontrado en el ensayo de Preincubación con la cepa TA98, se sugiere que la actividad mutagénica podría deberse a alguna especie oxígeno reactiva, la cual constituye un mutágeno potente para dicha cepa.

La mayoría de las reacciones de radicales libres comprenden la reducción univalente del oxígeno molecular a agua, dando como resultado especies reactivas de oxígeno (ERO) como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Las ERO son potentes oxidantes de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y por lo tanto, desempeñan un papel importante en muchas patologías.

La Figura 5.5 muestra el mecanismo de generación de radicales orgánicos como los radicales alquilo ($R\cdot$), radicales alcoxilo ($RO\cdot$) y los radicales peroxilo ($ROO\cdot$).

Cuando una ERO ataca a moléculas orgánicas (lípidos insaturados en particular), produce formas reactivas de estas moléculas que pueden a su vez dañar a moléculas vecinas, en una reacción en cadena. Este daño puede contribuir al proceso de envejecimiento o estrés

oxidativo y desarrollo de enfermedades como el cáncer (Figura 5.6). Se han informado hallazgos epidemiológicos que indican un incremento en la incidencia de diversos tipos de cáncer en poblaciones que consumen altos volúmenes de infusión de yerba mate (Pintos y col., 1994; De Stefani y col., 1996, 1998; Goldenberg y col., 2003; Bates y col., 2007).

Las ERO se producen normalmente en las células como producto del metabolismo celular, y es finamente controlada por acción de los antioxidantes. Si un agente estresante induce un aumento en la producción de ERO, este equilibrio puede romperse causando daños en las estructuras celulares. Si no se recupera el equilibrio por mecanismos celulares específicos, se pueden producir disfunciones que pueden desembocar en la muerte celular.

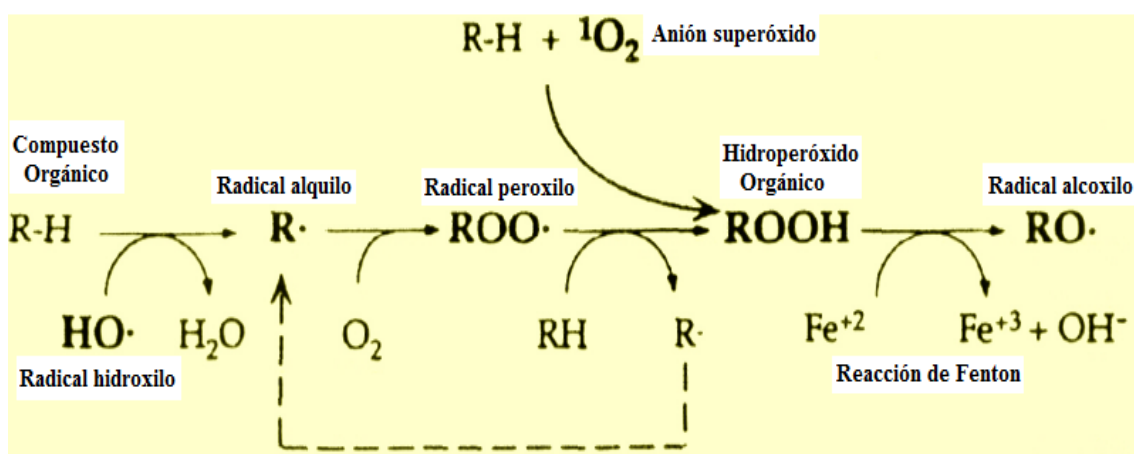


Figura 5.5: Generación de radicales orgánicos (R·, RO·, ROO·).

Bravo y colaboradores (2007) encontraron una importante actividad antioxidante en todas las especies de *Ilex* debida al contenido de derivados de ácido cafeoilquínico. *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* presenta mayor concentración de cafeoil derivados que otras especies de *Ilex* y esto se ha correlacionado con su mayor poder antioxidante (Filip y col 2000; Schinella y col 2000, Bracesco y col 2003, Bixby y col 2005). En estos compuestos, se planteó un mecanismo de acción de secuestro de ERO similar al de la peroxidasa (Anesini y col. 2005).

Las reacciones que cataliza la peroxidasa son:



Siendo:

H₂A: agente reductor

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

ROOH: hidroperóxido orgánico

ROH: compuesto orgánico hidroxilado

Estas reacciones requieren de un agente reductor para que se lleven a cabo (H₂A: ascorbato, glutatión, etc.).

| | |
|---|---|
| Envejecimiento | Pulmón |
| Normal pero acelerado | Cáncer |
| Desórdenes de progenie segmental | Efisema |
| Síndrome de Down | Contaminantes oxidantes (O ₃ , NO ₂) |
| Enfermedades cardiovasculares | Disfasia broncopulmonar |
| Arteriosclerosis | Carcinogenicidad por asbestos |
| Cardiotoxicidad de la adriamicina | Glóbulos rojos |
| Cardiomiopatía alcohólica | Malaria o anemia de Sickle |
| Tracto gastrointestinal | Anemia de Fanconi |
| Enfermedades inmunes e inflamatorias | Anemia hemolítica de premadurez |
| Diabetes | Sobrecarga de hierro |
| Pancreatitis | Hemocromatosis idiopática |
| Daños hepáticos por hidrocarburos halogenados | Sobrecarga de hierro dietético |
| Ojos | Talasemia |
| Cataratas | Daños inmunes-inflamatorios |
| Daño degenerativo de retina | Glomerulonefritis |
| Degeneración de la mácula | Enfermedad autoinmune |
| Nefrotoxicidad por metales pesados | Artritis reumatoide |
| Piel | Estados de Isquemia |
| Radiación solar | Colapso |
| Daños térmicos | Infarto de miocardio |
| Porfiria | Hígado |
| Sistema Nervioso | Patologías inducidas por alcohol |
| Oxígeno hiperbárico | Daño por sobrecarga de hierro inducida por alcohol |
| Enfermedad de Parkinson | Otros desórdenes |
| Lipofuscinosis ceroides neuronal | SIDA |
| Enfermedad de Alzheimer | Daños inducidos por radiación (accidental o radioterapia) |
| Distrofia muscular | Enfermedades inflamatorias de bajo grado |
| Esclerosis múltiple | Transplante de órganos |
| | Uniones reumatoides inflamadas |
| | Arritmias |

Figura 5.6: Listado de enfermedades asociadas al estrés oxidativo

Muchos antioxidantes también han sido identificados como mutágenos y carcinógenos naturales adicionalmente a su desempeño como antimutágenos y anticarcinógenos en otras condiciones (Franke, Ckless, Silveira y col 2004). La vitamina C y los compuestos fenólicos son antioxidantes importantes que se hallan en el jugo de naranja. La capacidad de unión a metales de los compuestos fenólicos inhibe la formación de radicales hidroxilos. Sin embargo, la vitamina C y los compuestos fenólicos pueden, en presencia de Cu (II) y Fe (III), producir la degradación del ADN mediante la generación de ERO. Estos radicales pueden actuar directamente en el ADN o facilitar el ciclo de oxidorreducción, interactuando con el oxígeno molecular para producir ERO genotóxicas. Franke, Ckless, Silveira y col (2004) encontraron relación entre la concentración de compuestos fenólicos y la mutagenicidad en cepas de TA98 sin y con activación metabólica estimando su acción a través de la producción de ERO.

Stich y colaboradores (1981a) estudiaron el ácido clorogénico en tres tipos de ensayos: mutaciones reversas en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación, conversión de genes con la cepa D7 de *Saccharomyces cerevisiae*, y aberraciones cromosómicas en células de ovario de hámster chino (CHO). El ácido clorogénico mostró ser directamente convertogénico y clastogénico, pero no se encontró capacidad mutagénica en el bioensayo de Salmonella por sí solo. Sin embargo, el metal de transición Mn^{+2} aumentó la actividad mutagénica, clastogénica y convertogénica del ácido clorogénico. En presencia de Mn^{+2} (10^{-4} M), el ácido clorogénico aumentó la frecuencia de revertantes His^+ en las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100. El ácido cafeico y en menor grado, el ácido quínico, que son derivados del ácido clorogénico, también mostraron actividad genotóxica. Estos resultados muestran la importancia del uso de algunos ensayos en combinación con metales de transición para la búsqueda de genotoxicidad.

Stich y colaboradores (1981b) también estudiaron la acción de los metales de transición sobre la genotoxicidad de fenoles simples, ácidos fenólicos y cinámicos a través del ensayo de actividad clastogénica en células de hámster chino (CHO) con y sin adición de S9 mix, Cu^{+2} (10^{-4} M) y Mn^{+2} (10^{-4} M). Ellos hallaron que los fenoles dihidroxilados y trihidroxilados inducían la ruptura de cromátidas y los intercambios. El agregado de S9 mix o los metales de transición aumentaba la actividad de daño cromosómico en algunos compuestos fenólicos y la suprimía en otros.

Duarte y colaboradores (1999), estudiaron la genotoxicidad del café instantáneo a través de ensayos de mutagenicidad con y sin preincubación, utilizando varias cepas de *Salmonella typhimurium*, en presencia y ausencia de activación metabólica (S9 mix). La Tabla 5.7 muestra los resultados de mutagenicidad observados a través de los valores de las pendientes

de las curvas de dosis- respuesta determinadas por cuadrados mínimos en las cepas TA98, TA100, TA102, TA104 e YG1024. Los resultados muestran que la preincubación fue más eficiente que el ensayo de incorporación en placa y que la adición de S9 mix llevó a una reducción significativa (cepas TA98 y TA100) o a una ligera reducción (cepa TA102) o a una eliminación completa (cepas TA104 y YG1024) de los efectos genotóxicos detectados. Para dilucidar qué componentes del S9 mix podrían estar involucrados en la desactivación genotóxica, estudiaron los efectos de dos enzimas citosólicas: catalasa y superóxido dismutasa en la genotoxicidad del café instantáneo sobre la cepa TA100, encontrando que la catalasa tenía una clara acción detoxificante. La comparación entre el efecto de S9 mix y la solución de catalasa con la misma actividad catalasa, demostró que esta enzima podría ser el factor responsable de la disminución de la genotoxicidad en el café instantáneo observada en presencia de S9 mix. Los distintos resultados obtenidos en presencia de activación metabólica y las respuestas positivas de las cepas con distintas sensibilidades a los compuestos sugirieron que las moléculas presentes en el café instantáneo pueden lesionar el ADN por mecanismos diferentes y por lo tanto en el café instantáneo habría sustancias genotóxicas distintas que se encuentran formando parte de una mezcla compleja. Duarte y colaboradores determinaron que los responsables de esta acción podrían ser los compuestos de descomposición del ácido clorogénico que se forman durante el tostado de los granos de café como el ácido cafeico, el catecol, el pirogalol, o la hidroquinona (Millin y Cruickshank, 1988). Es sabido que las moléculas fenólicas, especialmente a pH cercanos a la neutralidad, pueden desprotonarse y reaccionar con el oxígeno produciendo aniones superóxido y finalmente peróxido de hidrógeno (Rueff y col., 1989).

Tabla 5.7: Actividad mutagénica específica (revertantes/mg) de café instantáneo sobre las cepas TA98, TA100, TA102, TA104 e YG1024.^a

| Cepa | Ensayo de Incorporación en placa | | Ensayo de Preincubación | |
|--------|----------------------------------|-------------|-------------------------|--------------|
| | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix |
| TA98 | 1.92 ± 0.91 | negativo | 9.15 ± 0.90 | 2.43 ± 0.24 |
| TA100 | 5.02 ± 0.70 | negativo | 28.11 ± 2.85 | 6.66 ± 0.94 |
| TA102 | 15.05 ± 0.61 | 9.83 ± 0.57 | 30.38 ± 2.87 | 26.70 ± 2.87 |
| TA104 | negativo | negativo | 34.10 ± 2.28 | negativo |
| YG1024 | negativo | negativo | 14.47 ± 3.77 | negativo |

Negativo: ausencia de curva de dosis-respuesta y factor de mutagenicidad menor a 2.

^a Adaptado de Duarte y colaboradores (1999)

Wrobel y colaboradores (2000) determinaron metales en infusiones de *Ilex paraguariensis* utilizando la técnica de espectrometría de absorción atómica electrotrémica luego de una digestión ácida con ácido perclórico y nítrico. Ellos informaron concentraciones de manganeso de $2223 \pm 110 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ encontrando un 48.1% en el lixiviado de la infusión, catalogando a la infusión como una fuente dietaria importante de este micronutriente. El valor de ingesta diaria recomendada de Mn es de 310-420 mg diarios de Mn, si se consume por día 100 g de yerba mate, obtendríamos 222 mg de Mn^{+2} y para el lixiviado de la infusión 107 mg de Mn^{+2} , valor que constituye un 35% de la ingesta diaria recomendada.

Filip y colaboradores (2001) compararon las concentraciones de cafeoil derivados en *Ilex paraguariensis* con otras especies de *Ilex*.

La Tabla 5.8 evidencia la mayor concentración de cafeoil derivados (Fig. 5.7) en *Ilex paraguariensis* respecto de otras especies (*I. dumosa*, *I. brevicuspis* e *I. argentina*) cuyas concentraciones son mucho menores y varían principalmente en el ácido cafeoilquinico.

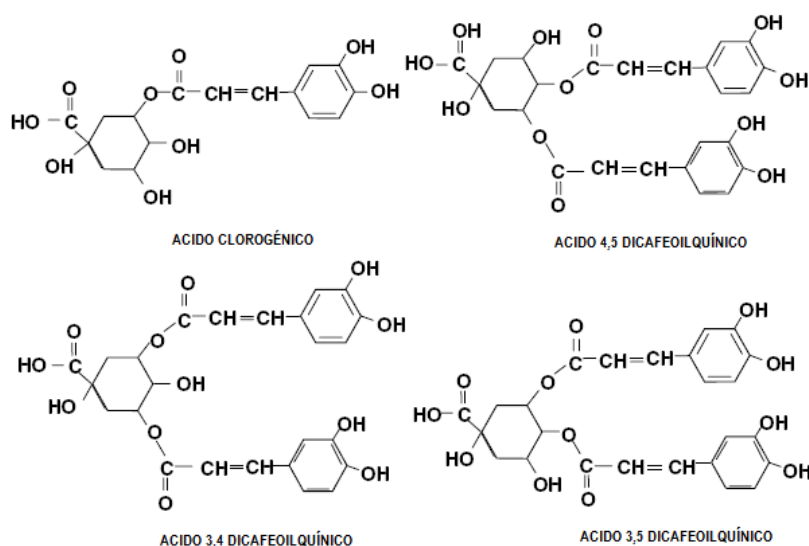


Figura 5.7: Estructura de compuestos cafeoil derivados: ácido clorogénico, ácido 4,5 dicafeoilquinico, ácido 3,4 dicafeoilquinico y ácido 3,5 dicafeoilquinico.

Tabla 5.8: Concentración de cafeoil derivados en varias especies de *Ilex* (% en peso seco).^a

| Especies | Acido clorogénico | Acido cafeico | 3,4-DCQ | 3,5-DCQ | 4,5-DCQ |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>I. paraguariensis</i> | 2.800 ± 0.300 | 0.023 ± 0.004 | 0.855 ± 0.064 | 3.040 ± 0.180 | 2.890 ± 0.060 |
| <i>I. brevicuspis</i> | 0.915 ± 0.064 | 0.130 ± 0.010 | 0.130 ± 0.010 | 0.360 ± 0.060 | 0.490 ± 0.040 |
| <i>I. argentina</i> | 0.090 ± 0.015 | 0.047 ± 0.010 | 0.047 ± 0.010 | 0.545 ± 0.049 | 0.043 ± 0.003 |
| <i>I. dumosa</i> | 0.042 ± 0.009 | 0.017 ± 0.001 | 0.017 ± 0.001 | 0.147 ± 0.060 | 0.070 ± 0.014 |

^a, Adaptado de Filip y col. (2001)

3,4-DCQ, ácido 3,4 dicafeoilquinico; 3,5-DCQ, ácido 3,5 dicafeoilquinico; 4,5-DCQ, ácido 4,5 dicafeoilquinico

Teniendo en cuenta los resultados informados por Franke, Ckless, Silveira y col (2004), por Stich y colaboradores (1981) y por Duarte y colaboradores (1999), se podría atribuir la mutagenicidad sin y con activación metabólica sobre la cepa TA98, a la alta concentración de cafeoil derivados presentes en el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* a través de la producción de ERO en las condiciones de preparación de la infusión (mate). El ácido clorogénico, es uno de los compuestos más importantes dentro del grupo cafeoilquinico debido a su concentración predominante en los extractos y podría ser el responsable de los efectos estudiados. La mayor solubilidad de este tipo de compuestos se obtiene en agua a 80°C (Lanzani y col. 1979) siendo en este caso su pH de 6. Si bien no se ha informado mutagenicidad del ácido clorogénico por sí solo, sí es mutagenico en presencia de Mn^{+2} (Stich y col., 1981), que también se encuentra en altas concentraciones en el extracto acuoso de yerba mate (Wrobel y col., 2000). Este metal de transición podría actuar como catalizador de la oxidación del ácido clorogénico, conduciendo a la generación de radicales libres y peróxido de hidrógeno.

Por otro lado, la infusión de yerba mate presenta, otro tipo de polifenoles, los flavonoides quercetina, rutina y el kaempferol (Figura 5.8).

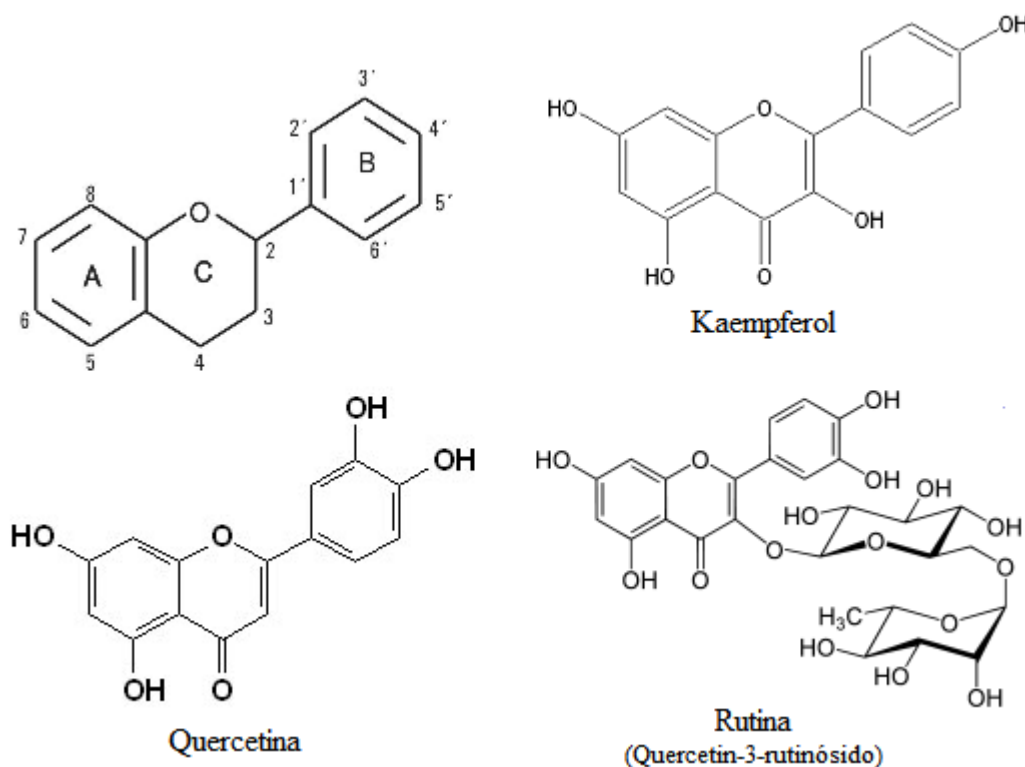


Figura 5.8: Estructura química de los flavonoides: estructura básica y su sistema de numeración, estructura de la quercetina, la rutina y el kaempferol

Estos se encuentran en menor concentración que los cafeoil derivados en las infusiones de yerba mate (Tabla 5.9). Deladino (2009) encontró rutina en los liofilizados de extractos acuosos de yerba mate en concentraciones de $9.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de yerba mate.

Tabla 5.9: Contenido (% en masa seca) de flavonoides en extractos acuosos de especies de *Ilex*^a.

| Plantas | Rutina ^b | Quercetina ^b | Kaempferol ^b |
|--------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>I. paraguariensis</i> | 0.0600 ± 0.0054 | 0.0031 ± 0.0009 | 0.0120 ± 0.0003 |
| <i>I. brevicuspis</i> | 0.0022 ± 0.0003 | 0.0006 ± 0.0002 | 0.0003 ± 0.0001 |
| <i>I. theezans</i> | 0.0015 ± 0.0004 | 0.0023 ± 0.0005 | 0.0015 ± 0.0003 |
| <i>I. dumosa</i> | 0.0055 ± 0.0005 | 0.0004 ± 0.0002 | 0.0013 ± 0.0002 |
| <i>I. microdonta</i> | 0.0089 ± 0.0005 | 0.0016 ± 0.0005 | 0.0008 ± 0.0003 |
| <i>I. pseudobuxus</i> | 0.0300 ± 0.0015 | 0.0031 ± 0.0004 | 0.0011 ± 0.0004 |
| <i>I. argentina</i> | 0.0016 ± 0.0005 | 0.0020 ± 0.0006 | 0.0007 ± 0.0003 |

^a, Adaptado de Filip y colaboradores (2001)

^b, Valores de media ± S.D.

Se han aportado evidencias sobre el doble papel que desempeñan los flavonoides como antioxidantes/prooxidantes; así como la contribución de la estructura a tales actividades (Trueba, 2003). Un número creciente de artículos que abordan aspectos clínicos y nutricionales ha puesto de manifiesto la importancia que está requiriendo el empleo de antioxidantes en la dieta, teniendo en cuenta que a menudo las combinaciones vitamínicas no ejercen los efectos esperados o por el contrario, éstos resultan dañinos. En este contexto los compuestos polifenólicos, y dentro de estos los flavonoides, ocupan un lugar destacado. Existe el consenso que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (Bhom y col. 1998; Bravo, 1998; Russo y col., 2000). Otros autores se refieren además a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO) evitando la generación de ERO *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos (Groot y Rauen, 1998; Ferrandiz y Alcaraz, 1991). Por otra parte, se ha podido conocer que inhiben también enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (FLA2) (Lindhal y Tagesson, 1997) al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) (Sudheesh y

col. 1999). De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres y en la formación de la ERO en sí misma (Van Acquire y col., 1996).

Casi todos los resultados coinciden en que los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4, como sucede con la quercetina (Ratty y Das, 1988; Saija y col., 1995; Yoshino y Murakami, 1998).

Sin embargo, algunos estudios muestran mutagenicidad y genotoxicidad de los flavonoides, tanto en sistemas experimentales bacterianos como de mamíferos (Tabla 5.10). Debido a sus características estructurales estos metabolitos poseen bajos potenciales de reducción que les permiten reducir el Fe^{3+} y el Cu^{2+} para sufrir una autooxidación o incluso involucrarse en un proceso de ciclaje redox, actuando de esta manera como agentes prooxidantes, lo que explica estos efectos mutagénicos y genotóxicos.

Algunos de los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen sus acciones prooxidantes incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I) (Rahman y col., 1989, 1992; Brown, 1998), la generación de ERO (Sahu y Gray, 1993; 1997) así como la afectación de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear: glutatión y glutatión-S transferasa (Sahu y Gray, 1996).

Tabla 5.10: Estudios de mutagenicidad y genotoxicidad en flavonoides

| Daño | Referencias |
|--|-----------------------|
| Inducción de mutaciones recombinantes | Susuki y col. (1991) |
| Inducción de aberraciones cromosómicas | Carver y col. (1983) |
| Intercambio de cromátidas hermanas | Popp y col. (1991) |
| Generación de micronúcleos en linfocitos humanos | Caria y col. (1995) |
| Formación de peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y radicales superóxido | Hodnick y col. (1986) |
| Excisión de cadenas en el ADN | Rahman y col. (1989) |
| Actividad prooxidante resultando en degradación del ADN | Sahu y Gray (1993) |
| Actividad prooxidante resultando en peroxidación lipídica | Sahu y Gray (1997) |
| Actividad prooxidante e inhibición de la glutatión-S transferasa. | Sahu y Gray (1996) |

Aunque con menos efectividad que los que contienen un núcleo pirogalólico, los flavonoides con un grupo catecólico generan H_2O_2 en solución amortiguadora acetato pH 7.4, al donar un átomo de hidrógeno de su estructura al oxígeno por conducto de un O_2^- . La capacidad de los

compuestos evaluados se comportó en el orden siguiente: miricetina, baicaleína, quercetina, epicatequina, catequina y fisetina (Miura y col., 1998). La quercetina y la miricetina, incrementaron la generación de radicales oxhidrilo ($\text{OH}\cdot$) a través de la reacción de Fenton, en un ensayo basado en la determinación de ácido metanesulfónico producido por la reacción entre el dimetilsulfóxido y este radical (Hanasaki, 1994).

Los flavonoides quercetina, rutina y miricetina, causaron ruptura del ADN de timo de carnero en presencia de Cu y oxígeno molecular. La quercetina, junto con la miricetina, dieron lugar a la 8-OH-2'-desoxiguanosina, lesión oxidativa del ADN de mayor potencial mutagénico (Rahman, 1992; Yoshino y col., 1999). Un estudio más detallado, basado en un análisis de los fragmentos obtenidos del gen supresor de tumores p53, puso de manifiesto que el daño oxidativo al ADN inducido por la quercetina en presencia de Cu, transcurre a través del ataque de los residuos de timina y citosina, y que el kaempferol también induce daños al ADN en presencia de este metal. Teniendo en cuenta que estos daños fueron revertidos por la batocupreína, agente quelatante de Cu, no así por los secuestradores de $\text{OH}\cdot$ libres, ha sido sugerido que el daño al ADN es más bien inducido por el complejo oxígeno-Cu-ADN, más que por $\text{OH}\cdot$ (Rahman y col., 1992).

Al parecer, la sustitución orto 3'-4'-dihidroxi en el anillo B resulta esencial para la formación de quelatos Cu y el oxhidrilo de la posición 3 aumenta la oxidación de los flavonoides como la quercetina y el kaempferol en presencia de este, cosa que no ocurre con otros como la rutina, que carecen de este grupo. Por último, la conjugación entre los anillos A y B resulta importante también para la acción prooxidante de un flavonoide iniciada por Cu, mientras que la O-metilación de las sustituciones hidroxílicas inactiva dicha acción (Brown, 1998).

Por todo lo expuesto, se sugiere que los flavonoides como la quercetina, la rutina y el kaempferol contribuirían al efecto mutagénico observado sobre la cepa TA98 en ausencia y presencia de S9 mix.

Otro compuesto que se encuentra en alta concentración en los extractos acuosos de *Ilex paraguariensis* es la cafeína (1,3,7 trimetil xantina) (Athayde y col., 2000). Se han encontrado valores de 78 mg en 150 mL de la infusión (Mazzafera, 1997). Reginatto y colaboradores (1999) analizaron el contenido de metilxantinas en hojas de *Ilex paraguariensis* y otras especies de *Ilex* informadas como adulterantes de la infusión (mate) utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Tabla 5.11).

Para la obtención de los extractos, usaron 15 gramos de hojas secas y los hirvieron durante 10 minutos en 150 mL de una solución de ácido sulfúrico 20% (v/v). Luego filtraron la solución tomando el filtrado, que neutralizaron con solución de hidróxido de amonio al 25% (v/v).

Luego realizaron extracciones sucesivas con la mezcla cloroformo : isopropanol (3:1 v/v) y la fase orgánica fue concentrada obteniendo el extracto de metilxantinas (recuperación de extracto, Tabla 5.11). Este residuo se utilizó para el análisis por HPLC.

Ilex paraguariensis var. *paraguariensis* presentó un contenido de cafeína de 0.65% y un 0.12% de teobromina. *Ilex paraguariensis* var. *vestita* presentó un porcentaje menor de cafeína (0.003%) pero un porcentaje mayor de teobromina (estimada en 0.22%). No se detectaron metilxantinas en *Ilex brevicuspis*, *Ilex dumosa* e *Ilex microdonta*. También realizaron estudios en cromatografía en capa fina (TLC), la teofilina no fue detectada en ninguna de las plantas y sólo se halló cafeína y teobromina en las variedades de *Ilex paraguariensis*.

Estos resultados confirmaron la alta acumulación de cafeína y teobromina presente en yerba mate.

Tabla 5.11: Porcentajes de recuperación de extracto orgánico conteniendo las metilxantinas y contenido de cafeína y teobromina en porcentaje peso en peso (P/P) determinado por HPLC en hojas de especies de *Ilex*^a

| Especies de <i>Ilex</i> | Recuperación de | | |
|--|---------------------------|--------------------|-------------------|
| | extracto de metilxantinas | Cafeína (P/P) | Teobromina (P/P) |
| <i>I. brevicuspis</i> | 59.7 mg (0.40%) | no detectable | no detectable |
| <i>I. dumosa</i> | 56.9 mg (0.39%) | no detectable | no detectable |
| <i>I. microdonta</i> | 85.5 mg (0.57%) | no detectable | no detectable |
| <i>I. paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i> | 257.8 mg (1.72%) | 0.646% CV 0.38% | 0.12% CV 0.27% |
| <i>I. paraguariensis</i> var. <i>vestita</i> | 48.0 mg (0.32%) | 0.003% CV 0.77% | b |

^a, Adaptado de Reginatto y col. 1999

^b, Teobromina diluida con otra sustancia, la resolución de ambos picos no fue adecuada para la determinación cuantitativa

Basándose en las investigaciones publicadas (Tabla 5.12), las infusiones de yerba mate contienen alrededor del 1% de cafeína (en un rango que varía de 0.5 a 2 %) cuando se preparan con agua tibia o caliente.

Tabla 5.12: Porcentajes de cafeína y teobromina extraídos de yerba mate.

| Autores | Año | Método de extracción | % Cafeína | % Teobromina |
|---------------------------------|------|--|-------------|--------------|
| Filip, Lopez y col. | 1998 | Agua hervida 20 minutos | 1.90 | 0.48 |
| Pomilio, Trajtemberg y col. | 2002 | Agua tibia (30°C) y caliente (70°C), 5 minutos | 0.30 - 1.80 | 0.08 - 0.66 |
| Saldana, Zetzl y col. | 1999 | Dióxido de carbono líquido y etanol | 0.30 - 0.60 | ---- |
| Esmelindro, Girardi Jdos y col. | 2004 | Dióxido de carbono | 0.10 - 0.20 | 0.07 - 0.15 |

Pons y Müller (1990) encontraron que la cafeína inducía cinco diferentes mutaciones por corrimiento en el marco de lectura en *Escherichia coli* K12. Sólo aquellas mutaciones que fueron sensibles a la inducción de reversión por 9-amino acridina fueron también sensibles a cafeína concluyendo que la misma debía su efecto mutagénico a un corrimiento de los pares de bases GC, dando lugar a corrimiento en el marco de lectura de -1. Esto se condice con el aumento de la mutagenicidad en la cepa TA98 donde el mutágeno utiliza el mismo mecanismo de acción.

La cafeína a mostrado ser mutagénica en bacterias, hongos y, en altas concentraciones en cultivos de células de mamífero (Aeschbacher, 1986). Sin embargo, los efectos mutagénicos parecen desaparecer cuando las bacterias o las células de mamífero son cultivadas en presencia de extractos de hígado, los cuales contienen enzimas detoxificantes.

La cafeína puede interactuar con muchos otros mutégenos y sus efectos se sinergizan con rayos X, luz ultravioleta y algunos agentes químicos. La cafeína parece potenciar la inducción de aberraciones cromosómicas y también transformar el daño subletal de agentes mutagénicos en daño letal. Sin embargo, hay trabajos que indican que la cafeína también puede inhibir efectos mutagénicos de numerosos químicos. Estos efectos antimutagénicos dependen del tiempo de administración del café en comparación con el tiempo de actuación del agente mutagénico. En ese caso, la cafeína parece restaurar el ciclo normal de la mitosis y la fosforilación en células irradiadas (Nehlig y Debry, 1994).

Por lo expuesto, se estima que la cafeína también podría contribuir a la mutagenicidad en el extracto acuoso de yerba mate.

- Conclusión

El extracto acuoso de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* presenta actividad mutagénica a través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, debido a su acción sobre la cepa TA98. Este resultado podría atribuirse a la presencia de altas concentraciones de cafeoil derivados, como el ácido clorogénico, que es el compuesto más importante dentro del grupo y es predominante en el extracto acuoso. La presencia de altas

concentraciones de Mn^{+2} presente en la infusión (mate), haría que el ácido clorogénico produzca la degradación del ADN a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Stich y col., 1981a,b; Duarte y col., 1999; Franke, Ckless, Silveira y col., 2004).

Podrían contribuir a este efecto mutagénico los flavonoides presentes en yerba mate, como son la quercetina, la rutina y el kaempferol que actuarían como agentes prooxidantes (Trueba 2003).

También se propone la contribución de la cafeína, xantina mayoritaria las hojas de yerba mate, que se encuentra también presente en las infusiones de la planta en altas concentraciones.

La metabolización hepática disminuye la mutagénesis inducida. Por lo tanto el sistema P450 de los mamíferos presenta capacidad de reducir el efecto mutagénico observado en los ensayos sin actividad metabólica. La enzima catalasa podría ser el factor responsable de la disminución de la genotoxicidad (Duarte y col. 1999).

No se observó mutagenicidad a través del mecanismo de sustitución de pares de bases en el marco de lectura (ausencia de mutagenicidad con la cepa TA100) como indican otros autores (Leitao y Braga, 1994; Fonseca y col., 2001). Esto puede deberse a las variaciones de concentración de las sustancias dentro de una misma especie y más aún si son cultivadas en distintos países y a las diferentes condiciones de preparación de los extractos.

Estos resultados abren nuevos interrogantes y dejan abiertas futuras investigaciones tendientes a estudiar la composición química del extracto acuoso mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y mediante columnas preparativas separar sus constituyentes. Estas fracciones deberán ser estudiadas en su acción mutagénica y así avanzar en el conocimiento de los posibles causantes del efecto mutagénico observado.

5.1.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*

5.1.2.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin activación metabólica

La obtención de los extractos orgánicos se realizó según se describe en la sección 2.1.2. a partir de 120 gramos de hojas secas de la planta la que se sometieron a dos extracciones sucesivas

en cloroformo y luego en acetona. Los extractos se secaron en estufa de convección forzada a 50°C durante 8 hs.

El ensayo del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, se llevó a cabo junto con el extracto acuoso de la planta en ausencia de S9 mix, usando así los mismos controles negativos y positivos. Además se realizó un control de disolvente utilizado para preparar las concentraciones de los extractos orgánicos, dimetilsulfóxido (DMSO), el cual arrojó un valor de revertantes por placa (46.0 ± 1.0) igual al encontrado para el control negativo de buffer fosfato (46.0 ± 1.0 revertantes por placa, $P > 0.05$).

Como investigación preliminar de mutagenicidad en el extracto clorofórmico, se ensayó un amplio rango de dosis del mismo, empleándose tres concentraciones que variaron entre: 0.45, 4.50 y 45.00 mg /placa, sin activación metabólica, a efectos de evaluar la linealidad de dosis-respuesta y determinar el valor de F.M.

La Tabla 5.13 resume los hallazgos encontrados en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación de la cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, tratadas con tres niveles de concentración de extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en ausencia de S9 mix.

En presencia de la cepa TA98, la concentración del extracto clorofórmico de la planta de 0.45 mg/placa no mostró un aumento en el número de revertantes respecto al control negativo sin activación metabólica ($P > 0.05$). Sin embargo, se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en el número de revertantes para las concentraciones 4.50 y 45.00 mg/placa (1458 ± 45.0 y 2180.0 ± 42.0 revertantes por placa, respectivamente) siendo el F.M. superior a 2 (31.7 y 47.4, respectivamente). Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió determinar la linealidad de revertantes por placa vs. concentración de extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* empleando un menor rango de dosis: 1.13, 2.25 y 4.50 mg/placa (valores menores o iguales a 4.50 mg/placa pero mayores a 0.45 mg/placa).

En presencia de la cepa TA100 se observó que en las concentraciones de 0.45 y 4.50 mg/placa, no aumentaron significativamente la frecuencia de revertantes His⁺ respecto del control negativo (191.0 ± 8.0 revertantes por placa, $P > 0.05$) y el valor del F.M. fue menor a 2. Sin embargo, si evaluamos estos valores (1.6 para 0.45 mg/placa y 1.7 para 4.50 mg/placa) utilizando la llamada “regla de las dos veces” (Ames y col. 1975), los valores hallados están entre 1.5 y 2, por lo que se estiman como “ligeramente mutagénicos”.

“La regla de las dos veces” puede presentar desventajas, ya que, para las cepas con una mutación espontánea alta, como TA100, el incremento de dos veces podría ser un

requerimiento muy restrictivo para determinar el efecto positivo. Por esta razón algunos autores no consideran válida esta regla para esta cepa y en ese caso aplican el criterio de 100 revertantes en exceso respecto del control negativo (Moriya y col., 1983).

Para la concentración de 45,00 mg/placa de extracto clorofórmico, el valor del F.M. es mayor a 2 (2.8), siendo mutagénico. Ante lo expuesto, se decidió determinar la linealidad de dosis – respuesta utilizando concentraciones entre los valores de 15.0 y 45.00 mg/placa.

Tabla 5.13: Efecto mutagénico del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo preincubación, sin activación metabólica, con la cepas TA 98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*.

| Agente | Concentración/placa | Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix - Preincubación | | | |
|--------------------------|----------------------|--|-------------------|---------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP _{cl} (BUF) | 0.00 mg ^a | 46.0 ± 1.0 | | 191.0 ± 8.0 | |
| YPP _{cl} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 46.0 ± 1.0 | 1.0 | 185.0 ± 8.0 | 1.0 |
| YPP _{cl} | 0.45 mg | 46.0 ± 1.0 | 1.0 | 287.0 ± 33.0 | 1.6 |
| YPP _{cl} | 4.50 mg | 1458.0 ± 45.0 ^b | 31.7 | 324.0 ± 16.0 | 1.7 |
| YPP _{cl} | 45.00 mg | 2180.5 ± 42.0 ^b | 47.4 | 520.0 ± 25.0 | 2.8 |
| 2NF | 2.50 µg | 226.0 ± 16.0 ^b | 4.9 | | |
| SAZ | 1.50 µg | | | 486.0 ± 30.0 ^b | 2.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2NF, 2-Nitrofluoreno; SAZ, Azida de sodio; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

- Ensayo de linealidad dosis-respuesta del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* con la cepa TA98 en ausencia de S9 mix

Se evaluó la relación entre la concentración de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y los revertantes en placa en el rango de 1.13 a 4.50 mg/placa, usando 3 concentraciones: 1.13, 2.25 y 4.50 mg/placa, sembrados sin activación metabólica.

La Tabla 5.14 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, tratada con las tres concentraciones de extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en ausencia de S9 mix. Se observó que en todas las dosis ensayadas el F.M. era superior a 2 y existía una correlación lineal entre la cantidad de revertantes y la concentración de extracto clorofórmico por placa.

Tabla 5.14: Efecto mutagénico del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}) en las dosis estudiadas para evaluar linealidad de efecto vs dosis, utilizando el ensayo de preincubación, sin activación metabólica, con la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

| Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix | | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|
| Agente | Concentración/placa | Cepa TA98 | |
| | | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP _{cl(BUF)} | 0.00 mg ^a | 56.0 ± 1.0 | |
| YPP _{cl(DMSO)} | 0.00 mg ^a | 57.0 ± 1.0 | 1.0 |
| YPP _{cl} | 1.13 mg | 216.0 ± 6.0 ^b | 3.8 |
| YPP _{cl} | 2.25 mg | 584.0 ± 8.0 ^b | 10.2 |
| YPP _{cl} | 4.50 mg | 1548.0 ± 45.0 ^b | 27.2 |
| 2NF | 2.50 µg | 253.0 ± 13.0 ^b | 4.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2NF, 2-Nitrofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

La Figura 5.9 muestra la recta de regresión lineal expresada en Revertantes/placa vs. Dosis en mg/placa para la cepa TA98 arrojó una pendiente b igual a 399.62 (revertantes por placa/dosis) y una ordenada al origen a igual a -266.50 (revertantes por placa), con un coeficiente de determinación r² igual a 0.995.

Esta correlación lineal dosis-respuesta confirmó la acción mutagénica de la o las sustancias contenidas en el extracto clorofórmico de la hoja de la planta de yerba mate sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, indicando un mecanismo de acción es por desplazamiento en el marco de lectura.

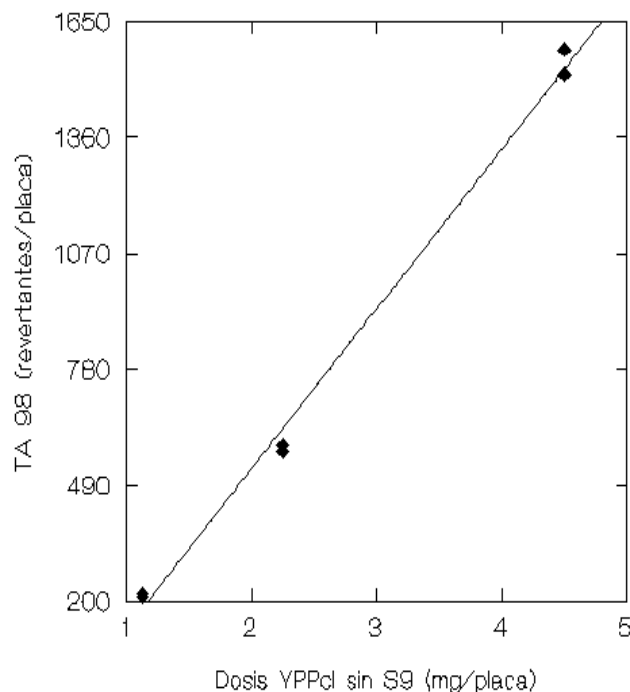


Figura 5.9: Correlación lineal entre cantidad de Revertantes/placa de *Salmonella typhimurium* TA98 y la dosis en mg/placa del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}), sin activación metabólica.

- Ensayo de linealidad dosis-respuesta del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* con la cepa TA100 en ausencia de S9 mix

Se evaluó la relación entre la concentración de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y los revertantes en placa en el rango de 15.00 a 45.00 mg/placa, usando 3 concentraciones: 15.00, 30.00 y 45.00 mg/placa, sembrados sin activación metabólica.

La Tabla 5.15 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de *Salmonella* microsoma con preincubación de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA100, tratada con las tres concentraciones de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en ausencia de S9 mix.

Se observó que en la dosis de 15.00 mg/placa, el valor de revertantes por placa determinó un F.M. de 1.8, siendo, según la “regla de las dos veces” (Ames y col. 1975), ligeramente mutagénico. Sin embargo, al aumentar la concentración a 30.00 mg/placa y 45.00 mg/ placa los valores de F.M. fueron superiores a 2 (2.3 y 2.9 respectivamente) y la curva de dosis - respuesta indicó una correlación lineal entre las variables (Fig. 5.8).

Tabla 5.14: Efecto mutagénico del extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}) en las dosis estudiadas para evaluar linealidad de efecto vs dosis, utilizando el ensayo de preincubación, sin activación metabólica, con la cepa de *Salmonella typhimurium* TA100.

| Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix | | | |
|------------------------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|
| Agente | | Cepa TA100 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP _{cl} (BUF) | 0.00 mg ^a | 190.0 ± 9.0 | |
| YPP _{cl} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 180.0 ± 2.0 | 1.0 |
| YPP _{cl} | 15.00 mg | 347.0 ± 15.0 ^d | 1.8 |
| YPP _{cl} | 30.00 mg | 437.0 ± 22.0 ^b | 2.3 |
| YPP _{cl} | 45.00 mg | 552.0 ± 17.0 ^b | 2.9 |
| SAZ | 1.50 µg | 480.0 ± 28.0 ^b | 2.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

^d, Ligeramente mutagénico (entre 1.5 y 2)

SAZ, Azida de sodio; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

No se tomaron para este ensayo concentraciones mayores a 45.00 mg/placa debido a que el extracto se hacía demasiado viscoso para poder trabajar.

La Figura 5.10 ilustra la recta de regresión lineal expresada en Revertantes/placa vs. Dosis en mg/placa para la cepa TA100 arrojó una pendiente b igual a 6.85 (revertantes por placa/dosis) y una ordenada al origen a igual a 239.5 (revertantes por placa), con un coeficiente de determinación r² igual a 0.972.

La linealidad de dosis-respuesta confirmó la acción mutagénica del extracto clorofórmico de la hoja de la planta de yerba mate sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA100, indicando un mecanismo de acción por sustitución de pares de bases.

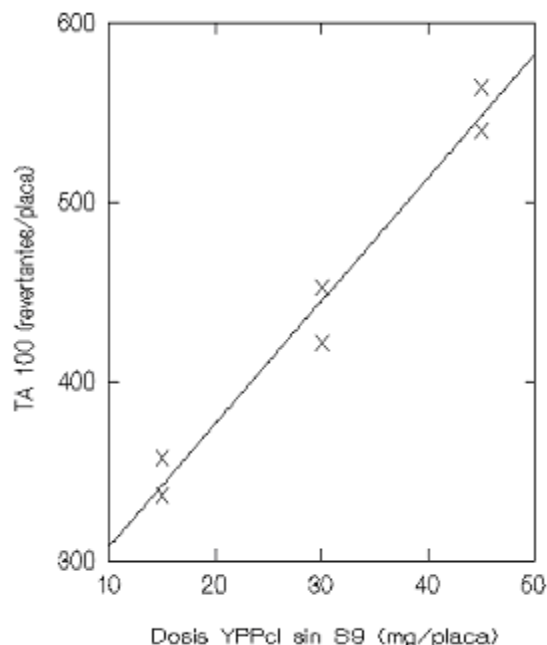


Figura 5.10: Correlación lineal entre cantidad de Revertantes/placa de *Salmonella typhimurium* TA100 y la dosis en mg/placa del extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}), sin activación metabólica.

5.1.2.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, con activación metabólica

El ensayo en el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 con activación metabólica, se llevó a cabo junto con el extracto acuoso de la planta en presencia de S9 mix, usando así los mismos controles negativos y positivos. Además se realizó un control de disolvente, DMSO, cuyo valor de revertantes por placa fue de 51.0 ± 2.0 para TA98 y de 198.0 ± 15.0 para TA100, siendo estos valores similares a los controles negativos en cada cepa (47.0 ± 6.0 y 196.0 ± 4.0 revertantes por placa, respectivamente; $P > 0.05$).

Como investigación preliminar de mutagenicidad en el extracto clorofórmico, se ensayó un amplio rango de dosis del mismo, empleándose tres concentraciones que variaron entre: 0.45, 4.50 y 45.00 mg /placa, con activación metabólica, a efectos de evaluar la linealidad de dosis-respuesta y determinar el valor de F.M.

La Tabla 5.16 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, tratadas con tres

logaritmos de concentración de extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en presencia de S9 mix.

Tabla 5.16: Efecto mutagénico del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo de preincubación, con activación metabólica, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA100.

| Agente | | Ensayo de Mutagenicidad con S9 mix - Preincubación | | | |
|--------------------------|----------------------|--|-------------------|----------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP _{cl} (BUF) | 0.00 mg ^a | 47.0 ± 6.0 | | 198.0 ± 15.0 | |
| YPP _{cl} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 51.0 ± 2.0 | 1.1 | 196.0 ± 4.0 | 1.0 |
| YPP _{cl} | 0.45 mg | 147.0 ± 1.0 ^b | 3.1 | 245.0 ± 16.0 | 1.2 |
| YPP _{cl} | 4.50 mg | 656.0 ± 5.0 ^b | 14.0 | 516.0 ± 23.0 ^b | 2.6 |
| YPP _{cl} | 45.00 mg | 63.0 ± 13.0 | 1.3 | 1076.0 ± 8.0 ^b | 5.4 |
| 2AF | 2.50 µg | 2880.0 ± 45.0 ^b | 61.3 | 3023.0 ± 11.0 ^b | 15.3 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2AF, 2-Aminofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

En presencia de la cepa TA98, las dos primeras concentraciones muestran un aumento significativo (P>0.05) en el número de revertantes respecto al control negativo con activación metabólica (147.0 ± 1.0 para 0.45 mg/placa y 656.0 ± 5.0 para 4.50 mg/placa) y un valor de F.M. mayor a 2 (3.1 y 14.0 respectivamente). En la concentración de 45.00 mg/placa, estos valores no aumentaron significativamente la frecuencia de revertantes His⁺ respecto del control negativo (63.0 ± 13.0 revertantes por placa, P>0.05). Si consideramos para evaluar el valor de F.M. encontrado (1.3), la llamada “regla de las dos veces” (Ames y col. 1975), dicho valor es menor a 1.5, por lo que se estima como “no mutagénico”. Sin embargo, se observó la presencia de colonias deformadas y adelgazamiento de la capa de fondo bacteriano, indicando una posible toxicidad. Para confirmar este hallazgo, se decidió realizar un ensayo de toxicidad en agar nutritivo en la dosis de 45.00 mg/placa.

Para demostrar la acción mutagénica del extracto clorofórmico con activación metabólica, se determinó la linealidad de revertantes por placa vs. concentración usando un rango de dosis entre 0.45 y 4.50 mg/placa (0.45, 1.13, 2.25 y 4.50 mg/placa).

En presencia de la cepa TA100, las concentraciones de 4.50 y 45.00 mg/ placa de extracto clorofórmico de yerba mate mostraron un aumento en el número de revertantes his⁺ respecto al control negativo con activación metabólica (516.0 ± 23.0 y 1076.0 ± 8.0 revertantes por placa, respectivamente) y un valor de F.M. mayor a 2 (2.6 y 5.4, respectivamente).

Para demostrar la acción mutagénica de este extracto en presencia de S9 mix, se determinó la linealidad de revertantes por placa vs. concentración usando un rango de dosis entre 15.00 y 45.00 mg/placa.

- Ensayo de toxicidad sobre el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* en la dosis 45.00 mg/placa para la cepa TA98, con activación metabólica

Para la concentración de 45.00 mg/placa de extracto clorofórmico de hojas de yerba mate se observó sobre las placas del ensayo de mutagenicidad la presencia de colonias deformadas, con disminución de la opacidad de la capa de fondo bacteriana.

Se realizó un ensayo de toxicidad siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Metodos, sección 4.3.

La Tabla 5.17 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de toxicidad para la concentración de 45.00 mg/placa de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, con activación metabólica.

Tabla 5.17: Efecto tóxico del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}) en la concentración de 45.00 mg/placa, con activación metabólica, sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

| Ensayo de Toxicidad con S9 mix | | |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| | Agente | Cepa TA98 |
| | Concentración/placa | UFC.mL ⁻¹ |
| YPP _{cl} (BUF) | 0.00 mg ^a | 2693.0 ± 52.0 |
| YPP _{cl} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 2600.0 ± 63.0 |
| YPP _{cl} | 45.00 mg | 210.0 ± 15.0 |

^a, Control negativo de toxicidad

^b, P ≤ 0.05

UFC, Unidades Formadoras de Colonias

Se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) en el recuento de colonias de TA98 ($210.0 \pm 15.0 \text{ UFC.mL}^{-1}$) respecto del control negativo ($2693.0 \pm 52.0 \text{ UFC.mL}^{-1}$). El solvente no mostró toxicidad y arrojó valores de UFC.mL^{-1} similares al control con buffer fosfato ($P > 0.05$). Este resultado estaría indicando que la disminución en la concentración bacteriana se debe a toxicidad del extracto a la dosis ensayada.

- Ensayo de linealidad dosis-respuesta del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* con la cepa TA98 en presencia de S9 mix.

Se evaluó la relación entre la concentración de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y los revertantes en placa en el rango de 0.45 a 4.50 mg/placa, usando 4 concentraciones: 0.45, 1.13, 2.25 y 4.50 mg/placa, sembrados con activación metabólica.

La Tabla 5.18 resume los hallazgos encontrados en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, tratada con las cuatro concentraciones de extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en presencia de S9 mix.

Tabla 5.18: Efecto mutagénico del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}) en las dosis estudiadas para evaluar linealidad de efecto vs dosis, utilizando el ensayo de preincubación, con activación metabólica, con la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

| Ensayo de Mutagenicidad con S9 mix | | | |
|------------------------------------|----------------------|------------------------------|-------------------|
| Agente | | Cepa TA98 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| $\text{YPP}_{\text{cl(BUF)}}$ | 0.00 mg ^a | 57.0 ± 1.0 | |
| $\text{YPP}_{\text{cl(DMSO)}}$ | 0.00 mg ^a | 51.0 ± 2.0 | 1.0 |
| YPP_{cl} | 0.45 mg | $148.0 \pm 3.0^{\text{b}}$ | 2.6 |
| YPP_{cl} | 1.13 mg | $230.0 \pm 3.0^{\text{b}}$ | 4.0 |
| YPP_{cl} | 2.25 mg | $404.0 \pm 8.0^{\text{b}}$ | 7.1 |
| YPP_{cl} | 4.50 mg | $657.0 \pm 5.0^{\text{b}}$ | 11.5 |
| 2AF | 2.50 μg | $2880.0 \pm 45.0^{\text{b}}$ | 50.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, $P \leq 0.05$

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2AF, 2-Aminiofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

Se observó que en todas las dosis ensayadas el valor de F.M. era superior a 2 y existía una correlación lineal entre la cantidad de revertantes y la concentración de extracto clorofórmico por placa (Fig.5.11).

La regresión lineal expresada en Revertantes/placa vs. Dosis en mg/placa para la cepa TA98 arrojó una pendiente b igual a 126.38 (revertantes por placa/dosis) y una ordenada al origen a igual a 96.73 (revertantes por placa), con un coeficiente de determinación r^2 igual a 0.995.

Esta correlación lineal dosis-respuesta confirmó la acción mutagénica de la o las sustancias contenidas en el extracto clorofórmico de la hoja de la planta de *Ilex paraguayensis* var. *paraguariensis* sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, en presencia de S9 mix, indicando un mecanismo de acción por desplazamiento en el marco de lectura.

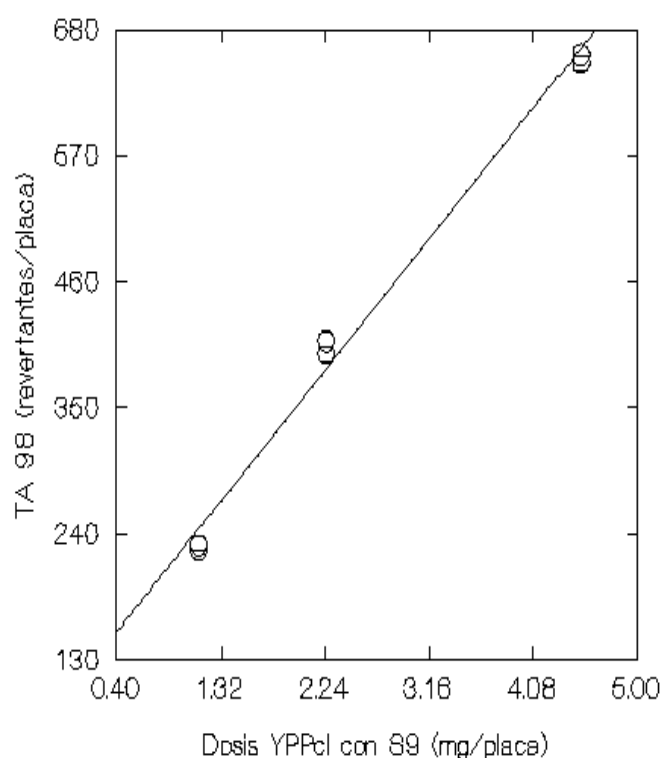


Figura 5.11: Correlación lineal entre cantidad de Revertantes/placa de *Salmonella typhimurium* TA98 y la dosis en mg/placa del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}), con activación metabólica.

- Ensayo de linealidad dosis-respuesta del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* con la cepa TA100 en presencia de S9 mix

Se evaluó la relación entre la concentración de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y los revertantes en placa en el rango de 15.00 a 45.00

mg/placa, usando 3 concentraciones: 15.00, 30.00 y 45.00 mg/placa, sembrados con activación metabólica.

La Tabla 5.19 resume los hallazgos encontrados en el ensayo de preincubación de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA100, tratada con las tres concentraciones de extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en presencia de S9 mix.

Tabla 5.19: Efecto mutagénico del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}) en las dosis estudiadas para evaluar linealidad de efecto vs dosis, utilizando el ensayo de preincubación, con activación metabólica, con la cepa de *Salmonella typhimurium* TA100.

| Ensayo de Mutagenicidad con S9 mix | | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|
| Agente | | Cepa TA100 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP _{cl} (BUF) | 0.00 mg ^a | 190.0 ± 9.0 | |
| YPP _{cl} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 196.0 ± 4.0 | 1.0 |
| YPP _{cl} | 4.50 mg | 515.0 ± 23.0 ^b | 2.7 |
| YPP _{cl} | 15.00 mg | 668.0 ± 10.0 ^b | 3.5 |
| YPP _{cl} | 30.00 mg | 858.0 ± 18.0 ^b | 4.5 |
| YPP _{cl} | 45.00 mg | 1056.0 ± 5.0 ^b | 5.6 |
| 2AF | 2.50 µg | 3022.0 ± 11.0 ^b | 15.9 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, $P \leq 0.05$

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2AF, 2-Aminiofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

Se observó en todas las dosis ensayadas, que los valores de F.M. correspondientes son superiores a 2 y la curva de dosis - respuesta produjo una correlación lineal (Fig. 5.12).

La regresión lineal expresada en Revertantes/placa vs. Dosis en mg/placa para la cepa TA100 con activación metabólica, permitió obtener una pendiente b igual a 13.70 (revertantes por placa/dosis) y una ordenada al origen a igual a 455.60 (revertantes por placa), con un coeficiente de determinación r^2 igual a 0.996.

La linealidad de dosis-respuesta confirmó la acción mutagénica del extracto clorofórmico de la hoja de la planta de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA100, con activación metabólica, indicando un mecanismo de acción por sustitución de pares de bases.

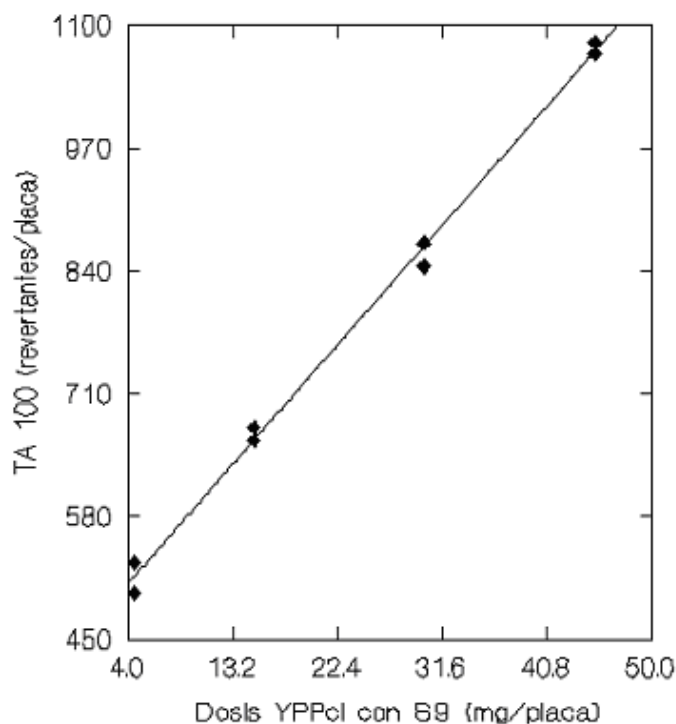


Figura 5.12: Correlación lineal entre cantidad de Revertantes/placa de *Salmonella typhimurium* TA100 y la dosis en mg/placa del extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}), con activación metabólica

5.1.2.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin y con activación metabólica

Los resultados encontrados en el extracto clorofórmico de la hoja de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre la cepa TA98 indicaron la presencia de sustancias que podrían inducir la actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella Microsoma por el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura. El efecto mutagénico observado en presencia de S9 mix, sugirió que las enzimas microsomales hepáticas generarían modificaciones en las sustancias mutagénicas del extracto clorofórmico dando lugar a un compuesto con menor poder mutagenico (desactivación parcial). Ensayos de mutagenicidad en extractos clorofórmicos de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* no han sido informados.

La Figura 5.13 muestra las curvas de dosis-respuesta del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sin y con activación metabólica sobre la cepa de *Salmonella tiphymurium* TA98.

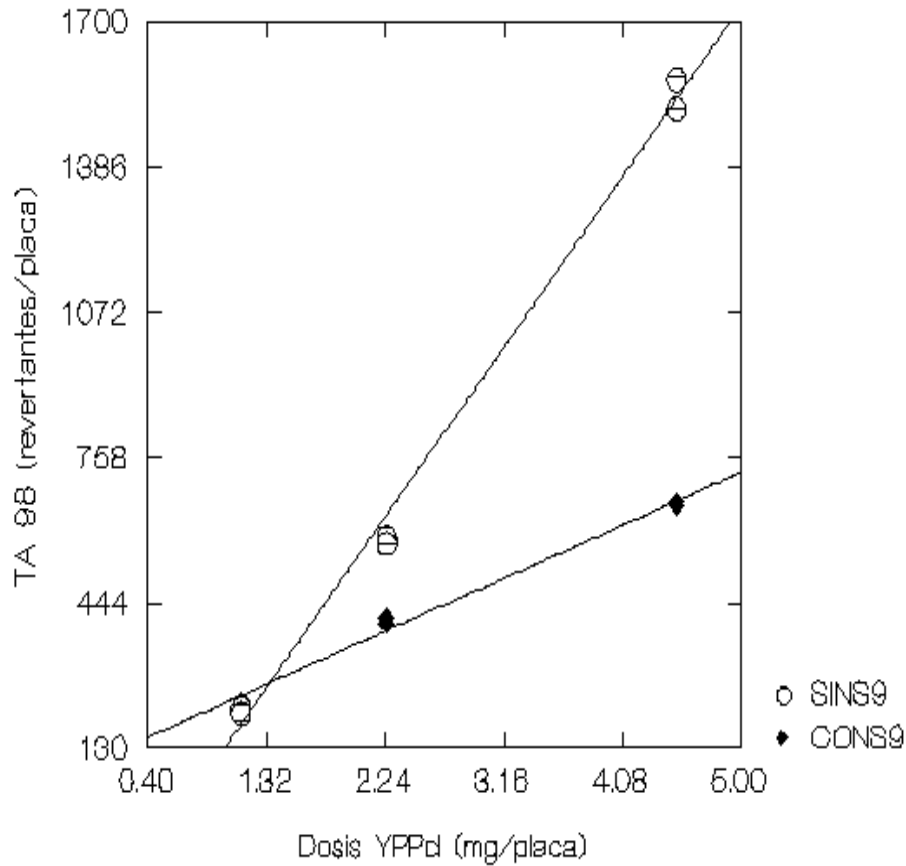


Figura 5.13: Ensayo de mutagénesis del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{cl}), con *Salmonella typhimurium* TA98 ♦ con y sin ○ activación metabólica.

A bajas dosis el o los compuestos generadores de mutagenicidad en presencia de S9 mix, sufren alguna modificación que hace que sus efectos sean mayores usando el mecanismo de cambio del marco de lectura. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración del extracto clorofórmico, esta modificación generada por la activación metabólica, hace que la cantidad de revertantes por placa disminuya respecto de los resultados encontrados sin S9 mix. Esta observación se evidencia en las pendientes (revertantes por placa/dosis) de las curvas de linealidad dosis- respuesta (399.62 sin activación metabólica y 126.38 con activación metabólica).

La Tabla 5.20 compara los parámetros de regresión lineal de las curvas de dosis- respuesta llevadas a cabo sobre los extractos acuoso y clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin y con activación metabólica (S9 mix).

Comparando los resultados obtenidos en el extracto orgánico con el acuoso, las pendientes de las curvas de dosis-respuesta sin y con S9 mix presentan la misma característica: sus valores son mayores en ausencia de S9 mix y disminuyen significativamente en presencia del mismo

(Tabla 5.20). Además la pendiente del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (399.62 revertantes por placa/dosis) en el ensayo sin activación metabólica es significativamente mayor que la correspondiente al ensayo realizado con el extracto acuoso en las mismas condiciones (24.77 revertantes por placa/dosis). Lo mismo sucede en los ensayos en presencia de S9 mix para los extractos correspondientes (126.38 y 13.30 revertantes por placa/dosis en el extracto clorofórmico y acuoso respectivamente).

Estos hallazgos estarían indicando que el efecto obtenido en el extracto clorofórmico es producido por alguna de sustancia que también se encontraría en el extracto acuoso, y que la diferencia en las pendientes de curva dosis – respuesta entre los distintos extractos (significativamente mayores en el extracto clorofórmico) estaría vinculada a la mayor concentración del o los compuestos presentes en el extracto clorofórmico.

Tabla 5.20: Parámetros de las curvas de dosis-respuesta llevadas a cabo sobre el extracto acuoso (YPP) y clorofórmico (YPP_{cl}) de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, con las cepas TA98 y TA100, sin y con S9mix

| Linealidad dosis-respuesta | Cepa TA98 | | | | Cepa TA100 | | | |
|-----------------------------------|---------------------|------------|---|------------|---------------------|------------|---|------------|
| | Extracto Acuoso YPP | | Extracto Clorofórmico YPP _{cl} | | Extracto Acuoso YPP | | Extracto Clorofórmico YPP _{cl} | |
| | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix |
| a | 197.89 | 389.72 | -266.50 | 96.73 | - | - | 239.50 | 455.60 |
| b | 24.77 | 13.30 | 399.62 | 126.38 | - | - | 6.85 | 13.70 |
| r ² | 0.977 | 0.96 | 0.995 | 1.00 | - | - | 0.972 | 1.00 |
| Rango de concentración (mg/placa) | 4.50-20.00 | 4.50-20.00 | 1.13-4.50 | 0.45-4.50 | - | - | 15.00-45.00 | 4.50-45.00 |

a, ordenada al origen (revertantes por placa)

b, pendiente (revertantes por placa/dosis)

r², coeficiente de determinación

Shalmashi y Golmohammad (2010), midieron la solubilidad de la cafeína en agua, etilacetato, etanol, tetracloruro de carbono, metanol, cloroformo, diclorometano y acetona a través de un método gravimétrico, en el rango de temperaturas de 298 a 323 K y correlacionaron la solubilidad del compuesto con la temperatura. Ellos encontraron que la mayor solubilidad de la cafeína se obtenía usando el solvente cloroformo y el diclorometano en comparación con los otros solventes.

Por lo expuesto en la sección 5.1.1.3, se piensa que la cafeína podría hallarse concentrada en el extracto clorofórmico, siendo responsable de la mutagenicidad por corrimiento en el marco de lectura. Sin embargo, estudios realizados sobre los efectos mutagénicos de la cafeína indican una supresión de dichos efectos cuando las bacterias o las células de mamífero son cultivadas en presencia de extractos de hígado, los cuales contienen enzimas detoxificantes

(Aeschbacher, 1986) en lugar de un efecto desactivador como el encontrado en el presente trabajo, en el extracto clorofórmico de yerba mate.

Los resultados encontrados en el extracto clorofórmico de la hoja de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre la cepa TA100 indicaron la presencia de sustancias que inducen la actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella Microsoma por el mecanismo de sustitución de pares de bases. En presencia de S9 mix, las enzimas microsomales hepáticas serían las responsables de modificar los efectos mutagénicos del extracto orgánico potenciando su acción mutagénica. Este supuesto se basa en la diferencia marcada en las pendientes de las curvas de regresión lineal realizadas con la cepa TA100, con y sin activación metabólica (Tabla 5.20). La relación revertantes por placa/dosis, sin S9 mix fue 6.85 respecto de aquella obtenida con S9 mix, 13.70, siendo este último valor prácticamente el doble del primero.

La Figura 5.14 muestra las curvas de dosis-respuesta del extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sin y con activación metabólica sobre la cepa de *Salmonella tiphymurium* TA100.

Para la cepa TA100 no se encontró mutagenicidad empleando el extracto acuoso de yerba mate, sin embargo, se evidenció mutagenicidad en el extracto clorofórmico; esto podría apoyar la idea que la o las sustancias responsables de la mutagenicidad estarían en una concentración muy baja en el extracto acuoso ensayadas (0.45, 4.50 y 45.00 mg por placa) y sí se evidenciarían en el extracto clorofórmico de la hoja por hallarse más concentradas, debido a la afinidad de estas sustancias por el solvente citado.

Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en los trabajos de Leitao y Braga (1994) y Fonseca y colaboradores (2000), en los cuales no se observó mutagenicidad en presencia de activación metabólica en el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis*, los resultados hallados en el presente ensayo mostraron un aumento importante de la mutagenicidad en presencia de S9 mix, evidenciado en las pendientes de las curvas de dosis- respuesta para el rango de concentraciones entre 15.00 y 45.00 mg/placa (6.85 sin activación metabólica y 13.70 con activación metabólica, Tabla 5.20).

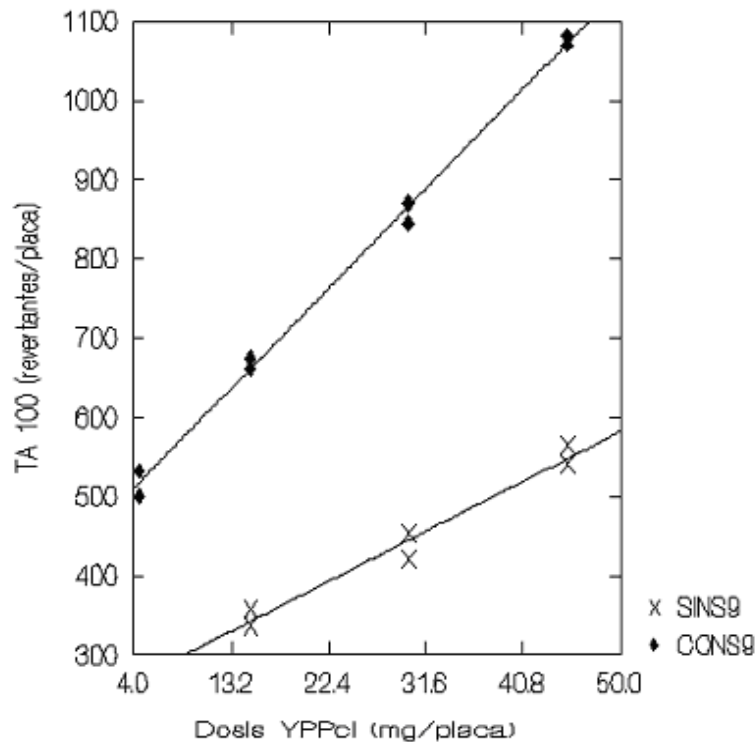


Figura 5.14: Ensayo de mutagénesis del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{c1}), con *Salmonella typhimurium* TA100 ♦ con y sin x activación metabólica.

Fagundes y col. (2006) han encontrado una correlación entre la cantidad de mate consumido y la concentración de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en el cuerpo a través de la concentración del metabolito eliminado por orina. Es sabido que los PAHs, sobre todo benzo[a]pireno, tienen propiedades mutagénicas principalmente para TA100 (Maron y Ames, 1983). Bos y colaboradores (1988) encontraron que compuestos de cuatro anillos como el Benzo[c]fenantreno y el Pireno son mutagénicos principalmente para TA100, con activación metabólica. También se ha hallado mutagenicidad para TA98 y TA100 para el caso del Fluoranteno, en presencia de S9 mix (Bos y col., 1987). Yoshino y Urano (1996) indicaron mutagenicidad de benzo[a]pireno con la cepa TA98, en presencia de activación metabólica y de fluoranteno con la cepa TA100, en presencia de S9 mix.

Al menos 15 compuestos de PAHs han sido hallados en variedades de mate que se generan durante los diferentes procesos de elaboración de la yerba mate.

Estos compuestos fueron aislados e identificados por el método de extracción por sorción sobre barras de agitación (SBSE) y cromatografía líquida de alta performance con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) (Zuin y col. 2005). Las cantidades halladas de PAHs en muestras

de Mate brasileiro, se encontraron en un rango de 600 a 2300 ng.L⁻¹, siendo el naftaleno, acenafteno y fenantreno los que mostraron mayor concentración.

Cuando se examinó la población de Campinas (Brasil) y el mate consumido, se encontró que todas las marcas comerciales de yerba mate que consumían tenían un valor promedio de 0.70 µg.kg⁻¹ de PAHs (Rojo de Camargo y col., 2002).

El Código Alimentario Argentino, en el apartado de conservación y tratamiento de los alimentos, sección de conservados y preservados, establece en su artículo 171- (Res.747,19/05/78) que los productos ahumados no deben contener una cantidad mayor de 1,0 µg.kg⁻¹ (1ppb) de 1,2-benzopireno, 3,4-benzopireno, fluoreno, fenantreno y otros hidrocarburos policíclicos (aisladamente o en mezcla) de acción tóxica o nociva para la salud. Considerando que el consumo diario promedio estimado en Brasil es de 69.79 g de infusión de yerba mate, se puede asumir que la infusión de yerba mate contribuye aproximadamente en 0.05 µg de PAHs totales en la ingesta diaria de estos contaminantes para la población estudiada (600 personas) (Rojo de Camargo y col., 2002).

Schlemitz y Pfannhauser (1997) informaron cantidades de 542 ng.kg⁻¹ de benzo[a]pireno en hojas tostadas y 225 ng.kg⁻¹ en hojas verdes. Ruschenburg (1985) ya había informado la presencia de grandes cantidades (24-461 ng.kg⁻¹) de benzo[a]pireno en 8 muestras comerciales de yerba mate. Kamangar y colaboradores (2008) midieron la concentración de 21 PAHs distintos en hojas secas de 8 marcas comerciales de yerba mate y en infusiones hechas con agua caliente (80°C) y agua fría (5°C) (Tabla 5.21). Las medidas fueron hechas por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas, usando PAHs deuterados como estándares.

Las infusiones fueron hechas agregando el agua a las hojas, removiendo la infusión resultante luego de 5 minutos y luego agregando más agua a las hojas restantes. El proceso fue repetido 12 veces para cada temperatura de infusión. La concentración total de los 21 PAHs en las diferentes marcas de yerba mate estuvo en el rango de 536 a 2906 ng.kg⁻¹ (0.5 y 2.9 ppb) de hojas secas.

Tabla 5.21: PAHs liberados en infusiones de mate calientes y frías de la marca 1 (ng.kg⁻¹ de hojas secas)^a

| | Caliente ⁺ | | | | | | Frio ⁺ | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------------|--|--|
| | 1ra infusión | 3ra infusión | 6ta infusión | 12va infusión ^{**} | Total Estimado ^{***} | 1ra infusión | 3ra infusión | 6ta infusión | 12va infusión ^{**} | Total Estimado ^{***} | | |
| Naftaleno | 11.10 | 8.19 | 7.15 | 5.82 | 89.70 | 8.88 | 7.18 | 5.74 | 5.98 | 78.00 | | |
| Fluoreno | 1.25 | 1.08 | 0.53 | 0.26 | 7.88 | 1.14 | 0.64 | 0.66 | <1 | 8.02 | | |
| Fenantreno | 55.20 | 49.90 | 19.00 | 15.8 | 348.00 | 53.00 | 26.50 | 18.50 | 17.10 | 289.00 | | |
| Antraceno | 2.31 | 2.06 | 0.47 | 0.36 | 12.00 | 2.08 | 0.93 | 0.68 | 0.58 | 10.05 | | |
| Fluoranteno | 29.20 | 22.5 | 7.71 | 5.13 | 153.00 | 37.5 | 13.90 | 7.98 | 7.11 | 152.00 | | |
| Pireno | 28.50 | 23.20 | 6.65 | 5.44 | 150.00 | 32.3 | 13.70 | 7.78 | 6.59 | 141.00 | | |
| Ciclopenta[cd]pireno | 18.10 | 13.60 | <4 | <3 | 75.40 | 20.8 | 10.50 | <3 | <3 | 69.50 | | |
| Benzo[ghi]fluoranteno | 2.72 | 2.07 | <2 | <2 | 17.30 | 3.65 | <2 | <2 | <2 | 16.00 | | |
| Benzo[c]fenantreno | <2 | <2 | <2 | <2 | 12.00 | <2 | <2 | <2 | <2 | 12.00 | | |
| Benzo[a]antraceno | 2.61 | 2.11 | 1.01 | 0.8 | 16.50 | 2.75 | 1.32 | 0.94 | 0.75 | 14.30 | | |
| Criseno + trifenileno | 5.21 | 4.67 | 1.98 | 2 | 35.40 | 6.39 | 3.13 | 2.10 | 2.03 | 34.00 | | |
| Benzo[b+.]fluoranteno | 3.63 | 3.23 | 1.80 | 1.02 | 25.20 | 4.25 | 2.51 | 1.08 | 0.94 | 20.80 | | |
| Benzo[k]fluoranteno | 1.47 | 1.11 | 0.62 | 0.4 | 9.16 | 1.35 | 0.82 | 0.65 | 0.56 | 8.96 | | |
| Benzo[a]fluoranteno | <2 | <2 | <2 | <2 | 12.00 | <2 | <2 | <2 | <2 | 12.00 | | |
| Benzo[e]pireno | 3.75 | 3.60 | 1.84 | 0.95 | 26.20 | 4.1 | 2.88 | 1.92 | 1.60 | 27.60 | | |
| Benzo[a]pireno | 4.56 | 3.64 | 1.25 | 1.02 | 25.10 | 4.39 | 2.76 | 2.07 | 1.50 | 28.10 | | |
| Perileno | <2 | <2 | <2 | <2 | 12.00 | <2 | <2 | <2 | <2 | 12.00 | | |
| Indeno[1,2,3-cd]-pireno | 2.76 | 2.25 | <2 | <2 | 17.80 | 2.3 | 1.23 | <2 | <2 | 14.50 | | |
| Benzo[ghi]perileno | 4.19 | 3.59 | <2 | <2 | 23.30 | 4.08 | 3.12 | 2.16 | <2 | 27.10 | | |
| Dibenz[a,h+a,c]antraceno | 1.47 | 1.09 | <2 | <2 | 12.90 | 1.01 | <2 | <2 | <2 | 12.00 | | |
| Coroneno | <2 | <2 | <2 | <2 | 12.00 | <2 | <2 | <2 | <2 | 12.00 | | |

⁺ Infusiones de mate caliente y frío preparado a 80°C y 5°C, respectivamente.

^{**} la infusión hecha con yerba mate fue realizada con agua fresca a la temperatura apropiada que se agregó a las hojas secas durante 5 minutos. Los resultados mostrados para las infusiones 1, 3, 6 y 12 se corresponden a las infusiones tomadas a 5, 15, 30 y 60 minutos.

^{***} los totales estimados fueron calculados por regresión lineal entre las 4 medidas.

^a Adaptado de Kamangar y col. (2008)

Concentraciones de benzo[a]pireno se situaron entre 8.03 y 53.3 ng.kg⁻¹ (0.008 y 0.053 ppb) de hojas secas. Para las infusiones preparadas usando agua caliente y la marca 1, se halló el 37% del contenido de PAHs medidos (1092 de 2906 ng) y el 50% de benzo[a]pireno (25.1 de 50 ng) en las 12 infusiones. Resultados similares se obtuvieron tanto en las infusiones frías como en las calientes.

Teniendo en cuenta la alta solubilidad de estos compuestos en cloroformo, se podría pensar que los mismos también podrían estar concentrados en este extracto y que son los responsables de la importante acción mutagénica generada en los ensayos presencia activación metabólica. También se podría pensar que estos compuestos estarían en muy baja concentración en el extracto acuoso preparado debido a sus características hidrofóbicas y por esa razón no se observaría mutagenicidad.

- Conclusión

El extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* presenta actividad mutagénica sobre la cepa de Salmonella TA98 través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura TA98. Dicha actividad es aún mayor que en el extracto acuoso de la planta. Este resultado podría atribuirse a la presencia de altas concentraciones de cafeína que por su afinidad por el solvente cloroformo, se encontraría en mayor concentración. También podrían contribuir a la mutagenicidad la presencia de compuestos aromáticos policíclicos como el benzo[a]pireno y el fluoranteno, informados como mutagénicos para TA98 y TA100 en presencia de S9 mix.

Las enzimas microsomales presentes en los ensayos con S9 mix modificarían estos compuestos ejerciendo una disminución de la inducción de la mutagenicidad a altas concentraciones, observándose el mismo patrón que en el extracto acuoso.

También se observó mutagenicidad en presencia de la cepa TA100, cuyo mecanismo de acción es a través de la sustitución de pares de bases. Se sugirió la presencia de compuestos policíclicos aromáticos (PAHs), como el benzo[a]pireno, que se encontrarían concentrados en el solvente orgánico y que su actividad en el extracto acuoso no se observaría debido a la baja cantidad de los mismos en la infusión. Las enzimas microsomales presentes en los ensayos con S9 mix modificarían estos compuestos presentes en el extracto clorofórmico potenciando su acción mutagénica.

5.1.3. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*

5.1.3.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin activación metabólica

El ensayo en el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 sin activación metabólica, se llevó a cabo junto con el extractos acuoso y clorofórmico de la planta en ausencia de S9 mix, usando así los mismos controles negativos y positivos. Además se hizo un control de disolvente, DMSO, el cual arrojó un valor de revertantes por placa (47.0 ± 1.0 para TA98 y 185.0 ± 8.0 para TA100) similar al encontrado para el control negativo (46.0 ± 1.0 y 191 ± 8.0 revertantes por placa para TA98 y TA100 respectivamente, $P > 0.05$).

Como investigación preliminar de mutagenicidad en el extracto acetónico, se trabajó con tres concentraciones: 0.45, 4.50 y 45.00 mg /placa, sin activación metabólica, para establecer el rango indicado a evaluar la linealidad de dosis- respuesta y determinar el valor de F.M.

La Tabla 5.22 resume los hallazgos encontrados en el ensayo de preincubación de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, tratadas con tres logaritmos de concentración de extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en ausencia de S9 mix.

En presencia de la cepa TA98 se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en el número de revertantes para las tres concentraciones, siendo sus valores de F.M. superiores a 2 (mutagénico). Teniendo en cuenta los valores hallados, se decidió determinar la linealidad de revertantes por placa vs. concentración utilizando dosis entre las concentraciones de 0.30 y 1.50 mg/placa.

En presencia de la cepa TA100, las tres concentraciones del extracto acetónico de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo sin activación metabólica ($P > 0.05$). Todos los valores de F.M. arrojaron valores cercanos a 1, considerándolos no mutagénicos (Ames y col., 1975). Esto estaría indicando que en el extracto acetónico de las hojas de yerba mate no habría sustancias mutagénicas que afecten a *Salmonella* TA100 mediante un mecanismo de acción sea la sustitución de pares de bases para los rangos de concentración investigados (de 0.45 a 45.00 mg por placa). Por esta razón no se ensayó una curva de dosis-respuesta.

Tabla 5.22: Efecto mutagénico del extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{acet}) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo de preincubación, sin activación metabólica, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

| Agente | | Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix - Preincubación | | | |
|----------------------------|----------------------|--|-------------------|---------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP _{acet} (BUF) | 0.00 mg ^a | 46.0 ± 1.0 | | 191.0 ± 8.0 | |
| YPP _{acet} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 47.0 ± 1.0 | 1.0 | 185.0 ± 8.0 | 1.0 |
| YPP _{acet} | 0.45 mg | 135.0 ± 4.0 ^b | 2.9 | 180.0 ± 6.0 | 0.9 |
| YPP _{acet} | 4.50 mg | 1407.0 ± 11.0 ^b | 30.6 | 183.0 ± 5.0 | 1.0 |
| YPP _{acet} | 45.00 mg | 1996.0 ± 19.0 ^b | 43.4 | 186.0 ± 5.0 | 1.0 |
| 2NF | 2.50 µg | 226.0 ± 16.0 ^b | 4.9 | | |
| SAZ | 1.50 µg | | | 486.0 ± 30.0 ^b | 2.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2NF, 2-Nitrofluoreno; SAZ, Azida de sodio; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

- Ensayo de linealidad dosis-respuesta del extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* con la cepa TA98 en ausencia de S9 mix

Se evaluó la relación entre la concentración de extracto acetónico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y los revertantes en placa en el rango de 0.30 a 1.50 mg/placa, usando 4 concentraciones: 0.30, 0.45, 0.80 y 1.50 mg/placa, sembradas sin activación metabólica.

La Tabla 5.23 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de preincubación de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, tratada con las cuatro concentraciones de extracto acetónico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en ausencia de S9 mix.

Se observó un valor de F.M. de 1.5 para la concentración de 0.30 mg/placa, siendo levemente mutagénico (Ames y col., 1975). En el resto de las dosis ensayadas el valor de F.M. fue superior a 2 y se evidenció una correlación lineal entre la cantidad de revertantes y la concentración de extracto acetónico por placa (Fig. 5.15).

Tabla 5.23: Efecto mutagénico del extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{acet}) en las dosis estudiadas para evaluar linealidad de efecto vs dosis, utilizando el ensayo de preincubación, sin activación metabólica, con la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

| Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix | | | |
|------------------------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|
| Agente | Concentración/placa | Cepa TA98 | |
| | | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP _{acet} (BUF) | 0.00 mg ^a | 56.0 ± 1.0 | |
| YPP _{acet} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 57.0 ± 1.0 | 1.0 |
| YPP _{acet} | 0.30 mg | 86.0 ± 3.0 ^d | 1.5 |
| YPP _{acet} | 0.45 mg | 135.0 ± 4.0 ^b | 2.4 |
| YPP _{acet} | 0.80 mg | 248.0 ± 12.0 ^b | 4.4 |
| YPP _{acet} | 1.50 mg | 446.0 ± 42.0 ^b | 8.3 |
| 2NF | 2.50 µg | 253.0 ± 13.0 ^b | 4.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

^d, Ligeramente mutagénico (entre 1.5 y 2)

2NF, 2-Nitrofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

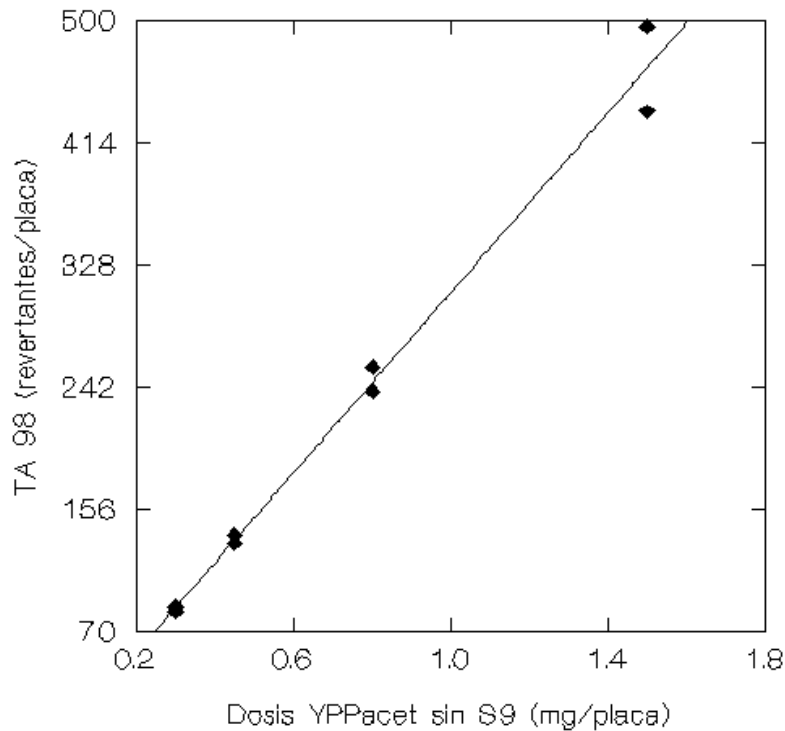


Figura 5.15: Correlación lineal entre cantidad de Revertantes/placa de *Salmonella typhimurium* TA98 y la dosis en mg/placa del extracto acetónico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{acet}), sin activación metabólica.

La regresión lineal expresada en Revertantes/placa vs. Dosis en mg/placa para la cepa TA 98 dio una pendiente b igual a 316.26 (revertantes por placa/dosis) y una ordenada al origen a igual a -7.52 (revertantes por placa), con un coeficiente de determinación r^2 igual a 0.989.

Esta correlación lineal dosis-respuesta confirmó la acción mutagénica directa de la o las sustancias contenidas en el extracto acetónico de la hoja de la planta de yerba mate sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, indicando un mecanismo de acción por desplazamiento en el marco de lectura.

5.1.3.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, con activación metabólica

Los controles negativos usando buffer fosfato arrojaron un valor de 47.0 ± 6.0 y 198.0 ± 15.0 revertantes espontáneos por placa para TA98 y TA100, respectivamente.

Además se realizó un control de disolvente, DMSO, cuyo valor de revertantes por placa fue de 52.0 ± 2.0 para TA98 y de 196.0 ± 4.0 para TA100, siendo estos valores similares a los controles negativos en cada cepa ($P > 0.05$).

El control positivo, usando 2-aminofluoreno (2AF, 2.50 μg por placa) como inductor de mutagenicidad para el ensayo con S9 mix, arrojó un valor de 3131.0 ± 38.0 revertantes por placa para la cepa TA98 y 3023.0 ± 45.0 revertantes por placa para la cepa TA100, siendo dicho recuento de revertantes significativamente mayor al control negativo ($P < 0.05$).

Este resultado confirmó las propiedades de reversión y especificidad de la cepa TA98 y TA100 además de la eficacia del S9 mix.

Como investigación preliminar de mutagenicidad en el extracto acetónico, se trabajó con tres concentraciones: 0.45, 4.50 y 45.00 mg /placa, con activación metabólica, para establecer el rango indicado a evaluar la linealidad de dosis- respuesta y determinar el valor de F.M.

La Tabla 5.24 muestra los hallazgos obtenidos en el ensayo de preincubación de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA100, tratadas con tres logaritmos de concentración de extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en presencia de S9 mix.

En presencia de TA98, la concentración de 0.45 mg/placa de extracto acetónico muestra un aumento en el número de revertantes respecto al control negativo con activación metabólica (833.0 ± 8.0 revertantes por placa, $P > 0.05$) y un valor de F.M. superior a 2 (18.1). Las dos últimas dosis no mostraron diferencia en la frecuencia de revertantes His⁺ respecto del control negativo (53.0 ± 1.0 y 42.0 ± 5.0 revertantes por placa para 4.50 y 45.00 mg/placa respectivamente, $P > 0.05$). Sin embargo se observó la presencia de colonias deformadas sobre

un fondo opaco en las placas, indicando una posible toxicidad. Para confirmar este hallazgo, se decidió realizar un ensayo de toxicidad en agar nutritivo.

La acción mutagénica del extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* en presencia de S9 mix, se determinó realizando el ensayo de linealidad de Revertantes por placa de TA98 vs. Concentración, usando el rango de dosis de 0.20 a 0.80 mg por placa.

En presencia de TA100, las tres concentraciones del extracto acetónico de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo sin activación metabólica ($P > 0.05$) y los valores de F.M. arrojaron valores cercanos a 1 (no mutagénicos). Esto estaría indicando que en el extracto acetónico de las hojas de yerba mate no habría sustancias modificadas por las enzimas microsomales que se conviertan en mutagénicas para la cepa TA100 mediante el mecanismo de acción de sustitución de pares de bases, para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

Tabla 5.24: Efecto mutagénico del extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{acet}) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo de preincubación, con activación metabólica, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

| Agente | Concentración/placa | Ensayo de Mutagenicidad con S9 mix - Preincubación | | | |
|----------------------------|----------------------|--|-------------------|----------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP _{acet} (BUF) | 0.00 mg ^a | 46.0 ± 6.0 | | 198.0 ± 15.0 | |
| YPP _{acet} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 52.0 ± 2.0 | 1.1 | 196.0 ± 4.0 | 1.0 |
| YPP _{acet} | 0.45 mg | 833.0 ± 8.0 ^b | 18.1 | 208.0 ± 10.0 | 1.1 |
| YPP _{acet} | 4.50 mg | 53.0 ± 1.0 | 1.2 | 201.0 ± 3.0 | 1.0 |
| YPP _{acet} | 45.00 mg | 42.0 ± 5.0 | 0.9 | 216.0 ± 23.0 | 1.1 |
| 2AF | 2.50 µg | 3131.0 ± 38.0 ^b | 66.6 | 3023.0 ± 45.0 ^b | 15.3 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, $P \leq 0.05$

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2AF, 2-Aminofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

- Ensayo de toxicidad sobre el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* en la dosis de 4.50 y 45.00 mg/placa para la cepa TA98, con activación metabólica

Las concentraciones de 4.50 y 45.00 mg/placa de extracto acetónico de hojas de yerba mate mostraron sobre las placas del ensayo de mutagenicidad la presencia de colonias deformadas, con disminución de la opacidad de la capa de fondo bacteriana.

Se realizó un ensayo de toxicidad siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Metodos, sección 4.3.

La Tabla 5.25 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de toxicidad para la concentraciones de 4.50 y 45.00 mg/placa de extracto acetónico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, con activación metabólica, indicando una disminución significativa ($P < 0.05$) en el recuento de colonias de TA98 (156.0 ± 35.0 UFC.mL⁻¹ para 4.50 mg/placa y 53.0 ± 23.0 UFC.mL⁻¹ para 45.00 mg/placa) respecto del control negativo (3020.0 ± 12.0 UFC.mL⁻¹). El solvente no mostró toxicidad y arrojó valores de UFC.mL⁻¹ similares al control con buffer fosfato ($P > 0.05$). Este resultado estaría indicando que la disminución en la concentración bacteriana se debe a toxicidad del extracto en las dosis ensayadas.

Tabla 5.25: Efecto tóxico del extracto acetónico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{acet}) en la concentraciones de 4.50 y 45.00 mg/placa, con activación metabólica, sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

| Ensayo de Toxicidad | | |
|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| Agente | Cepa TA98 | |
| Concentración/placa | UFC.mL ⁻¹ | |
| YPP _{acet(BUF)} | 0.00 mg ^a | 3020.0 ± 12.0 |
| YPP _{acet(DMSO)} | 0.00 mg ^a | 2908.0 ± 56.0 |
| YPP _{acet} | 4.50 mg | 156.0 ± 35.0 ^b |
| YPP _{acet} | 45.00 mg | 53.0 ± 23.0 ^b |

^a, Control negativo de toxicidad

^b, $P \leq 0.05$

UFC, Unidades Formadoras de Colonias

- Ensayo de linealidad dosis-respuesta del extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* con la cepa TA98 en presencia de S9 mix

Se evaluó la relación entre la concentración de extracto acetónico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y los revertantes en placa en el rango de 0.20 a 0.80

mg/placa, usando 4 concentraciones: 0.20, 0.30, 0.45 y 0.80 mg/placa, sembrados con activación metabólica.

La Tabla 5.26 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de preincubación de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, tratada con las cuatro concentraciones de extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, en presencia de S9 mix.

Tabla 5.26: Efecto mutagénico del extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{acet}) en las dosis estudiadas para evaluar linealidad de efecto vs dosis, utilizando el ensayo de Ames con preincubación, con activación metabólica, con la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

| Ensayo de Mutagenicidad con S9 mix | | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|
| Agente | | Cepa TA98 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YPP _{acet} (BUF) | 0.00 mg ^a | 57.0 ± 1.0 | |
| YPP _{acet} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 52.0 ± 2.0 | 1.0 |
| YPP _{acet} | 0.20 mg | 388.0 ± 100.0 ^b | 6.9 |
| YPP _{acet} | 0.30 mg | 564.0 ± 12.0 ^b | 9.9 |
| YPP _{acet} | 0.45 mg | 833.0 ± 8.0 ^b | 14.6 |
| YPP _{acet} | 0.80 mg | 1453.0 ± 24.0 ^b | 25.5 |
| 2AF | 2.50 µg | 3131.0 ± 38.0 ^b | 54.9 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, $P \leq 0,05$

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2AF, 2-Aminiofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

Se observó que en todas las dosis ensayadas el F.M. era superior a 2 y existía una correlación lineal entre la cantidad de revertantes y la concentración de extracto acetónico por placa (Fig. 5.16). La recta de regresión lineal expresada en Revertantes/placa vs. Dosis en mg/placa para la cepa TA 98 arrojó una pendiente b igual a 1776.40 (revertantes por placa/dosis) y una ordenada al origen a igual a 32.20 (revertantes por placa), con un coeficiente de determinación r^2 igual a 0.992.

Esta correlación lineal dosis-respuesta confirmó la acción mutagénica del extracto acetónico de la hoja de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, en presencia de activación metabólica, indicando un mecanismo de acción por desplazamiento en el marco de lectura.

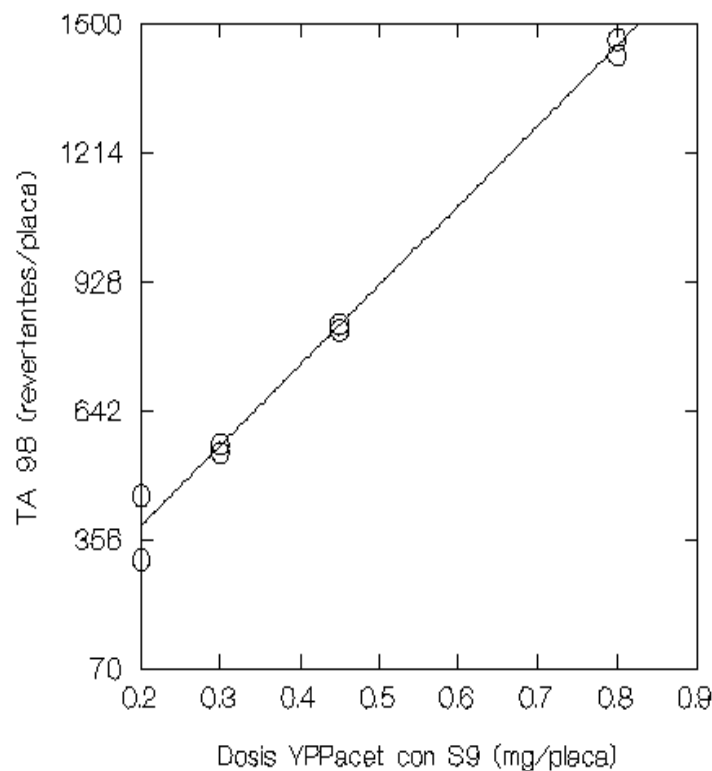


Figura 5.16: Correlación lineal entre cantidad de Revertantes/placa de *Salmonella typhimurium* TA98 y la dosis en mg/placa del extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{acet}), con activación metabólica.

5.1.3.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin y con activación metabólica

Los resultados encontrados en los ensayos realizados con la cepa TA98 indicaron que en el extracto acetónico de la hoja de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* habría sustancias que inducen la actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella Microsoma por el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura. El efecto mutagénico en presencia de S9 mix sugiere que las enzimas microsomales pueden inducir modificaciones en estos compuestos disueltos en el extracto orgánico aumentando su actividad.

La Figura 5.17 muestra las curvas de dosis-respuesta del extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sin y con activación metabólica sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

La Tabla 5.27 resume los parámetros de las curvas de linealidad de dosis- respuesta realizadas sobre extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{acet}) en los rangos de

0.30 a 1.50 mg/placa sin S9 mix y de 0.20 a 0.80 mg/placa con S9 mix, en presencia de la cepa TA98.

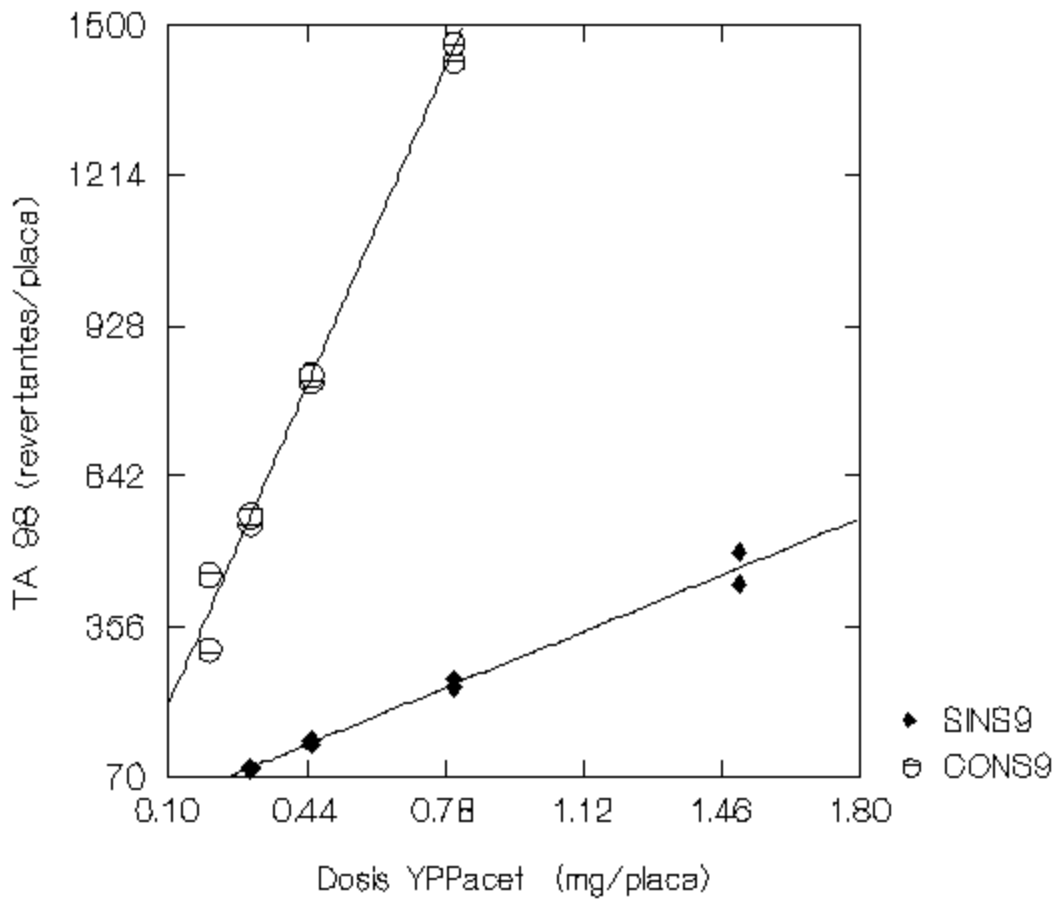




Figura 5.17: Ensayo de mutagénesis del extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{ct}), con *Salmonella typhimurium* TA100 con  y sin  activación metabólica.

Se observó que en todas las dosis el o los compuestos generadores de mutagenicidad en presencia de S9 mix, sufrieron alguna modificación que hizo que sus efectos sean significativamente mayores usando el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura. Esto se evidenció al ver las pendientes (revertantes por placa/dosis) de las curvas de comprobación de linealidad de dosis- respuesta (316.26 sin activación metabólica y 1776.40 con activación metabólica), donde se observó un aumento del efecto mutagénico en presencia de S9 mix.

Tabla 5.27: Parámetros de las curvas de dosis-respuesta llevadas a cabo sobre el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{acet}), con la cepa TA98, sin y con S9mix

| Cepa TA98 | | |
|-----------------------------------|------------|------------|
| YPP _{acet} | Sin S9 mix | Con S9 mix |
| Linealidad | | |
| dosis-respuesta | | |
| a | -7.52 | 32.20 |
| b | 316.26 | 1776.40 |
| r ² | 0.989 | 0.992 |
| Rango de concentración (mg/placa) | 0.30-1.50 | 0.20-0.80 |

a, ordenada al origen (revertantes por placa)
b, pendiente (revertantes por placa/dosis)
r², coeficiente de determinación

Ensayos de mutagenicidad en extractos acetónicos de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* no han sido estudiados.

Chebil y colaboradores (2007) investigaron la solubilidad de los flavonoides quercetina, isoquercetina, rutina, crisina, naringenina y hesperetina en distintos solventes orgánicos: acetonitrilo, acetona y *tert*-amil alcohol. Encontraron que la solubilidad fue afectada por la naturaleza del solvente y por la estructura del flavonoide. La quercetina resultó ser el flavonoide con mayor solubilidad en acetona, siendo de 80 mmol.L⁻¹.

Uyeta y colaboradores (1981), estudiaron hidrolizados de infusiones de té verde y té negro, extraídos con solventes polares e informaron mutagenicidad en ausencia y presencia de activación metabólica para la cepa TA98, atribuyendo el efecto a la presencia de flavonoides como la quercetina (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) y el kaempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone), presentes también en yerba mate (Chandra y De Mejía, 2004).

Sannomiya y colaboradores (2007), han encontrado el mismo resultado en extractos polares de hoja de *Byrsonima intermedia*¹, atribuyendo la acción mutagénica a la quercetina.

¹*Byrsonima intermedia*, especie nativa de la formación del cerrado (sabana de América tropical), utilizada en Brasil como planta medicinal para el tratamiento de fiebre, úlceras, infecciones de piel. También es usada como diurético y antiasmático.

La quercetina es un compuesto que ha sido producto de numerosos estudios de toxicidad y carcinogenicidad.

A pesar de su bien probada actividad sobre el daño genético en varios ensayos (mutaciones reversas, inducción de funciones SOS, inducción de intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y formación de micronúcleos), los mecanismos por los cuales la quercetina produce el daño genético son desconocidos (Gaspar y col. 1994). Rietjens y colaboradores (2005) también informaron propiedades mutagénicas de la quercetina en varios ensayos de mutagenicidad en bacterias y células de mamíferos, los cuales son relacionados con estructura de quinona.

El kaempferol es un flavonoide ampliamente distribuido en plantas comestibles y se ha demostrado su genotoxicidad en células de ovario de jamster Chino V79, en ausencia de activación metabólica. En presencia de un sistema de metabolización externo, como el homogenato de hígado de rata (S9 mix), se produjo un aumento en su genotoxicidad que fue atribuido a la biotransformación de kaempferol a quercitina a través del sistema P450 (CYP) mono-oxigenasa (Duarte Silva y col., 1997).

Por lo expuesto se sugiere que los favonoides quercetina, rutina y kaempferol podrían hallarse concentrados en el extracto acetónico (Chebil y col., 2007), siendo responsables de los efectos mutagénicos observados en el extracto, sin y con activación metabólica. Es esperable que la mutagenicidad de estos compuestos en el extracto acuoso se manifieste en menor medida, debido a su baja concentración.

La biotransformación de kaempferol a quercitina podría explicar el aumento del efecto mutagénico en presencia de S9 mix (Duarte Silva y col., 1997).

Los resultados encontrados en los ensayos realizados con la cepa TA100 indicaron que en el extracto acetónico de la hoja de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* no habría sustancias que induzcan la actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella Microsoma por el mecanismo de sustitución de pares de bases para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

- Conclusión

El extracto acetónico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* presenta actividad mutagénica a través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, debido a su acción sobre la cepa TA98. Este efecto podría atribuirse a la presencia principal de flavonoides como la quercetina y el kaempferol. El aumento significativo de la actividad mutagénica en presencia de S9 mix podría deberse a la biotransformación (activación) del

kaempferol a quercetina a través del sistema P450 (CYP) mono-oxigenasa (Duarte Silva y col., 1997).

5.1.4. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en los extractos acuoso, clorofórmico y acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin y con activación metabólica

Al comparar los tres extractos (acuoso, clorofórmico y acetónico) de las hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* se observó que todos presentaban actividad mutagénica a través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, debido a su acción sobre la cepa TA98. Este resultado en el extracto acuoso podría atribuirse a la presencia de altas concentraciones de polifenoles como los cafeoil derivados, principalmente el ácido clorogénico en presencia de Mn^{+2} y flavonoides como la quercetina y el kaempferol, estimulando su acción a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). También podría contribuir a la mutagenicidad la presencia de cafeína. Las enzimas microsomales presentes en los ensayos con S9 mix modificarían algunos de estos compuestos generando un efecto desactivador global de la mutagenicidad a altas concentraciones.

La Tabla 5.28 muestra los parámetros de las curvas de dosis-respuesta llevadas a cabo sobre los extractos acuoso, clorofórmico y acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, con las cepas TA98 y TA100, en ausencia y presencia de activación metabólica.

La cafeína y la teobromina se encontrarían concentradas en el extracto clorofórmico debido a su mayor afinidad por este disolvente. También podrían contribuir a la actividad mutagénica la presencia de PAHs como el benzo[a]pireno y el fluoranteno, hallados en muy bajas concentraciones en infusiones de mate, que estarían concentrados en el extracto clorofórmico de yerba mate. Esto se evidencia no sólo en las pendientes de las curvas de linealidad de dosis-respuesta (24.77 para el extracto acuoso y 399.62 para el extracto clorofórmico), sino también en los rangos de dosis en donde se encontró mutagenicidad (4.50 a 20.00 mg/placa para el extracto acuoso y 1.13 a 4.50 mg/placa para el extracto clorofórmico de yerba mate).

El extracto acetónico también presentó mutagenicidad por el mecanismo de desplazamiento del marco de lectura, a muy bajas concentraciones (0.30 a 1.50 mg/placa) y con una pendiente del mismo orden que la del extracto clorofórmico (316,26 revertantes por placa/dosis). Este efecto podría atribuirse a la concentración de flavonoides como la quercetina, la rutina y el kaempferol en el extracto orgánico. El aumento significativo de la actividad mutagénica en presencia de S9 mix podría deberse a la biotransformación del kaempferol a quercetina a

través del sistema P450 (CYP) mono-oxigenasa (Duarte Silva y col., 1997). Duarte Silva y colaboradores (1997) también plantearon que el kaempferol incrementa las aberraciones cromosómicas en células de jamster chino V7927.

El comportamiento del extracto clorofórmico y acetónico frente a S9 mix fue antagónico: en el primero se observó un efecto desactivador de la mutagenicidad y en el segundo una potenciación del mismo. Esto se debe a la selección de los componentes según la afinidad de los compuestos por el solvente, que tendrían distinta respuesta mutagénica frente a S9 mix.

No se observó mutagenicidad en el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* a través del mecanismo de sustitución de pares de bases en el marco de lectura (ausencia de mutagenicidad con la cepa TA100) como indican otros autores (Leitao y Braga, 1994; Fonseca y col., 2001). Esto puede deberse las variaciones de concentración de las sustancias dentro de una misma especie cultivadas en distintos países y a las diferentes condiciones de preparación de los extractos. Esta conclusión se apoyó en el hecho de haber observado mutagenicidad en el extracto clorofórmico en presencia de la cepa TA100. Se sugirió la presencia de compuestos policíclicos aromáticos (PAHs), como el benzo[a]pireno y el fluoranteno, que se encontrarían concentrados en el solvente orgánico y que su actividad en el extracto acuoso no se observaría debido a la baja cantidad de los mismos en la infusión teniendo en cuenta sus estructura hidrofóbicas. Las enzimas microsomales presentes en los ensayos con S9 mix modificarían estos compuestos potenciando su acción mutagénica en el extracto clorofórmico.

Las respuestas positivas en el sistema Salmonella/microsoma, también pueden estar relacionadas a la acción conjunta de dichos compuestos como un todo, donde las interacciones entre los efectos mutagénicos, pueden conducir a respuestas muy específicas de cada una de las mezclas complejas de que están constituidos los extractos.

Estos estudios deben ser complementados con otros que involucren el estudio de los compuestos presentes en cada uno de los extractos. En este sentido, la determinación de los compuestos mediante técnicas de separativas HPLC-DAD permitirá responder a las hipótesis propuestas referidas a los efectos mutagenicos observados. Adicionalmente, estos extractos sometidos a separación mediante columnas preparativas específicas permitiría obtener las diferentes fracciones de cada extracto y ser sometidos luego a la evaluación del ensayo de mutagénesis *in vivo*. Asimismo, debe complementarse estos estudios con la evaluación de la actividad antioxidante de los diferentes extractos.

Tabla 5.28: Parámetros de las curvas de dosis-respuesta llevadas a cabo sobre los extractos acuoso (YPP), clorofórmico (YPP_{cl}) y acetónico (YPP_{acet}) de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, con las cepas TA98 y TA100, sin y con S9mix

| Linealidad dosis-respuesta | Cepa TA98 | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|------------|---|------------|--|------------|
| | Extracto Acuoso YPP | | Extracto Clorofórmico YPP _{cl} | | Extracto Acetónico YPP _{acet} | |
| | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix |
| a | 197,89 | 389,72 | -266,50 | 96,73 | -7,52 | 32,20 |
| b | 24,77 | 13,30 | 399,62 | 126,38 | 316,26 | 1776,40 |
| r ² | 0,977 | 0,959 | 0,995 | 0,995 | 0,989 | 0,992 |
| Rango de concentración (mg/placa) | 4.50-20.00 | 4.50-20.00 | 1.13-4.50 | 0.45-4.50 | 0.30-1.50 | 0.20-0.80 |

| Linealidad dosis-respuesta | Cepa TA100 | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|------------|---|------------|--|------------|
| | Extracto Acuoso YPP | | Extracto Clorofórmico YPP _{cl} | | Extracto Acetónico YPP _{acet} | |
| | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix |
| a | - | - | 239,50 | 455,60 | - | - |
| b | - | - | 6,85 | 13,70 | - | - |
| r ² | - | - | 0,972 | 1,00 | - | - |
| Rango de concentración (mg/placa) | - | - | 15.00-45.00 | 4.50-45.00 | - | - |

a, ordenada al origen (revertantes por placa)

b, pendiente (revertantes por placa/dosis)

r², coeficiente de determinación

Es sabido que la evaluación genotóxica de extractos de plantas debe ser realizada, en primera instancia, mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, que midan el daño en los niveles de: Mutación génica y/o Mutación cromosómica. En dependencia de los resultados *in vitro* debe continuarse, en segunda instancia, con ensayos *in vivo* que respondan a los dos mismos niveles de daño genético que se evaluaron *in vitro*.

5.2 Mutagenicidad *in vivo* de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*: Ensayo de inducción de Micronúcleo en médula osea de ratón

- Origen de los micronucleos

Los micronúcleos son conocidos en el campo de la hematología como cuerpos de Howell-Jolly y su forma es generalmente redonda o almendrada, con un diámetro que varía desde 0.4 a 1.6 micras. Su formación se basa en que en la anafase cualquier fragmento cromosómico

que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas; sin embargo, los elementos rezagados –que pueden ser fragmentos o cromosomas completos– quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas, y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios. Tales núcleos son mucho más pequeños que el núcleo principal, y de ahí su nombre de “micronúcleos” (MN).

La prueba de micronúcleos permite detectar tanto agentes micronucleogénicos clastógenos como aneuploidogénicos.

Un agente clastogénico, origina MN compuestos de fragmentos cromosómicos debido a:

- a) ruptura directa del ADN;
- b) replicación sobre un templete de ADN dañado; o
- c) inhibición de síntesis de ADN

(Albertini y col., 2000; Fenech, 2000).

Los agentes aneuploidogénicos, originan MN con al menos un cromosoma completo o una cromátida; debido a alteraciones en:

- a) el huso mitótico,
- b) el cinetocoro,
- c) centríolo,
- d) centrosoma

(Vanparys y col., 1990; Sullivan y col., 2001, Goshima y col., 2003).

Para determinar el mecanismo por el cual se origina el MN, se han desarrollado dos métodos citogenéticos moleculares, estos identifican la presencia del complejo centrómero-cinetocoro en el MN y de este modo pueden esclarecer el origen del MN. Una técnica es utilizando anticuerpos anticinetocoro (suero de pacientes con una variante de escleroderma) conjugados con un fluorocromo, es decir, tinción con inmunofluorescencia (CREST). En el otro método se usan secuencias de ADN del centrómero y se identifican mediante Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (Krishna y col., 1993, 1994; Norppa y col., 1993; Ding y col., 2003). Cuando se observa un MN con cinetocoro-positivo/centrómero-positivo, el MN esta formado por un cromosoma completo o fragmentos céntricos y aunque estos son raros, pueden ser identificados por una hibridación adicional con secuencias de ADN teloméricas. Si el MN es cinetocoro-negativo/centrómero-negativo; se interpreta que el MN esta formado por fragmentos cromosómicos acéntricos (Hayashi y col., 2000; Krishna y Hayashi, 2000).

También se han utilizado otros métodos tales como: Tamaño del MN (Yamamoto y Kikuchi, 1980), por bandeo C (Verschaeve y col., 1988) o por medición del contenido de ADN (Vanderkerker y col., 1989; Nüsse y col., 1996).

Yamamoto y Kikuchi (1980), determinaron que si el compuesto estudiado es un clastógeno, se forman micronúcleos pequeños, pero si es un aneuploidógeno, se observa la formación de micronúcleos grandes (Fig.5.18).

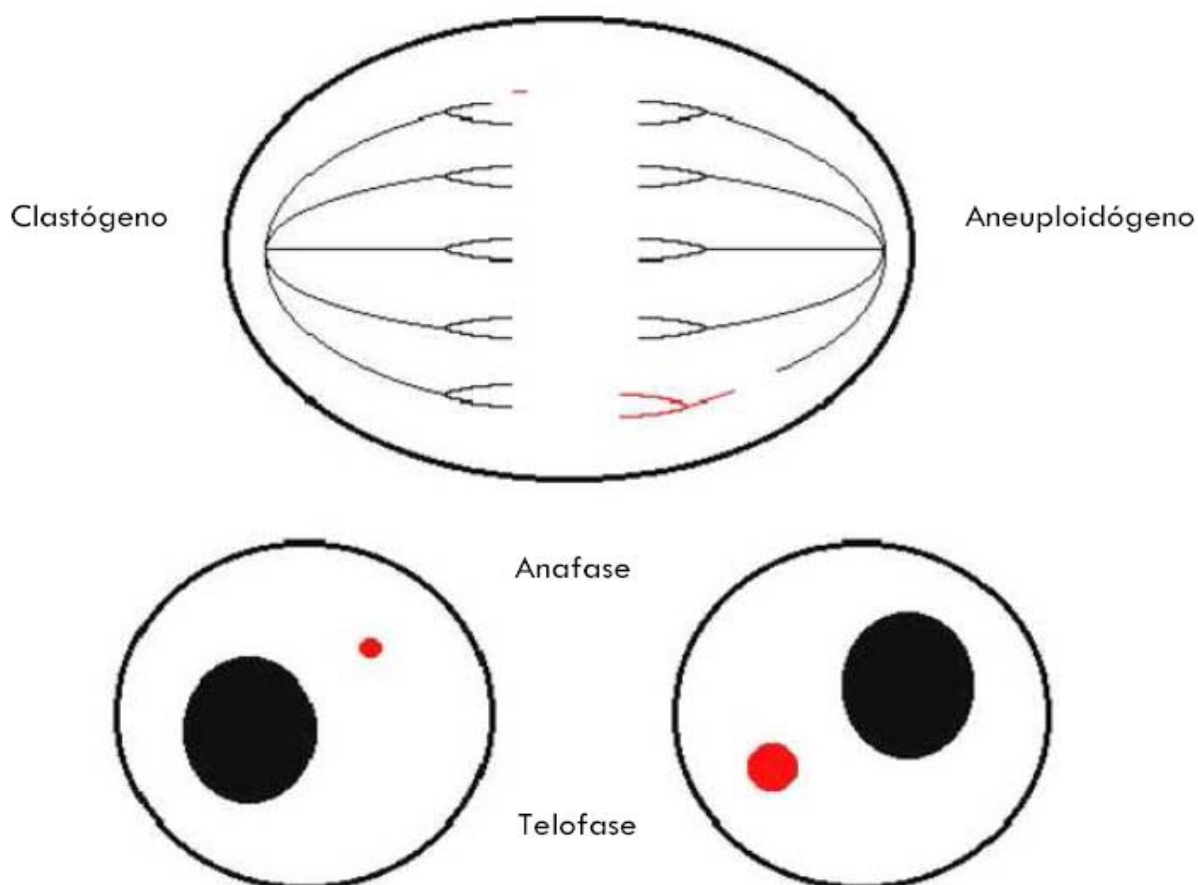


Figura 5.18: Formación de micronúcleos

La Ciclofosfamida (CP), utilizada en el presente ensayo como control positivo, es un fármaco antineoplásico perteneciente al grupo de las cloro-etilaminas que también tiene propiedades inmunosupresoras (Figura 5.19). Perteneció a la familia de los fármacos alquilantes entre los que se encuentran busulfán, clorambucil y melfalán, es activo en la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin, la leucemia linfocítica aguda, el carcinoma de mama, el cáncer de ovario, los cánceres pulmonares y el retinoblastoma. También se ha utilizado para tratar enfermedades inmunológicas como el síndrome nefrótico, la granulomatosis de Wegener, la

artritis reumatoide, la enfermedad injerto contra huésped y el rechazo después de los trasplantes de órganos (Ghozlan y col., 1981; Enns y col., 1999)

Su mecanismo de acción consiste en que es un profármaco que necesita ser activado por el sistema de enzimas microsomales hepáticas para ser citotóxico. Estas enzimas hepáticas convierten la ciclofosfamida en primer lugar a aldofosfamida y 4-hidroxiciclofosfamida, y luego a acroleína y fosforamida, dos potentes sustancias alquilantes con efecto clastogénico sobre el ADN (OECD, 2009; Prieto, 1999). Al reaccionar con la molécula de ADN, los agentes alquilantes forman monoadductos y enlaces cruzados entre las cadenas que impiden la duplicación del mismo y también provocan rupturas por efecto de los mecanismos reparativos aumentando así la aparición de retardos anafásicos en las células somáticas (Gilani y Chatzinoff, 1983, Enns y col., 1999; EPA, 1998).

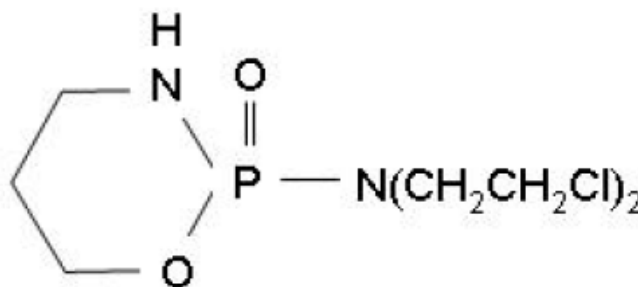


Figura 5.19: Estructura química de la ciclofosfamida

Otro ejemplo de agente clastogénico es la Mitomicina C (MMC), que interactúa covalentemente con el ADN *in vitro* e *in vivo*, es un agente alquilante del ADN (Younghwa y col., 2001), inhibe la síntesis de ADN ocasionando rupturas del mismo y cromosómicas (Dorr, 1988; Tomasz y col., 1986), e induce el intercambio de cromátidas hermanas y MN (Gupta y Sharma, 1981, Ortiz y col., 2004).

Dentro de los agentes aneuploidógenos se encuentra la colchicina (COL), que actúa inhibiendo la polimerización de la tubulina en los microtúbulos (MT), también afecta centríolos y centrosomas (Grawé y col., 1993; Parry y col., 2002; Attia y col., 2003).

- Identificación de micronúcleos

Para identificar los MN por microscopia óptica hay que considerar los siguientes puntos:

- Los MN son morfológicamente idénticos al núcleo principal pero más pequeños,

- El diámetro de MN normalmente varía entre 1/16 y 1/3 del diámetro medio del núcleo principal,
- Los MN no son refractivos y ellos pueden ser distinguidos rápidamente de artefactos como manchas o partículas de la tinción,
- El MN normalmente tienen la misma intensidad de tinción que los núcleos principales, no obstante esta puede ser más intensa (Fenech, 2000; Kirsch-Volders y col., 2000).

Sin embargo, el análisis por microscopía es un proceso tedioso y consume mucho tiempo, debiendo analizar por lo menos 1000 eritrocitos en médula ósea (Schmid, 1975; Hayashi y col., 1992 a y b, 2000; Krishna y Hayashi, 2000), así como enumerar e identificar claramente las células.

Este ensayo sólo puede usarse eficientemente o cuantitativamente en poblaciones de células eucariotas en las cuales se pueda distinguir con facilidad cada división celular, por lo cual, no es conveniente en poblaciones celulares con cinéticas de división descontroladas o desconocidas. Para disminuir esta limitación, se desarrolló el ensayo de micronúcleos con la adición de citocalasina – B (cyt-B), en donde las células que han completado una división nuclear son bloqueadas para evitar el proceso de citocinesis y como consecuencia, las células son fácilmente identificables por su apariencia binucleada. La cyt-B es una sustancia inhibidora de la polimerización de la proteína actina, extraída de *Helminthosporium dematioideum*, requerida para la inhibición de la formación de los microfilamentos que constriñen el citoplasma entre los núcleos hijos durante la citocinesis, por lo cual el uso de esta sustancia permite la acumulación de todas las células en división en el estado binucleado, sin considerar su grado de sincronía y la proporción de las células en división (Channarayappa y col., 1990; Pascoe y col., 1990; Lindholm y col., 1991; Ellard y col., 1993; Falck y col., 1997; Fenech y col., 2000; Rosefort y col., 2004). Así, los micronúcleos son contados en las células binucleadas, lo cual posibilita la comparación confiable del daño cromosómico entre diferentes poblaciones celulares con cinéticas de división distintas.

- Tipos celulares para el ensayo de Micronúcleo

Para la realización de esta prueba es indispensable utilizar un tejido en constante división (Schemezer y col., 1990; Suzuki y col., 1993), pero debe considerarse que en las células con poco citoplasma los micronúcleos no son fácilmente distinguibles de los lóbulos o proyecciones del núcleo normal.

La prueba se realiza en diferentes tipos celulares: eritrocitos policromáticos (PCE)² de la médula ósea (Montero y col., 1999; Arencibia y col., 2011), cultivos de linfocitos de sangre

periférica (Heddle y col. 1978; Herrera, 1992), eritrocitos jóvenes y maduros de la sangre periférica (Zuñiga y col., 1996; Tice y col., 1987), queratinocitos, células de la mucosa bucal (Torres-Bugaim y col., 1998,2004; Montero y col., 2003), hepatocitos de rata (Schemezer y col., 1990), células germinales (Russo y Levis, 1992) y células de descamación de la vagina de la rata (Torres-Bugaim y col., 2004), entre otros.

- Eritropoyesis

En la vida postnatal, los hematíes, los granulocitos, los monocitos y las plaquetas derivan de las células madre localizadas en la médula ósea roja. El origen y maduración de estas células se denomina, respectivamente, eritropoyesis, granulocitopoyesis, monocitopoyesis y megacariocitopoyesis.

Todas las células de la sangre derivan de un único tipo celular de la médula ósea roja, llamado por ello célula madre totipotencial. Estas células proliferan y forman dos linajes: el de las células linfoides, que van a formar linfocitos, y el de las células mieloides, que originan en la propia médula los granulocitos, eritrocitos, monocitos y plaquetas. Las células madre linfoides y mieloides se llaman células madre pluripotenciales (Fawcett, 1995).

La proliferación de las células madre pluripotenciales origina células hijas con menor potencialidad. Estas células hijas son las células progenitoras uni o bipotenciales, que producen las células precursoras (Blastos). Por tanto, la hemopoyesis es el resultado de la proliferación y diferenciación simultáneas de células madre que a medida que se diferencian, van reduciendo su potencialidad. Dependiendo de su grado de madurez, las células eritrocíticas se denominan proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos, eritroblastos ortocromáticos (o acidófilos), reticulocitos o eritrocitos policromáticos (eritrocito joven, PCE) y eritrocitos normocromáticos (eritrocitos maduros o hematíes, NCE).

En el PCE se observa basofilia difusa, la célula recién ha perdido su núcleo pero aún mantiene un tinte azulado y es ligeramente mayor que el NCE. Cuando se tiñen con un colorante supravital como el azul de cresil, revelan un retículo granulofilamentoso (polisomas y retículo endoplasmático), de allí su denominación de “reticulocitos” (Guerrero-García, 1997). Con el colorante de giemsa, éstos se tiñen de un color azul-gris (Heddle y col., 1983), lo que facilita su identificación cuando se pretende contarlos en pruebas de períodos cortos de exposición.

² PCE: también llamados reticulocitos, son formas jóvenes eritrocitarias intermedias que presentan ribosomas en el citoplasma, por esta razón se ven más basófilos con la tinción de giemsa.

Durante la maduración de las células de linaje eritrocítico tiene lugar lo siguiente: el volumen de las células disminuye; la cromatina se vuelve más densa hasta que el núcleo aparece picnótico y finalmente es expulsado de la células; los nucléolos disminuyen de tamaño; se produce una disminución de los poliribosomas y un aumento de hemoglobina en el citoplasma; y la cantidad de mitocondrias disminuye (Junqueira y Carneiro, 1996).

En los roedores la médula ósea y el bazo son órganos hemopoyéticos, en los cuales se lleva a cabo la eritropoyesis, en estos las células madre se encuentran en constante proliferación, pasan por diversas fases de diferenciación y maduración para dar origen a las células de la sangre (Krishna y col., 1994; Hayashi y col., 2000). Durante la etapa de maduración el eritroblasto pierde su núcleo, esto ocurre alrededor de 6 horas después de la última mitosis dando origen a los reticulocitos o eritrocitos policromáticos (PCE), estos permanecen en la médula ósea entre 12 y 24 horas, se caracterizan por contener ARN, además de alto nivel de receptores a transferrina expresado en la superficie de su membrana (Serke y Hund, 1992; Torous y col., 2000). Estos PCE se mantienen un tiempo similar en sangre periférica, donde se desarrollan a eritrocitos maduros (NCE). Estos últimos persisten en la circulación alrededor de 1 mes (Dertinger y col., 1996; Hayashi y col., 2000).

En los Reticulocitos la visualización del MN es facilitada debido a que carecen de núcleo. El proceso de eritropoyesis y el mecanismo de formación de MN *in vivo* se muestra en la Figura 5.20 (Krishna y Hayashi, 2000).

El incremento en la frecuencia de reticulocitos micronucleados (MNPCE) en animales expuestos a agentes químicos o físicos, es indicativo de daño cromosómico. Con el tiempo, los PCE pierden el ARN y los receptores a transferrina y llegan al estado de eritrocitos maduros o normocromáticos (NCE), los cuales contienen mayoritariamente hemoglobina, se encuentran principalmente en la sangre y son un poco más pequeños que los reticulocitos (Hamada y col., 2001; Torous y col., 2000).

Estos dos tipos de eritrocitos teñidos diferencialmente se distinguen claramente en médula ósea, bazo y en sangre periférica (Krishna y Hayashi, 2000), ya sea microscópicamente, por sistemas de análisis de imagen y/o por citometría de flujo (Hamada y col., 2001).

Puesto que la relación $PCE/(PCE + NCE)$ en médula ósea se mantiene constante, alrededor del 50 al 60%, la relación PCE/NCE (Índice de toxicidad, I) es útil para determinar alguna perturbación de la hematopoyesis como resultado de un tratamiento. Un cambio en esta relación (usualmente una depresión en la proporción de PCE), es usada para demostrar la exposición del tejido blanco a la sustancia que se está investigando indicando toxicidad (Bhaskar Gollapudi y McFadden, 1995).

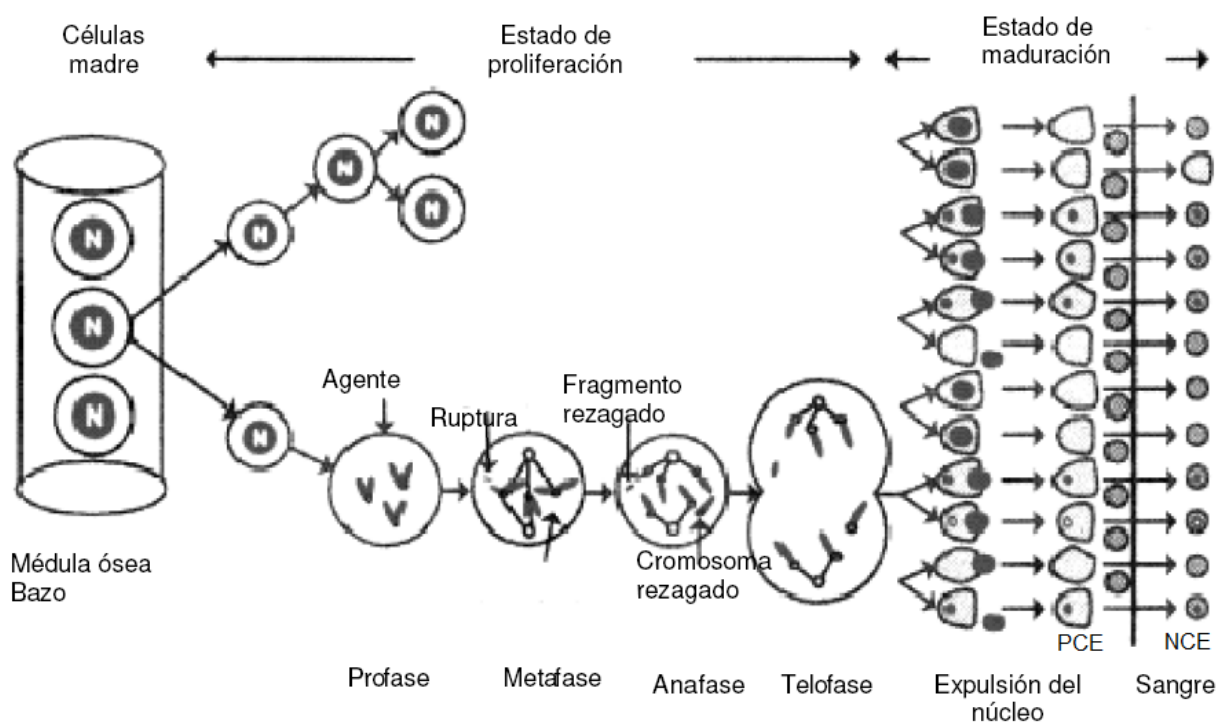


Figura 5.20: Proceso de eritropoyesis *in vivo*. Los MN se forman en células que se dividen rápidamente, como sucede durante la eritropoyesis en las células madre (N) o en el eritroblasto. Los eritrocitos que se están originando, pierden su núcleo y contienen ARN ribosomal y son llamados reticulocitos (PCE) hasta convertirse en los eritrocitos maduros (NCE), que ya han perdido los ribosomas. Sólo los reticulocitos que podrían tener MN inducidos por un reciente tratamiento, lo mantienen en el citoplasma, ya sea por daño en la estructura del cromosoma o del huso mitótico. Adaptado de Krishna y Hayashi (2000).

Dentro de las ventajas de la técnica de micronúcleos se incluyen la facilidad y rapidez, la posibilidad de probar un sólo químico sin otros compuestos, la abundancia de células analizables en diferentes periodos del ciclo celular y el que los micronúcleos formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase (Schmid, 1975; Heddle y col., 1991); además, la prueba no deja lugar a dudas sobre el daño producido, pues lo que se observa como micronúcleos es claramente una pérdida de ADN.

Por otro lado, la prueba no detecta agentes que no producen pérdidas de material genético o rezagos anafásicos y tampoco es útil en poblaciones celulares que no se dividen.

- Ensayo de Micronúcleos en extractos de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*

Los tres extractos acuoso, clorofórmico y acetónico mostraron mutagenicidad frente al ensayo de Salmonella Microsoma. Sin embargo el extracto clorofórmico parece ser aquel donde se

encuentran más concentradas las sustancias responsables de los efectos mutagénicos observados en el ensayo de Salmonella Microsoma ya que se observó mutagenicidad en ambas cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100). Por esta razón se decidió realizar el ensayo de micronúcleo en este extracto orgánico para determinar si los compuestos presentes también son clastogénicos o aneuploidogénicos en el ensayo *in vivo*.

Algunos autores han informado el sexo de los animales ensayados como una variable importante en el test de micronúcleo (Fenech y col, 1994; Zuñiga y col. 2000, 2001a,b), siendo los machos más sensibles que las hembras en la inducción de micronúcleos (Hayashi y col., 1982; CSGMT, 1988). Por esta razón, se trabajó con ratones swiss machos de 10 semanas de edad, de aproximadamente 30 gramos de peso, que fueron distribuidos en 8 grupos de 5 animales. La Tabla 5.29 muestra los pesos promedio de cada grupo de ratones inyectados con los controles negativo, positivo y las dosis del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*. Los números de jaula, los colores (rojo o verde) y la cantidad de marcas (1 a 5) pintadas en las colas de los ratones, fueron las formas de identificación que se utilizaron para establecer el tipo de sustancia que se le debía inyectar a cada ratón en particular.

Se utilizó la vía intraperitoneal (i.p.) como vía de administración ya que la misma no presenta factores modificadores de el o los compuestos presentes en el extracto clorofórmico.

Un grupo se utilizó como control positivo y otro como control negativo. El control positivo fue inyectado con Ciclofosfamida (50.0 mg/kg p.c.). El control negativo fue inyectado con solución isotónica de NaCl al 0.9%. Como vehículo se empleó aceite de maíz virgen.

Tres grupos de ratones se inyectaron con dosis crecientes de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (500, 1000 y 2000 mg/kg p.c.) y los tres restantes con las mismas concentraciones pero de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa*.

Los animales se distribuyeron en 4 cajas enumeradas, con 10 ratones cada una, correspondiente a dos grupos, se les hizo una cama con aserrín que se cambiaba cada 48 horas y tenían acceso a agua y alimentación comercial (Nestle Purina, Argentina) sin restricciones. Se mantuvieron en un ambiente adecuado con temperatura controlada de 22 ± 3 °C y un ciclo de luz- oscuridad de 12 por 12 hs.

La administración se realizó según lo planteado en la Guideline 474 de la OECD Mayo 1983 realizando 5 aplicaciones separadas unas de otras por un tiempo de 24 hs. Pasado el período de tratamiento, se realizó el sacrificio 24 hs después por dislocación cervical en previa atmósfera de éter. Se separaron los fémures de cada ratón para obtener su médula ósea, y se

hicieron extendidos de sus células en portaobjetos tiñiéndolas con Giemsa al 5% según el método descrito por Schmid (1975).

El material en los portaobjetos se analizó mediante un microscopio óptico de campo claro con un aumento de 1000X.

La presencia de eritrocitos policromáticos micronucleados fue contada visualmente sobre 2000 eritrocitos policromáticos por animal (MNPCE).

Las células eran consideradas micronucleadas cuando contenían corpúsculos de cromatina claramente definidos y el teñido gris azulado basófilo (Schmid, 1975). Para evaluar el efecto citotóxico del tratamiento, se determinó la relación entre PCE y NCE en la misma muestra, donde se contaron un mínimo de 500 eritrocitos por animal.

Tabla 5.29: Peso de ratones utilizados en el ensayo de Micronúcleo antes de ser inyectados con el Control negativo, el control positivo y las dosis de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (en gramos de peso corporal).

| Jaula 1 | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--|
| Control negativo | | | Control Positivo | | |
| | Sol. Fisiológica (NaCl 0.9%) | | | Ciclofosfamida (50.0 mg/kg p.c.) | |
| Cantidad de marcas en ratón | Peso (g) | Cantidad de marcas en ratón | Peso (g) | | |
| 1 | 24.5 | 1 | 28.2 | | |
| 2 | 27.1 | 2 | 26.1 | | |
| 3 | 26.2 | 3 | 26.6 | | |
| 4 | 25.3 | 4 | 27.4 | | |
| 5 | 25.2 | 5 | 27.3 | | |
| ($\bar{x} \pm SD$) | 25.7 ± 1.0 | ($\bar{x} \pm SD$) | 27.1 ± 0.8 | | |

| Jaula 2 | | | | Jaula 3 | |
|---|-----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------|
| <i>Ilex paraguariensis</i> (extracto clorofórmico) | | | | | |
| | 2000 mg/kg p.c. | | 1000 mg/kg p.c. | | 500 mg/kg p.c. |
| Cantidad de marcas en ratón | Peso (g) | Cantidad de marcas en ratón | Peso (g) | Cantidad de marcas en ratón | Peso (g) |
| 1 | 31.5 | 1 | 28.9 | 1 | 28.8 |
| 2 | 30.4 | 2 | 28.4 | 2 | 25.3 |
| 3 | 27.3 | 3 | 28.6 | 3 | 24.7 |
| 4 | 32.8 | 4 | 31.1 | 4 | 27.1 |
| 5 | 26.7 | 5 | 28.2 | 5 | 26.6 |
| ($\bar{x} \pm SD$) | 29.7 ± 2.7 | ($\bar{x} \pm SD$) | 29.0 ± 1.2 | ($\bar{x} \pm SD$) | 26.5 ± 1.6 |

Arencibia y colaboradores (2009) evaluaron y compararon la frecuencia de micronúcleos espontáneos e inducidos por el mutágeno ciclofosfamida en ratones de ambos sexos de las líneas Balb-C, OF-1 y C57/BL6/cenp, mediante ensayos de micronúcleo en médula ósea. Ellos determinaron la frecuencia basal o espontánea de micronúcleos de médula ósea utilizando un control negativo al que no se le administró ninguna sustancia y un grupo inyectado con cloruro de sodio al 0.9% (solución fisiológica, 2 mL/kg). Para investigar la frecuencia de micronúcleos inducida, administraron como control positivo, el mutágeno de referencia ciclofosfamida (CP) por vía intraperitoneal (50 mg/kg). La Tabla 5.30 muestra las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las frecuencias de aparición de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratones de las líneas C57/BL6/cenp, Balb-C y OF-1 entre el control negativo y la ciclofosfamida.

La Tabla 5.31 muestra la cantidad de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE) hallados en los extendidos de médula ósea de los ratones swiss tratados con el extracto cloroformico. Se determinó el recuento total de 10000 eritrocitos policromáticos (PCE) (2000 PCE contados por animal) y el índice de toxicidad (I) determinado por la relación PCE/NCE en un recuento total de 500 eritrocitos por animal.

Tabla 5.30: Número total de eritrocitos policromáticos (PCE), normocromáticos (NCE), índice de citotoxicidad (PCE/NCE) y porcentaje de PCE con micronúcleo (MNPCE) en médula ósea de ratones C57/BL6/cenp, Balb-C y OF-1 no inyectados (control negativo) e inyectados con solución fisiológica (NaCl 0.9%) y ciclofosfamida (CP)^a.

| Ratones C57/BL6/cenp | | | | | |
|-----------------------------|----|---------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Grupo | n | PCE | NCE | PCE/NCE | MNPCE (%) |
| MACHOS | | | | | |
| Control negativo | 10 | 1056.0 ± 11.2 | 944.0 ± 11.2 | 1.12 ± 0.02 | 0.18 ± 0.02 |
| NaCl 0.9% | 10 | 1066.0 ± 26.3 | 934.0 ± 26.3 | 1.14 ± 0.03 | 0.21 ± 0.04 |
| CP (50 mg/kg) | 10 | 970.0 ± 22.4 ^b | 1030.0 ± 22.4 ^b | 0.94 ± 0.07 ^b | 1.73 ± 0.81 ^b |
| HEMBRAS | | | | | |
| Control negativo | 10 | 1046.0 ± 10.0 | 954.0 ± 10.0 | 1.10 ± 0.02 | 0.20 ± 0.01 |
| NaCl 0.9% | 10 | 1042.0 ± 20.1 | 958.0 ± 20.1 | 1.09 ± 0.03 | 0.21 ± 0.01 |
| CP (50 mg/kg) | 10 | 963.0 ± 19.7 ^b | 1037.0 ± 19.7 ^b | 0.93 ± 0.04 ^b | 1.78 ± 0.81 ^b |
| Ratones Balb C | | | | | |
| Grupo | n | PCE | NCE | PCE/NCE | MNPCE (%) |
| MACHOS | | | | | |
| Control negativo | 15 | 1081.0 ± 13.0 | 919.0 ± 13.0 | 1.18 ± 0.01 | 0.16 ± 0.03 |
| NaCl 0.9% | 15 | 1087.0 ± 20.0 | 917.0 ± 20.0 | 1.19 ± 0.04 | 0.18 ± 0.04 |
| CP (50 mg/kg) | 15 | 933.0 ± 21.3 ^b | 1067.0 ± 21.3 ^b | 0.87 ± 0.03 ^b | 1.82 ± 0.89 ^b |
| HEMBRAS | | | | | |
| Control negativo | 15 | 1069.0 ± 14.9 | 931.0 ± 14.9 | 1.15 ± 0.05 | 0.13 ± 0.04 |
| NaCl 0.9% | 15 | 1086.0 ± 22.1 | 914.0 ± 22.1 | 1.19 ± 0.04 | 0.17 ± 0.07 |
| CP (50 mg/kg) | 15 | 922.0 ± 19.8 ^b | 1078.0 ± 19.8 ^b | 0.85 ± 0.02 ^b | 1.65 ± 0.77 ^b |
| Ratones OF-1 | | | | | |
| Grupo | n | PCE | NCE | PCE/NCE | MNPCE (%) |
| MACHOS | | | | | |
| Control negativo | 15 | 1067.0 ± 12.9 | 933.0 ± 12.9 | 1.14 ± 0.01 | 0.18 ± 0.01 |
| NaCl 0.9% | 15 | 1071.0 ± 25.1 | 929.0 ± 25.1 | 1.15 ± 0.05 | 0.21 ± 0.05 |
| CP (50 mg/kg) | 15 | 953.0 ± 20.5 ^b | 1047.0 ± 20.5 ^b | 0.91 ± 0.06 ^b | 1.89 ± 0.61 ^b |
| HEMBRAS | | | | | |
| Control negativo | 15 | 1055.0 ± 11.2 | 945.0 ± 11.2 | 1.12 ± 0.03 | 0.16 ± 0.05 |
| NaCl 0.9% | 15 | 1062.0 ± 22.8 | 938.0 ± 22.8 | 1.13 ± 0.05 | 0.14 ± 0.04 |
| CP (50 mg/kg) | 15 | 947.0 ± 18.9 ^b | 1053.0 ± 18.7 ^b | 0.89 ± 0.02 ^b | 1.78 ± 0.58 ^b |

^a, Adaptado de Arencibia y col. 2003

^b, P< 0.05 (Comparación con el control negativo, ANOVA)

El control negativo usando NaCl 0.9% dio un valor de índice de toxicidad (0.97) similar al encontrado por otros autores para ratones de distintas líneas celulares sin ser inyectados o inyectados con NaCl 0.9% (P>0.05) (Lima y col., 2003, Arencibia y Fernandez, 2009). Esto significa que la solución fisiológica administrada no alteró la fase normal de diferenciación,

proliferación y maduración de las células en la médula ósea, de esta misma forma se comportó el índice de genotoxicidad (MNPCE %), el cual mostró un valor del índice de toxicidad de 0.22.

La administración de ciclofosfamida (50.0 mg/kg p.c.) modificó de forma desfavorable ambos indicadores (I=0.84 y MNPCE%=1.23). Pudo observarse un efecto clastogénico y citotóxico debido al aumento de la formación de micronúcleos (118 MNPCE respecto 21 MNPCE en el control negativo) y favoreciendo la formación de los llamados retardos anafásicos, existiendo diferencias significativas respecto del control negativo con NaCl 0.9% (P<0.05).

La Figura 5.21 muestra la presencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de un ratón inyectado con el control positivo. Sólo se observaron micronúcleos pequeños, correspondientes a un efecto clastogénico.

Tabla 5.31: Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE) en médula ósea de ratón e índice de toxicidad (I) de grupos de 5 ratones tratados con un control negativo (NaCl 0.9%), un control positivo (ciclofosfamida 50.0 mg/kg p.c.) y tres concentraciones de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*.

| TRATAMIENTO | PCE | NCE | I=PCE/NCE | PCE contados | MNPCE (N°) | MNPCE (%) |
|--|--------------------------|--------------------------|-------------------|--------------|------------------|-------------------|
| NaCl 0.9% | 247.0 ± 13.5 | 253.0 ± 13.5 | 0.97 | 9586 | 21 | 0.22 |
| CP ^a | 228.0 ± 9.3 ^b | 272.0 ± 9.3 ^b | 0.84 ^b | 9632 | 118 ^b | 1.23 ^b |
| <i>Ilex paraguariensis</i> (ext. clorofórmico) | | | | | | |
| 500 mg/kg | 258.0 ± 15.2 | 242.0 ± 15.2 | 1.07 | 10000 | 22 | 0.22 |
| 1000 mg/kg | 243.0 ± 19.1 | 257.0 ± 19.1 | 0.94 | 9863 | 24 | 0.23 |
| 2000 mg/kg | 248.0 ± 15.7 | 252.0 ± 15.7 | 0.98 | 9789 | 39 ^b | 0.40 ^b |

^a CP, Ciclofosfamida, 50.0 mg/kg peso corporal, control positivo

^b, P < 0.05

PCE, Eritrocitos policromáticos en 500 eritrocitos; NCE, Eritrocitos normocromáticos; I, Índice de toxicidad

Valores de PCE y NCE promedio ± desviación estándar

No hubo un aumento significativo (P>0.05) en el número de eritrocitos policromáticos micronucleados ni en el índice de toxicidad en la médula ósea de los ratones inyectados con 500 y 1000 mg/kg p.c. de extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* respecto del control negativo. Sin embargo hubo un aumento significativo en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados contados (39 MNPCE) para el grupo de ratones inyectados con 2000 mg/kg p.c. de extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* respecto del control negativo (P<0.05).

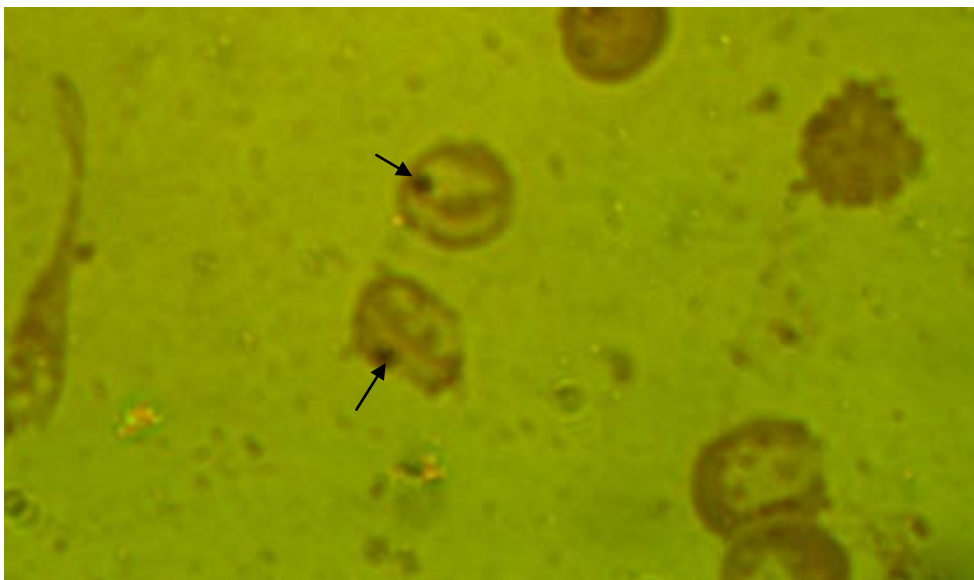


Figura 5.21: Micronúcleo encontrado en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón inyectado con ciclofosfamida (50.0 mg/kg) como control positivo (foto en microscopio óptico a 1000X de aumento).

La Figura 5.22 muestra la presencia de un micronúcleo en un eritrocito policromático de médula ósea de un ratón inyectado con 2000 mg/kg p.c. de extracto clorofórmico de hojas de yerba mate.

El daño genético por ruptura cromosómica genera cromosomas estructuralmente anormales, o anomalías del huso que llevan a la formación de micronúcleos. La incidencia de los mismos es un indicador de estos tipos de daño (clastógenos).

Teniendo en cuenta los criterios de positividad establecidos en Materiales y Métodos sección 4.5.5., no se podría afirmar que el aumento en la frecuencia de MNPCE evidencie un efecto clastogénico o de disrupción del huso, ya que no se ha podido demostrar una relación dosis-respuesta, por lo tanto no es concluyente la presencia de daño cromosómico inducido.

No se observaron cambios respecto del control negativo en el índice de toxicidad ($I_{2000\text{mg/kg ext clorof}}=0.98$ respecto de $I_{\text{NaCl}0.9\%}=0.97$, $P>0.05$) y no hubo un cambio en la frecuencia de eritrocitos policromáticos en animales tratados para esta última dosis, indicando que de haber acción clastogénica del extracto, éste no produciría alteraciones en la hematopoyesis con lo cual, su blanco de acción no sería la médula ósea.

Se requeriría hacer un nuevo ensayo usando varias dosis alrededor de 2000 mg/kg p.c. o mayores para confirmar este hallazgo.



Figura 5.22: Micronúcleo encontrado en un eritrocito policromático de médula ósea de ratón inyectado con 2000 mg/kg p.c. de extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (foto en microscopio óptico a 1000X de aumento).

Se han informado estudios sobre las acciones farmacológicas de la infusión de yerba mate en ratas (López Campanher y colaboradores, 2000). Para ello se administró por vía oral 400 mg/kg/día de extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* a ratas de aproximadamente 250 gramos durante 60 días, no indicando cambios fisiológicos o patológicos en los animales que se estudiaron.

Pereira Jotz y colaboradores (2006) realizaron un estudio en tractos aerodigestivos de ratas a efectos de estudiar la incidencia del consumo de mate en el desarrollo de cáncer orofaríngeo, de esófago y laringe a través de la evaluación de las diferencias histológicas de los tractos y de peso de las ratas. Trabajaron con una población de 75 ratas Wistar (250 a 300 g) divididos en 3 grupos de 20 ratas cada uno, que consumieron la infusión de hojas de yerba mate durante 5 meses y un grupo de 15 ratas que consumieron agua sin mate como grupo control. La infusión se preparó en forma tradicional y luego se suministró a los animales a temperatura ambiente. El grupo 1 constituyó mate verde (producto con gránulos finos, que mantiene el sabor amargo, usado por ciudadanos del sur de Brasil), el grupo 2, hoja de mate puro (mate de exportación con baja cantidad de palo) y el grupo 3, mate natural (producto preparado por investigadores con hojas controladas en origen con un ambiente intermedio entre los dos productos anteriores). Luego de realizar la eutanasia de las ratas pasados los 5 meses, realizaron el estudio de tejidos del tracto aerodigestivo incluyendo: tráquea, pulmones, lengua, faringe, esófago, estómago, duodeno y páncreas. El material fue procesado a través de técnicas anatomopatológicas a través del uso de tinciones con colorante hematoxilina-eosina y técnicas inmunohistoquímicas para realizar estudios de anticuerpos. Los animales que

ingirieron la infusión de mate presentaron alteraciones en el tracto aerodigestivo en los exámenes anatomopatológicos, presentando diferencias estadísticamente significativas respecto del control negativo. Sólo se presentó un solo tumor maligno (Mesotelioma de Mediastino) sobre los animales que consumieron la infusión, considerándose el mismo un hallazgo ocasional. También observaron una reducción importante en el peso de las ratas en relación con el grupo control durante el período de estudio, atribuyéndolo a las propiedades diuréticas del mate.

Fonseca y colaboradores (2000) realizaron estudios clastogénicos *in vitro* con linfocitos periféricos humanos e *in vivo* con células de médula ósea de ratas.

Para el ensayo *in vitro* incubaron 100 a 750 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto acuoso de yerba mate de cultivo de sangre entera obtenida por punción venosa de mujeres saludables. Los cultivos de linfocitos humanos se crecieron en Ham's F10 con suero fetal bovino al 25%. Para inducir a los linfocitos periféricos a entrar en el ciclo celular, se usó fitohemaglutinina HA15. El extracto aumentó la frecuencia de metafases con aberraciones cromosómicas en los cultivos de linfocitos. Las aberraciones fueron principalmente ruptura de cromátides (6%) y el índice mitótico (células metafásicas en 1000 células) disminuyó en un 50%. También se observó que la actividad clastogénica no fue suprimida por la presencia de S9 mix, pero el índice mitótico disminuyó en un 42%.

También realizaron el ensayo de inducción de micronúcleos trabajando con ratas macho y hembra Wistar, de 35 a 40 días de vida y con un peso aproximado de 130 g. Colocaron dos ratas por caja plástica con cama de viruta de madera. Se mantuvieron en una habitación tranquila, en condiciones de temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, con ciclos de luz- oscuridad de 12 hs y humedad del 70%. Se les suministró una dieta comercial estándar y agua *ad libitum*. Los animales fueron tratados por vía oral (cánula intragástrica) con el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* (1000 o 2000 mg/kg/día) o con el vehículo (agua destilada) como única dosis o fraccionada durante 4 días consecutivos. Se realizó un grupo control positivo, con una dosis simple de 45 mg/kg de p.c. de ciclofosfamida por vía intraperitoneal. Las muestras fueron tomadas dentro de las 18 a 24 hs luego de la administración de la última dosis del extracto acuoso de la planta, de ciclofosfamida o del vehículo. Los animales fueron anestesiados y sacrificados. Se les administró un inhibidor mitótico como la colchicina una hora antes del sacrificio. Se extrajo la médula ósea de los fémures con una jeringa que contenía buffer fosfato, en donde se dejó suspendida durante 25 minutos. Las células se fijaron al portaobjetos con metanol y ácido acético (3:1) y luego fueron teñidas con Giemsa al 5%. Para el cálculo del índice mitótico, se contaron al menos 1000 células por animal. Los resultados de este

ensayo no mostraron diferencias entre el tratamiento con una única dosis o el fraccionado durante 4 días. La administración de extracto acuoso de yerba mate causó una pequeña reducción en el índice mitótico, indicando la detección de un posible efecto tóxico del mate sobre las células de médula ósea, sin embargo no se demostró una relación de dosis-respuesta. No encontraron otros signos de toxicidad en las ratas tratadas. Las ratas inyectadas con ciclofosfamida mostraron una frecuencia de aberraciones cromosómicas marcada en las metafases examinadas (40-44 %) y los mucronúcleos. Fonseca y colaboradores (2000) sugirieron que la actividad clastogénica hallada en los linfocitos humanos y los signos de toxicidad en el ensayo de micronúcleos podía ser correlacionada con el alto consumo de la infusión y el cáncer de esófago.

Es importante tener en cuenta las distintas condiciones en que se realizaron las investigaciones de Fonseca y colaboradores (2000) respecto del presente trabajo: grupo experimental, vías de administración, tipo de extracto usado, forma de administración, etc (Tabla 5.32).

Tabla 5.32: Cuadro comparativo de las condiciones en que se realizaron los ensayos de micronúcleo y las condiciones en que se realizaron los ensayos de micronúcleos por Fonseca y col. (2000).

| <u>Ensayo de Micronúcleos</u> | <u>Fonseca y col. (2000)</u> | <u>Ensayo realizado</u> |
|--|-------------------------------|----------------------------|
| Grupo experimental | ratas Wistar | ratones Swiss |
| Vías de administración | oral | intraperitoneal |
| Extracto de <i>Ilex paraguariensis</i> | acuoso | clorofórmico |
| Dosis | 1000 y 2000 mg/kg/día | 500, 1000 y 2000 mg/kg/día |
| Vehículo | Agua destilada | Aceite de maíz virgen |
| Administración de dosis | 1 dosis y 4 días consecutivos | 5 días consecutivos |

Las especies animales empleadas en el monitoreo del efecto genotóxico potencial deben considerarse como una fuente importante de variabilidad, como se ha descrito en ciertos agentes genotóxicos específicos de especie. Por ejemplo, los efectos de la radiación de ionización ha sido altamente variable cuando se ensayaba en diferentes especies animales y cepas de laboratorio (Catena y col., 1994) y se han observado distintas respuestas entre diferentes especies de ratas cuando se exponían a agentes químicos como la ciclofosfamida (Hamada y col., 2001). De acuerdo a Simula y Priestly (1992), estos efectos podrían deberse a la influencia de varios factores como la distribución diferencial del compuesto investigado dentro de los tejidos de diferentes especies y cepas de animales usados en los ensayos.

Por su parte, Vargas Alves y colaboradores (2008), evaluaron el potencial clastogénico y/o aneugénico de infusiones de yerba mate en un cultivo de linfocitos humanos utilizando el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis, en ausencia de activación metabólica exógena. Para hacer los cultivos celulares de linfocitos, obtuvieron sangre periférica de tres dadores femeninos saludables. Los cultivos fueron tratados con infusiones de mate (filtradas a través de filtros estériles de 0.22 μm), agua destilada (control negativo) y 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de bleomicina (control positivo). En cada experimento se contaron 3000 células binucleadas de dos cultivos independientes (1000 células de cultivos replicados) para buscar la presencia de micronúcleos. No hallaron diferencias significativas entre las concentraciones de infusión de *Ilex paraguariensis* observadas: 1400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0.001 ± 0.002), 700 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0.0006 ± 0.0015), 350 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0.002 ± 0.002), 175 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0.002 ± 0.003) y el control negativo (0.001 ± 0.001). Estos hallazgos indicaron que no habría actividad clastogénica y/o aneugénica de las infusiones de mate en los ensayos con células binucleadas de linfocitos humanos, a diferencia de lo hallado por Fonseca y colaboradores (2000).

Wnuk y colaboradores (2009) evaluaron la actividad citotóxica y genotóxica en infusiones de yerba mate en linfocitos periféricos humanos *in vitro* para esclarecer los hallazgos contradictorios encontrados por Fonseca y col. (2000) y Vargas Alves y col. (2008). Usaron concentraciones de extracto de la infusión en un rango de 1 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Considerando que uno de los compuestos mayoritarios del mate es la cafeína, realizaron también dicho ensayo con este compuesto puro en las mismas concentraciones. Prepararon la infusión con una marca comercial de yerba mate (Argentina) mediante el hervor durante 10 minutos de 200 gramos de producto por litro y filtraron por filtro Millipore de 0.22 μm . Para el cultivo utilizaron linfocitos de sangre humana proveniente de dadores hombres, en buen estado de salud. Realizaron ensayos de citotoxicidad con la tinción de naranja de acridina-bromuro de etidio en microscopio de fluorescencia, de daño cromosómico a través del ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN) determinando la frecuencia de micronúcleos y el índice de proliferación celular (NDI)³ y de hibridación *in situ* de fluorescencia usando una sonda específica para cromosomas acrocéntricos (FISH). Esta última técnica, es muy útil acoplada al ensayo de micronúcleos, dado que permite discriminar el origen de los MN. La base metodológica de esta técnica requiere la desnaturalización (rotura de los enlaces que unen la doble hélice del ADN) tanto del ADN de la muestra como del ADN de la sonda a utilizar (complementaria al fragmento de ADN que se desea estudiar). Encontraron que para 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de mate aumenta significativamente la frecuencia de micronúcleos y disminuye el valor de NDI. A concentraciones entre 100 y 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, el

mate fue responsable de un aumento de las células necróticas y apoptóticas. El número de micronúcleos cayó cuando se usaron concentraciones mayores de la infusión (100 y 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), esto se debió a la elevada cantidad de necrosis y apoptosis. Habiendo demostrado genotoxicidad en linfocitos humanos, emplearon la técnica FISH con una sonda comercial para la mayoría de los cromosomas acrocéntricos segregados en forma incompleta con el fin de distinguir entre efectos clastogénicos y aneuploidogénicos del extracto.

Ellos encontraron actividad aneuploidogénica en la infusión de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ que simultáneamente mostró ser un potente inductor de la formación de micronúcleos. La cafeína, xantina más importante encontrada en el mate, ha mostrado diferentes efectos sobre células de mamífero según la concentración usada y el tipo de célula en la que fue ensayada. Los mecanismos de estos efectos aún no se conocen. Se ha mostrado, principalmente en células cancerígenas, que la cafeína a altas concentraciones (4-10 mM) puede inducir apoptosis y por lo tanto efectos anticarcinogénicos (Jang y col., 2002; Gururajanna y col., 1999). Los efectos benéficos de la cafeína en la terapia anticancer pueden deberse, al menos en parte, a la actividad inhibitoria de las topoisomerasas por este compuesto, llevando a la inhibición de la división celular y simultáneamente a su actividad inhibitoria en la reparación de ADN, mejorando así el potencial citotóxico de las drogas anticancer y la radiación. Los efectos de la cafeína fueron también estudiados en células no tumorales y se encontró que puede actuar como antioxidante o inductor de la apoptosis según la concentración aplicada (Fernandez y col., 2003; Jafari y Rabbani, 2000).

Teniendo en cuenta que la infusión de yerba mate y la cafeína sola pueden mostrar actividades biológicas similares, Wnuk y colaboradores (2009) encontraron actividad citotóxica y genotóxica mayor en cafeína que en mate para una misma concentración, indicando que los efectos del mate podrían deberse, al menos en parte, a la cantidad de cafeína que contiene la infusión.

Considerando los resultados encontrados en los ensayos de mutagenicidad, donde el efecto mutagénico del extracto clorofórmico de hojas de yerba mate para TA98 se potenció respecto del visto en el extracto acuoso, se podría pensar que en este ensayo *in vivo*, la o las sustancias responsables de la mutagenicidad se encuentran concentradas en el extracto clorofórmico y

³NDI=[1N + (2 x 2N) + (4 x >2N)]/400. Donde 1N es el número de células con 1 micronúcleo, 2N con 2 micronúcleos y >2N con más de dos micronúcleos. Mide la capacidad proliferativa de los linfocitos.

podrían generar un efecto clastogénico (y no aneuploidogénico como el encontrado por Wnuk y col.,2009) a muy altas concentraciones como el visto en los ratones inyectados con 2000 mg/kg p.c., si se confirmara la relación dosis- respuesta. Por lo expuesto, una de las sustancias responsables de este efecto podría ser la cafeína.

A todo esto debe tenerse en cuenta que valores de dosis 2000 mg/kg p.c. de extracto acuoso y más aún, de extracto clorofórmico de yerba mate, son cantidades extremadamente altas cuando se comparan con la ingesta diaria humana. En el caso de un extracto acuoso, donde la extracción es de aproximadamente 11.5% (Fonseca y col. 2000), tomando como referencia una persona de 70 kg, la dosis mencionada se corresponde a una ingesta – como dosis simple- de una infusión de mate hecha con 1.2 kg de hojas de yerba mate secas. Si se usan generalmente 70 gramos de hojas para preparar mate un 100 ml de agua caliente, se requerirá ingerir 5.8 litros de infusión por día.

- Conclusión

Los ensayos de mutagenicidad *in vivo* realizados en el extracto clorofórmico mostraron una posible actividad clastogénica en concentraciones de 2000 mg/kg p.c. aunque no se pudo demostrar la relación lineal de dosis-respuesta. La sustancia principal responsable de esta actividad podría ser la cafeína, concentrada en este extracto. Otros autores como Wnuk y colaboradores (2009) han hallado mutagenicidad en linfocitos humanos para extractos acuosos de yerba mate y cafeína sola, atribuyendo su acción en la infusión a esta última.

Considerando que también se halló mutagenicidad en el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sería importante también realizar un ensayo de mutagenicidad *in vivo* en dicho extracto. Estudios *in vivo* mostraron que la quercetina, compuesto soluble en este extracto (Chebil y col.,2007) causa daño en las células germinales de ratas (Rastogi y Levin, 1987) y en médula ósea de ratón (Sahu y colaboradores, 1981). Sin embargo Caria y colaboradores (1995) no confirmaron la inducción de micronúcleos en las células de médula ósea y sugirieron dos hipótesis para explicar el por qué la quercetina no aumenta la frecuencia de eritrocitos policromáticos en células de médula ósea: los eritrocitos contienen altas cantidades de catecol-*O*-metiltransferasa o la médula ósea no es el blanco principal de la quercetina.

Por otra parte, hay investigaciones que demuestran que la quercetina presenta actividad inhibitoria contra algunos mutágenos indirectos, como el compuesto 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo-[4,5-*b*] piridina (PhIP) y el 2-Amino-3,4-dimetilimidazo [4,5-*f*]quinolina

(MeIQ) (Malaveille y colaboradores, 1996; Oguri y colaboradores, 1998) y mutágenos directos como la mitomicina C (Ündeger y colaboradores, 2004).

En este trabajo se ha mostrado que los extractos acuosos y orgánicos de yerba mate contienen sustancias mutagénicas y posiblemente clastogénicas en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* que pueden traer consecuencias nocivas para la salud ante un consumo alto y persistente de la infusión. Otros autores como Leitao y Braga (1994) y Fonseca y colaboradores (2000) también han demostrado estos efectos en extractos acuosos de la planta. Además, estudios epidemiológicos realizados en Sudamérica relacionan el consumo de mate por día y la frecuencia con el cáncer esofágico y de otros tipos. Es importante recordar que el mate es una infusión caliente de *Ilex paraguariensis*, donde el calor puede producir lesiones esofágicas (Victoria y col. 1987). Sin embargo, el presente trabajo sugiere que la injuria térmica no es la única causa determinante de la generación de cáncer esofágico y orofaríngeo sino también las sustancias que contiene la bebida caliente.

Por consiguiente es necesario considerar el posible potencial tóxico de estas plantas y establecer una metodología para la protección de la población. Sería necesario obtener respuesta en el ámbito de la salud para regular su consumo masivo e indiscriminado.

5.3 Ensayo de Antimutagenicidad en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*

La identificación de antimutágenos (y por inferencia, anticarcinógenos) ofrece buenas perspectivas para contrarrestar la acción inevitable de mutágenos conocidos y desconocidos, presentes en el ambiente o en productos antropogénicos. La búsqueda de estos antimutágenos se ha concentrado en las plantas y sus productos, suponiendo que tales sustancias naturales pueden ser capaces de reducir el riesgo de cáncer por la exposición a mutágenos ambientales y a productos farmacéuticos que si bien son mutágenos, también tienen efectos beneficiosos. Como consecuencia de este interés, hay una extensa literatura sobre la identificación de sustancias antimutagénicas usando químicos puros o extractos de plantas y otros organismos. *Toxline* lista más de 2000 títulos publicados entre 1990 y 1999, y más de 500 artículos desde el año 2000. *Mutation Research* recibe muchos artículos que son a veces contradictorios o basados en protocolos cuestionables y por esta razón no son publicados. Muchos estudios han informado reducción en el número revertantes inducidos o células con aberraciones cromosómicas como indicador de antimutagenicidad, independientemente de otros efectos que las sustancias ensayadas pueden presentar en el sistema de prueba como la muerte celular o la inhibición mitótica. Algunas sustancias identificadas como antimutágenos en tests

específicos han mostrado ser mutagénicas en el mismo o en otros sistemas de prueba. Como consecuencia de esto, hay estudios publicados que identifican a ciertos químicos como antimutágenos cuando se ensayan contra mutágenos específicos y otros estudios que usan los mismos químicos como mutágenos de referencia cuando se quiere identificar nuevos antimutágenos.

Hay un número de artículos en la literatura, no aceptados para publicación, donde el investigador informaba antimutagenicidad y mutagenicidad en el mismo conjunto de ensayos. Esto es, por ejemplo, que la sustancia era antimutagénica cuando se probaba con un mutágeno en la cepa TA100 de *Salmonella typhimurium* y luego aumentaba la actividad del mismo mutágeno en presencia de la cepa TA98. Hay manuscritos donde el investigador ignora el aumento y sólo se concentra en la disminución, proclamando a la sustancia ensayada como antimutágeno y potencial anticarcinógeno.

De forma similar, hay un número de publicaciones donde el manuscrito ignoraba el hecho que la sustancia, habiendo sido identificada como nuevo antimutágeno, ya había sido establecida anteriormente como mutágeno (en el mismo test o en otros, a veces en la misma publicación) y también había dado resultados de carcinogenicidad positivos. Un ejemplo es el flavonoide quercetina, donde se identificaron en Toxline, en febrero de 2006, 16 publicaciones en las cuales la sustancia se identificaba como antimutágeno contra mutágenos de referencia, dos en los cuales era usada como mutágeno de referencia en experimentos de antimutagénesis y tres donde se detectó propiedades mutagénicas y antimutagénicas dependiendo del protocolo particular del test o las concentraciones usadas. Un artículo que identificó a la quercetina como antimutágeno en una cepa de *Salmonella*, no hizo ningún comentario sobre el hecho que por lo menos una publicación anterior mostró que es mutagénico en otras cepas de *Salmonella* en las concentraciones que eran una décima parte de las concentraciones antimutagénicas. La quercetina también ha sido reportada como carcinogénica y anticarcinogénica en roedores (Zeiger, 2007).

Las publicaciones de Leitao y Braga (1994) y Fonseca y colaboradores (2000) son precedentes de la acción mutagénica presente en los extractos acuosos de hojas de *Ilex paraguariensis*.

Los ensayos de mutagenicidad *in vitro* e *in vivo* en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* realizados en el presente trabajo confirmaron la acción mutagénica y genotóxica en los tres extractos de hojas secas.

Estos hallazgos estarían descartando en forma definitiva la posibilidad de los extractos de las hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* presenten propiedades antimutagénicas.

6. *Ilex dumosa*
var. dumosa

6.1 Ensayo de Salmonella Microsoma en *Ilex dumosa* var. *dumosa*

- Ensayos Preliminares

En cada uno de los ensayos realizados se confirmaron los genotipos de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 a través de las siguientes determinaciones:

- Requerimiento de Histidina: Se observó crecimiento en el medio con histidina- biotina y falta de crecimiento en el control negativo con biotina.
- Mutación rfa: Hubo aparición de una zona clara de inhibición alrededor del disco embebido en solución cristal violeta 1 mg.mL⁻¹.
- Mutación uvrB: Las cepas TA98 y TA100 crecieron sólo en la zona no irradiada, cubierta con una pieza de cartón, mientras que la cepa *Salmonella typhimurium* ATCC 18684 utilizada como control positivo, creció en toda la placa.
- Factor R: Se evidenció la presencia del factor de resistencia a ampicilina en el medio con dicho antibiótico a través del crecimiento de las cepas TA98 y TA100 y la ausencia de crecimiento de la cepa de tipo salvaje ATCC 18684.

- Ensayo de Salmonella Microsoma

Los efectos mutagénicos de los extractos de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* se investigaron utilizando el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación usando cepas de *Salmonella typhimurium* (His⁻) TA98 y TA100, por las mismas razones que las planteadas en el capítulo 5 (sección 5.1).

Con el objetivo de encontrar el valor de dosis en el cual se observa actividad mutagénica, se realizó un primer ensayo usando tres dosis que abarquen tres logaritmos de concentración en cada uno de los extractos: acuoso, clorofórmico y acetónico sobre ambas cepas de *Salmonella typhimurium*.

En una segunda etapa, se identificó aquellas dosis de extractos que mostraron mutagenicidad y se confirmó la misma haciendo nuevamente ensayos que demostraron la relación lineal entre la dosis del extracto, en el orden de concentración seleccionado y la cantidad de revertantes por placa.

En cada grupo de experimentos se confirmó los genotipos de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100. Se hicieron controles de esterilidad en el homogenato de hígado de ratón S9 mix, y los extractos clorofórmicos y acetónicos de las hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* que se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Los mismos mostraron

estar estériles, sin embargo, las soluciones de los extractos acuosos debieron ser esterilizadas por filtración.

6.1.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa*

6.1.1.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin activación metabólica

El ensayo en el extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, se llevó a cabo junto con el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* en ausencia de S9 mix (sección 5.1.1.1), usando así los mismos controles negativos y positivos.

Como investigación preliminar de mutagenicidad en el extracto acuoso, se ensayó un amplio rango de dosis del mismo, empleándose tres concentraciones que variaron entre: 0.45, 4.50 y 45.00 mg/placa, sin activación metabólica, a efectos de evaluar la linealidad de dosis- respuesta y determinar el valor de F.M.

La Tabla 6.1 resume los hallazgos encontrados en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, tratadas con tres concentraciones de extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, en ausencia de S9 mix.

En presencia de la cepa TA98, las tres concentraciones del extracto acuoso de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo sin activación metabólica ($P > 0.05$). Sus F.M. fueron cercanos 1, indicando no ser mutagénicos en esas dosis (Ames y col., 1975). Esto estaría indicando que en el extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no habría sustancias que inducen actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella Microsoma por el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

En presencia de la cepa TA100, las tres concentraciones del extracto acuoso de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo sin activación metabólica ($P > 0.05$) y sus F.M. fueron cercanos a 1, indicando no ser mutagénicos en esas dosis (Ames y col., 1975). Esto evidencia que en el extracto acuoso no habría sustancias mutagénicas cuyo mecanismo de acción sea la sustitución de pares de bases para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

Tabla 6.1: Efecto mutagénico del extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo de preincubación, sin activación metabólica, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

| Agente | | Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix - Preincubación | | | |
|---------------------|----------------------|--|-------------------|---------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YDD | 0.00 mg ^a | 46.0 ± 1.0 | | 191.0 ± 8.0 | |
| YDD | 0.45 mg | 52.0 ± 3.0 | 1.1 | 216.0 ± 14.0 | 1.1 |
| YDD | 4.50 mg | 53.0 ± 2.0 | 1.1 | 221.0 ± 9.0 | 1.2 |
| YDD | 45.00 mg | 54.0 ± 3.0 | 1.2 | 247.0 ± 6.0 | 1.3 |
| 2NF | 2.50 µg | 226.0 ± 16.0 ^b | 4.9 | | |
| SAZ | 1.50 µg | | | 486.0 ± 30.0 ^b | 2.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2NF, 2-Nitrofluoreno; SAZ, Azida de sodio

6.1.1.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, con activación metabólica

El ensayo en el extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, se llevó a cabo junto con el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* en presencia de S9 mix (sección 5.1.1.2), usando así los mismos controles negativos y positivos.

Para la evaluación inicial de la mutagenicidad del extracto acuoso, se realizó el ensayo con tres dosis: 0.45, 4.50 y 45.00 mg sembrados en las placas con activación metabólica para evaluar el rango de linealidad de dosis-respuesta y determinar el F.M.

La Tabla 6.2 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de Salmonella microsoma preincubación de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, tratada con tres logaritmos de concentración de extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, en presencia de S9 mix.

En presencia de TA98, las tres concentraciones del extracto acuoso de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo con activación metabólica

($P > 0.05$). Sus F.M. fueron cercanos a 1, indicando la ausencia de mutagenicidad (Ames y col., 1975). Esto estaría evidenciando que en el extracto acuoso no habría sustancias que al ser modificadas por las enzimas microsomales tengan la actividad mutagénica por el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

Tabla 6.2: Efecto mutagénico del extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo de preincubación, con activación metabólica, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

| Agente | | Ensayo de Mutagenicidad con S9 mix - Preincubación | | | |
|---------------------|----------------------|--|-------------------|----------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YDD | 0.00 mg ^a | 47.0 ± 6.0 | | 198.0 ± 15.0 | |
| YDD | 0.45 mg | 50.0 ± 5.0 | 1.1 | 202.0 ± 4.0 | 1.0 |
| YDD | 4.50 mg | 47.0 ± 6.0 | 1.0 | 216.0 ± 9.0 | 1.1 |
| YDD | 45.00 mg | 54.0 ± 3.0 | 1.1 | 211.0 ± 9.0 | 1.1 |
| 2AF | 2.50 µg | 2880.0 ± 45.0 ^b | 61.3 | 3023.0 ± 11.0 ^b | 15.3 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, $P \leq 0.05$

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2AF, 2-Aminofluoreno

En presencia de TA100, las tres concentraciones del extracto acuoso de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo con activación metabólica ($P > 0.05$) y sus F.M. fueron cercanos a 1, siendo no mutagénicos (Ames y col, 1975). Esto estaría indicando que en el extracto acuoso no habría sustancias que en presencia de S9 mix, puedan ser modificadas, haciéndolas mutagénicas con un mecanismo de acción por sustitución de pares de bases para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

6.1.1.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin y con activación metabólica

Los resultados hallados en los ensayos realizados con la cepa TA98 indicaron que en el extracto acuoso de la hoja de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no habría sustancias que inducen la actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella microsoma con y sin activación metabólica por el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura para los rangos de concentración estudiados (0.45 a 45 mg por placa).

Estudios sobre mutagenicidad en el extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no han sido informados.

En la discusión de resultados para el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* en la cepa TA98 (sección 5.1.1.3) se planteó la posibilidad que la mutagenicidad en ese extracto se deba principalmente a la presencia de polifenoles como los cafeoil derivados y los flavonoides, y a la presencia de cafeína. El extracto acuoso de *Ilex dumosa* var. *dumosa* contiene este tipo de compuestos en muy baja concentración. La Tabla 6.3 muestra los porcentajes en peso seco de flavonoides y cafeoil derivados en *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa* hallados por Filip y colaboradores (2001). En ella se observa que el porcentaje total en peso seco de flavonoides y cafeoil derivados para *Ilex paraguariensis* es de 0.0751 y 9.608 respecto de 0.0072 y 0.293 para *Ilex dumosa*, respectivamente.

Tabla 6.3: Porcentajes peso en peso de flavonoides y cafeoil derivados en *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*^a.

| Especies | Rutina | Quercetina | Kaempferol |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>I. paraguariensis</i> | 0.0600 ± 0.0054 | 0.0031 ± 0.0009 | 0.0120 ± 0.0003 |
| <i>I. dumosa</i> | 0.0055 ± 0.0005 | 0.0004 ± 0.0002 | 0.0013 ± 0.0002 |

| Especies | Acido clorogénico | Acido cafeico | 3,4-DCQ | 3,5-DCQ | 4,5-DCQ |
|--------------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>I. paraguariensis</i> | 2.800 ± 0.300 | 0.023 ± 0.004 | 0.855 ± 0.064 | 3.040 ± 0.180 | 2.890 ± 0.060 |
| <i>I. dumosa</i> | 0.042 ± 0.009 | 0.017 ± 0.001 | 0.017 ± 0.001 | 0.147 ± 0.060 | 0.070 ± 0.014 |

^a, Adaptado de Filip y col. (2001)

3,4-DCQ, ácido 3,4 dicafeoilquinico; 3,5-DCQ, ácido 3,5 dicafeoilquinico; 4,5-DCQ, ácido 4,5 dicafeoilquinico

Estudios realizados por Ferraro y colaboradores (1997) informaron que una de las características sobresalientes de las hojas de *Ilex dumosa* es la ausencia de cafeína. Reginatto y colaboradores (1999) hallaron que las hojas de *Ilex dumosa* no contienen cafeína ni teobromina en cantidades detectables por la técnica de cromatografía de alta presión (HPLC), a diferencia de *Ilex paraguariensis*, con un valor de 0.65% peso en peso.

Sin embargo, Maiocchi y Avanza (1997) informaron contenidos del orden de 0.1 -0.2 % frente a 1.2 – 1.8% que es el contenido típico de *Ilex paraguariensis*, lo que representa niveles de cafeína entre 9 a 10 veces menores a los de la yerba mate. Filip y colaboradores (1998) informaron cantidades traza de cafeína y teofilina en *Ilex dumosa* al analizar sus infusiones por la técnica de HPLC, usando un detector UV con arreglo de fotodiodos.

Esto explicaría la ausencia de actividad mutagénica en este extracto sobre la cepa TA98, sin y con activación metabólica, para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

Los resultados hallados en los ensayos realizados con la cepa TA100 indicaron que en el extracto acuoso de la hoja de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no habría sustancias que induzcan la actividad mutagénica con o sin activación metabólica en el ensayo de Salmonella Microsoma por el mecanismo de sustitución de pares de bases, para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

En el presente trabajo, ninguno de los extractos acuosos de las plantas de *Ilex* estudiadas (*Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var. *dumosa*) han mostrado actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella microsoma mediante el mecanismo de sustitución de pares de bases para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

- Conclusión

El extracto acuoso de las hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no presenta mutagenicidad en los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg/placa). Esto puede deberse a que este extracto presenta cantidades significativamente menores de polifenoles como cafeoil derivados y flavonoides y de cafeína, compuestos a los que se les atribuyó la actividad mutagénica observada en el Ensayo de Salmonella microsoma con la cepa TA98 en presencia de los extractos acuosos de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*.

6.1.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*

6.1.2.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin activación metabólica

El ensayo en el extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 sin activación metabólica, se llevó a cabo junto con el extracto acuoso de la planta en ausencia de S9 mix, usando así los mismos controles negativos y positivos. Además se hizo un control de disolvente, DMSO, el cual arrojó un valor de revertantes por placa (47.0 ± 1.0) similar al encontrado para el control negativo (46.0 ± 1.0 revertantes por placa, $P > 0.05$).

Como investigación preliminar de mutagenicidad en el extracto clorofórmico, se tomó un amplio rango de dosis del mismo, ensayándose tres concentraciones: 0.45, 4.50 y 45.00 mg/placa, sin activación metabólica, para establecer el valor indicado donde analizar la linealidad de dosis- respuesta y determinar el F.M.

La Tabla 6.4 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, tratadas con tres logaritmos de concentración de extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, en ausencia de S9 mix.

En presencia de TA98, las concentraciones del extracto clorofórmico de la planta de 0.45 y de 4.50 mg/placa no mostraron un aumento en el número de revertantes por placa (47.0 ± 7.0 y 45.0 ± 4.0 , respectivamente) respecto al control negativo sin activación metabólica (46.0 ± 1.0 , $P > 0.05$), mostrando un F.M. de 1.0 (no mutagénico). Sin embargo, se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en el número de revertantes para la concentración de 45.00 mg/placa (1060.0 ± 57.0), dando un valor de F.M. superior a 2 (23.0, mutagénico).

Se decidió determinar la linealidad de efecto mutagénico vs. concentración empleando dosis en el rango de 15.00 a 30.00 mg/placa, teniendo en cuenta los recuentos encontrados para la concentración de 45.00 mg por placa.

En presencia de TA100, las tres concentraciones del extracto clorofórmico de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo sin activación metabólica ($P > 0.05$) y sus F.M. fueron cercanos 1, indicando ausencia de mutagenicidad (Ames y col., 1975). Esto estaría indicando que en el extracto clorofórmico no habría sustancias mutagénicas cuyo mecanismo de acción sea la sustitución de pares de bases para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

Tabla 6.4: Efecto mutagénico del extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{cl}) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo de preincubación, sin activación metabólica, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

| Agente | Concentración/placa | Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix - Preincubación | | | |
|--------------------------|----------------------|--|-------------------|---------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YDD _{cl} (BUF) | 0.00 mg ^a | 46.0 ± 1.0 | | 191.0 ± 8.0 | |
| YDD _{cl} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 47.0 ± 1.0 | 1.0 | 185.0 ± 8.0 | 1.0 |
| YDD _{cl} | 0.45 mg | 47.0 ± 7.0 | 1.0 | 207.0 ± 3.0 | 1.1 |
| YDD _{cl} | 4.50 mg | 45.0 ± 4.0 | 1.0 | 214.0 ± 2.0 | 1.1 |
| YDD _{cl} | 45.00 mg | 1060.0 ± 57.0 ^b | 23.0 | 211.0 ± 2.0 | 1.1 |
| 2NF | 2.50 µg | 226.0 ± 16.0 ^b | 4.9 | | |
| SAZ | 1.50 µg | | | 486.0 ± 30.0 ^b | 2.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2NF, 2-Nitrofluoreno; SAZ, Azida de sodio; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

- Ensayo de linealidad dosis-respuesta del extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* con la cepa TA98 en ausencia de S9 mix

Se evaluó la relación entre la concentración de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* y los revertantes en placa en el rango de 15.00 a 30.00 mg/placa, usando 3 concentraciones: 15.00, 22.50 y 30.00 mg/placa, sembrados sin activación metabólica.

La Tabla 6.5 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de *Salmonella* microsoma con preincubación de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, tratada con las tres concentraciones de extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, en ausencia de S9 mix.

Tabla 6.5: Efecto mutagénico del extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{cl}) en las dosis estudiadas para evaluar linealidad de efecto vs dosis, utilizando el ensayo de preincubación, sin activación metabólica, con la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

| Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix | | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|
| Agente | Concentración/placa | Cepa TA98 | |
| | | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YDD _{cl} (BUF) | 0.00 mg ^a | 46.0 ± 1.0 | |
| YDD _{cl} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 52.0 ± 2.0 | 1.1 |
| YDD _{cl} | 15.00 mg | 233.0 ± 42.0 ^b | 5.1 |
| YDD _{cl} | 22.50 mg | 712.0 ± 19.0 ^b | 15.5 |
| YDD _{cl} | 30.00 mg | 1192.0 ± 79.0 ^b | 25.9 |
| 2NF | 2.50 µg | 253.0 ± 13.0 ^b | 5.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2NF, 2-Nitrofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

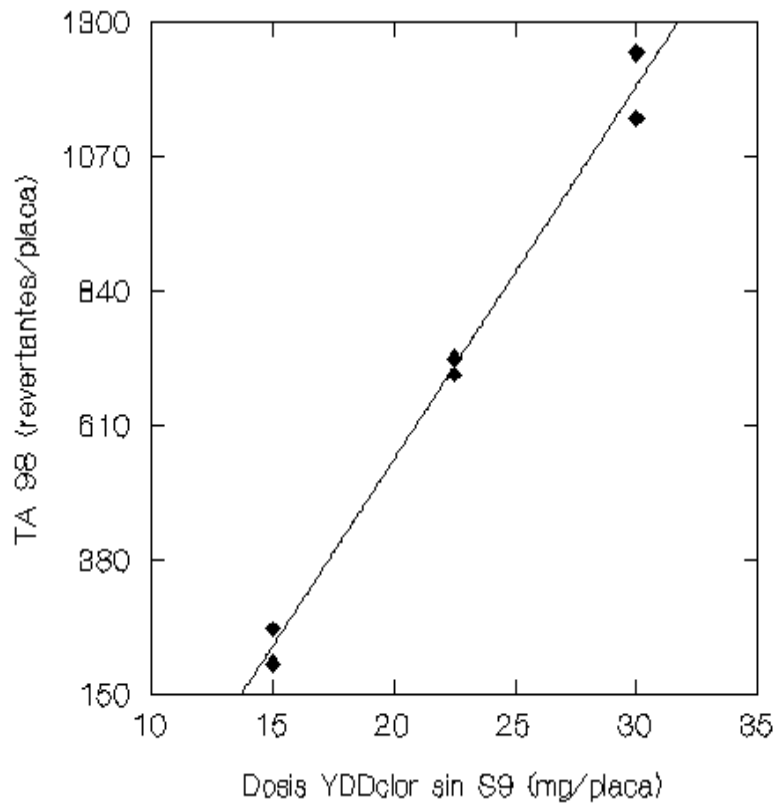


Figura 6.1: Correlación lineal entre cantidad de Revertantes/placa de *Salmonella typhimurium* TA98 y la dosis en mg/placa del extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{cl}), sin activación metabólica.

Se observó que en todas las dosis ensayadas el F.M. era superior a 2 y existía una correlación lineal entre la cantidad de revertantes y la concentración de extracto clorofórmico por placa (Fig.6.1).

La regresión lineal expresada en Revertantes/placa vs. Dosis en mg/placa para la cepa TA98 produjo una pendiente b igual a 63.97 (revertantes por placa/dosis) y una ordenada al origen a igual a -727.25 (revertantes por placa), con un coeficiente de determinación r^2 igual a 0.991.

Esta correlación lineal dosis-respuesta confirmó la acción mutagénica del extracto clorofórmico de la hoja de la planta de *Ilex dumosa var. dumosa* sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, indicando un mecanismo de acción por desplazamiento en el marco de lectura.

6.1.2.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de *Ilex dumosa var. dumosa* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, con activación metabólica

El ensayo en el extracto clorofórmico de *Ilex dumosa var. dumosa* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 con activación metabólica, se llevó a cabo junto con el extracto acuoso de la planta en presencia de S9 mix, usando así los mismos controles negativos y positivos. Además se hizo un control de disolvente, DMSO, el cual produjo un valor de revertantes por placa (52.0 ± 2.0) similar al encontrado para el control negativo ($P > 0.05$).

Para la evaluación inicial de la mutagenicidad del extracto clorofórmico, se realizó el ensayo con dosis que abarquen tres logaritmos de concentración: 0.45, 4.50 y 45.00 mg sembrados en las placas con activación metabólica y se determinó el F.M.

La Tabla 6.6 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de preincubación de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, tratadas con tres logaritmos de concentración de extracto clorofórmico de *Ilex dumosa var. dumosa*, en presencia de S9 mix.

En presencia de la cepa TA98, las tres concentraciones del extracto clorofórmico de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo con activación metabólica ($P > 0.05$). Además, sus valores de F.M. estuvieron alrededor de 1, indicando ausencia de mutagenicidad (Ames y col. 1975). Esto evidenciaría que en el extracto clorofórmico habría sustancias que en presencia de S9 mix, son modificadas,

haciéndolas no mutagénicas para el mecanismo de acción por cambio en el marco de lectura.

En presencia de la cepa TA100, las tres concentraciones del extracto clorofórmico de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo con activación metabólica ($P > 0.05$) y también F.M. en el orden de 1. Esto estaría indicando que en el extracto clorofórmico no habría sustancias que modificadas por enzimas microsomales se conviertan en mutagénicas para el mecanismo de acción de sustitución de pares de bases para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

Tabla 6.6: Efecto mutagénico del extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{cl}) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo de preincubación, con activación metabólica, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

| Agente | Concentración/placa | Ensayo de Mutagenicidad con S9 mix - Preincubación | | | |
|--------------------------|----------------------|--|-------------------|----------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YDD _{cl} (BUF) | 0.00 mg ^a | 47.0 ± 3.0 | | 198.0 ± 15.0 | |
| YDD _{cl} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 52.0 ± 2.0 | 1.1 | 196.0 ± 4.0 | 1.0 |
| YDD _{cl} | 0.45 mg | 44.0 ± 3.0 | 0.9 | 215.0 ± 7.0 | 1.2 |
| YDD _{cl} | 4.50 mg | 49.0 ± 6.0 | 1.0 | 207.0 ± 8.0 | 1.0 |
| YDD _{cl} | 45.00 mg | 49.0 ± 3.0 | 1.0 | 206.0 ± 4.0 | 1.0 |
| 2AF | 2.50 µg | 2880.0 ± 45.0 ^b | 61.3 | 3023.0 ± 11.0 ^b | 15.3 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, $P \leq 0.05$

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2AF, 2-Aminofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

6.1.2.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin y con activación metabólica

Los resultados encontrados en los ensayos utilizando la cepa TA98 mostraron que en el extracto clorofórmico de la hoja de *Ilex dumosa* var. *dumosa* habría sustancias que inducen la actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella Microsoma sin activación

metabólica por el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura y que este efecto es suprimido por la acción de enzimas microsomales con el uso de S9 mix.

Estudios sobre mutagenicidad en el extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no han sido reportados.

La Tabla 6.7 muestra los parámetros de linealidad de dosis- respuesta y las dosis ensayadas de los extractos clorofórmicos de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var. *dumosa*.

Tabla 6.7: Parámetros de linealidad las curvas de dosis-respuesta y los rangos de dosis ensayados del extracto clorofórmico (YPP_{cl}) de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y del extracto clorofórmico (YDD_{cl}) de *Ilex dumosa* var. *dumosa*.

| Linealidad dosis-respuesta | Cepa TA98 | | | |
|---|---|------------|---|------------|
| | Extracto Clorofórmico YPP _{cl} | | Extracto Clorofórmico YDD _{cl} | |
| | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix |
| a | -266.50 | 96.73 | -727.25 | - |
| b | 399.62 | 126.38 | 63.97 | - |
| r ² | 0.995 | 0.995 | 0.991 | - |
| Rango de concentración (mg/placa) | 1.13-4.50 | 0.45-4.50 | 15.00-30.00 | - |

a, ordenada al origen (revertantes por placa)

b, pendiente (revertantes por placa/dosis)

r², coeficiente de determinación

En la discusión de resultados para el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* en la cepa TA98 (sección 5.1.2.3) se planteó la posibilidad que la mutagenicidad en ese extracto se deba principalmente a la presencia cafeína que se hallaría concentrada debido a su alta solubilidad en cloroformo (Shalmashi y Golmohammad, 2010).

Como se mencionó la sección 6.1.1.3, Maiocchi y Avanza (1997) informaron contenidos del orden de 0.1 -0.2 %, lo que representa niveles de cafeína entre 9 a 10 veces menores en *Ilex dumosa* respecto a los de *Ilex paraguariensis*. Esta cafeína también se hallaría concentrada en el extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* pero en menor cantidad que en el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*. Este razonamiento estaría apoyado en el hecho de haber demostrado acción mutagenicica en ausencia de S9 mix en la concentración de 1.13 a 4.50 mg/placa

para *Ilex paraguariensis var. paraguariensis*, y para *Ilex dumosa var. dumosa*, en la concentración de 15.00 a 30.00 mg/placa (Tabla 6.7).

En el extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* se observó una disminución del efecto mutagénico en presencia de S9 mix (b: 126.38, disminución en la pendiente respecto de lo hallado sin S9 mix, b: 399.62) a diferencia del hallazgo encontrado en el mismo tipo de extracto de hojas para *Ilex dumosa var. dumosa*, donde pierde la actividad al ser metabolizado por la fracción microsomal (b: 63.97 sin S9 mix y ausencia de mutagenicidad con S9 mix).

Esta diferencia podría deberse a la menor cantidad de cafeína presente en el extracto.

Los resultados encontrados en los ensayos realizados con TA100 mostraron la ausencia de sustancias en el extracto clorofórmico que induzcan la actividad mutagénica por el mecanismo de sustitución de pares de bases para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa). En este extracto no habría compuestos generadores de ERO que se encuentren concentrados, como se sospechó para el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis var. paraguariensis*. Además no se han informado estudios de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en *Ilex dumosa* como para poder establecer una relación entre los hallazgos encontrados en esta planta y en *Ilex paraguariensis*, teniendo en cuenta las suposiciones formuladas en el análisis de resultados del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* sobre la cepa TA100 de *Salmonella thiphymurium* (punto 5.1.2.3). En principio no debería encontrarse estos compuestos en *Ilex dumosa var. dumosa* si las suposiciones hechas para el extracto clorofórmico de hojas de yerba mate son acertadas.

- Conclusión

El extracto clorofórmico de hojas de *Ilex dumosa var. dumosa* presenta actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella microsoma a través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, debido a su acción sobre la cepa TA98. Este resultado podría atribuirse a la concentración de cafeína, que por su afinidad por el solvente cloroformo, se encuentra en mayor concentración. Las enzimas microsomaes presentes en los ensayos con S9 mix modificarían este compuesto suprimiendo su acción mutagénica. Este efecto no es observado en el extracto acuoso debido a que el mismo contiene una baja concentración de cafeína. Estudios posteriores tendientes a evaluar cuali y cuantitativamente el contenido de cafeína en el extracto permitiría dar sustento a las hipótesis planteadas.

No se observó mutagenicidad en presencia de la cepa TA100, cuyo mecanismo de acción es a través de la sustitución de pares de bases. Se sugirió la ausencia de compuestos como los policíclicos aromáticos (PAHs), entre otros, a los cuales se les atribuyó la mutagenicidad observada en el extracto clorofómico de yerba mate.

6.1.3. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa*

6.1.3.1. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin activación metabólica

El ensayo en el extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, se llevó a cabo junto con el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 en ausencia de S9 mix, usando así los mismos controles negativos y positivos. Además se realizó un control de disolvente, DMSO, el cual arrojó un valor de revertantes por placa (50.0 ± 3.0 para TA98 y 185.0 ± 8.0 para TA100) similar al encontrado para el control negativo (49.0 ± 5.0 y 191 ± 8.0 revertantes por placa para TA98 y TA100 respectivamente, $P > 0.05$).

Como investigación preliminar de mutagenicidad en el extracto acetónico, se tomó en un amplio rango de dosis del mismo, ensayándose tres concentraciones: 0.45, 4.50 y 45.00 mg/placa, sin activación metabólica, para establecer el valor indicado donde analizar la linealidad de dosis- respuesta y determinar el F.M.

La Tabla 6.8 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, tratadas con tres logaritmos de concentración de extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, en ausencia de S9 mix.

En presencia de la cepa TA98, la dosis de 0.45 mg por placa presentó una cantidad de revertantes significativamente mayor que el control negativo sin activación metabólica (283.0 ± 4.0 revertantes por placa, $P < 0.05$) y un F.M. mayor a 2 (5.8), por lo que se decidió realizar el ensayo de linealidad de dosis-efecto en el rango de concentración de 0.45 a 1.00 mg por placa. En las últimas dos concentraciones, los valores de revertantes fueron menores a los revertantes espontáneos y se observó deformación de colonias en un fondo opaco, sospechándose toxicidad. Por esta razón se hizo el ensayo de toxicidad para las dosis de 4.50 y 45.00 mg/placa.

En presencia de TA100, las tres concentraciones del extracto acetónico de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo sin activación metabólica ($P > 0.05$). Esto estaría indicando que en el extracto acetónico no habría sustancias mutagénicas cuyo mecanismo de acción sea la sustitución de pares de bases para los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg por placa).

Tabla 6.8: Efecto mutagénico del extracto acetónico de *Ilex dumosa var. dumosa* (YDD_{acet}) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo de preincubación, sin activación metabólica, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

| Agente | Concentración/placa | Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix - Preincubación | | | |
|--------------------|----------------------|--|-------------------|---------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| $YDD_{acet(BUF)}$ | 0.00 mg ^a | 49.0 ± 5.0 | | 191.0 ± 8.0 | |
| $YDD_{acet(DMSO)}$ | 0.00 mg ^a | 50.0 ± 3.0 | 1.0 | 185.0 ± 8.0 | 1.0 |
| YDD_{acet} | 0.45 mg | 283.0 ± 4.0 ^b | 5.8 | 217.0 ± 6.0 | 1.1 |
| YDD_{acet} | 4.50 mg | 16.0 ± 9.0 | 0.3 | 220.0 ± 5.0 | 1.2 |
| YDD_{acet} | 45.00 mg | 10.0 ± 4.0 | 0.2 | 210.0 ± 5.0 | 1.1 |
| 2NF | 2.50 µg | 230.0 ± 25.0 ^b | 4.7 | | |
| SAZ | 1.50 µg | | | 486.0 ± 31.0 ^b | 2.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, $P \leq 0.05$

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2NF, 2-Nitrofluoreno; SAZ, Azida de sodio; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

- Ensayo de toxicidad sobre el extracto acetónico de *Ilex dumosa var. dumosa* en la dosis de 4.50 y 45.00 mg/placa para la cepa TA98, sin activación metabólica

Las concentraciones de 4.50 y 45.00 mg/placa de extracto acetónico de hojas de yerba *Ilex dumosa var. dumosa* mostraron sobre las placas del ensayo de mutagenicidad la presencia de colonias deformadas, con disminución de la opacidad de la capa de fondo bacteriana.

Se realizó un ensayo de toxicidad siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos sección 4.3.

La Tabla 6.9 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de toxicidad para la concentraciones de 4.50 y 45.00 mg/placa de extracto acetónico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, sin activación metabólica.

Tabla 6.9: Efecto tóxico del extracto acetónico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{acet}) en la concentraciones de 4.50 y 45.00 mg/placa, sin activación metabólica, sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

| Ensayo de Toxicidad | | |
|----------------------------|----------------------|--------------------------|
| Agente | Cepa TA98 | |
| Concentración/placa | UFC.mL ⁻¹ | |
| YDD _{acet} (BUF) | 0.00 mg ^a | 2818.0 ± 59.0 |
| YDD _{acet} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 3002.0 ± 85.0 |
| YDD _{acet} | 4.50 mg | 36.0 ± 12.0 ^b |
| YDD _{acet} | 45.00 mg | 24.0 ± 15.0 ^b |

^a, Control negativo de toxicidad
^b, P ≤ 0.05
 UFC, Unidades Formadoras de Colonias

La misma mostró una disminución significativa (P<0.05) en el recuento de colonias de TA98 (36.0 ± 12.0 UFC.mL⁻¹ para 4.50 mg/placa y 24.0 ± 15.0 UFC.mL⁻¹ para 45.00 mg/placa) respecto del control negativo (2818.0 ± 12.0 UFC.mL⁻¹). El solvente no mostró toxicidad arrojando valores de similares al control con buffer fosfato (P>0.05). Este resultado estaría indicando que la disminución en la concentración bacteriana se debe a toxicidad del extracto en las dosis ensayadas.

- Ensayo de linealidad dosis-respuesta del extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* con la cepa TA98 en ausencia de S9 mix

Se evaluó la relación entre la concentración de extracto acetónico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* y los revertantes en placa en el rango de 0.45 a 1.00 mg/placa, usando 3 concentraciones: 0.45, 0.70 y 1.00 mg/placa, sembrados sin activación metabólica.

La Tabla 6.10 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de preincubación de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, tratada con las tres concentraciones de extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, en ausencia de S9 mix.

Tabla 6.10: Efecto mutagénico del extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{acet}) en las dosis estudiadas para evaluar linealidad de efecto vs dosis, utilizando el ensayo de preincubación, sin activación metabólica, con la cepa de *Salmonella typhimurium* TA 98.

| Ensayo de Mutagenicidad sin S9 mix | | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|
| Agente | | Cepa TA98 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YDD _{acet} (BUF) | 0.00 mg ^a | 46.0 ± 1.0 | |
| YDD _{acet} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 52.0 ± 2.0 | 1.1 |
| YDD _{acet} | 0.45 mg | 283.0 ± 4.0 ^b | 6.1 |
| YDD _{acet} | 0.70 mg | 873.0 ± 33.0 ^b | 19.0 |
| YDD _{acet} | 1.00 mg | 1548.0 ± 45.0 ^b | 33.7 |
| 2NF | 2.50 µg | 253.0 ± 14.0 ^b | 5.5 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2NF, 2-Nitrofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

Se observó que en todas las dosis ensayadas que el F.M. era superior a 2 y existía una correlación lineal entre la cantidad de revertantes y la concentración de extracto acetónico por placa (Fig.6.2). La regresión lineal expresada en Revertantes/placa vs. Dosis en mg/placa para la cepa TA 98 permitió obtener una pendiente b igual a 2299.23 (revertantes por placa/dosis) y una ordenada al origen a igual a -746.61 (revertantes por placa), con un coeficiente de determinación r² igual a 0.998.

Esta correlación lineal dosis-respuesta confirmó la acción mutagénica del extracto acetónico de la hoja de la planta de yerba *Ilex dumosa* var. *dumosa* sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, indicando un mecanismo de acción por desplazamiento en el marco de lectura.

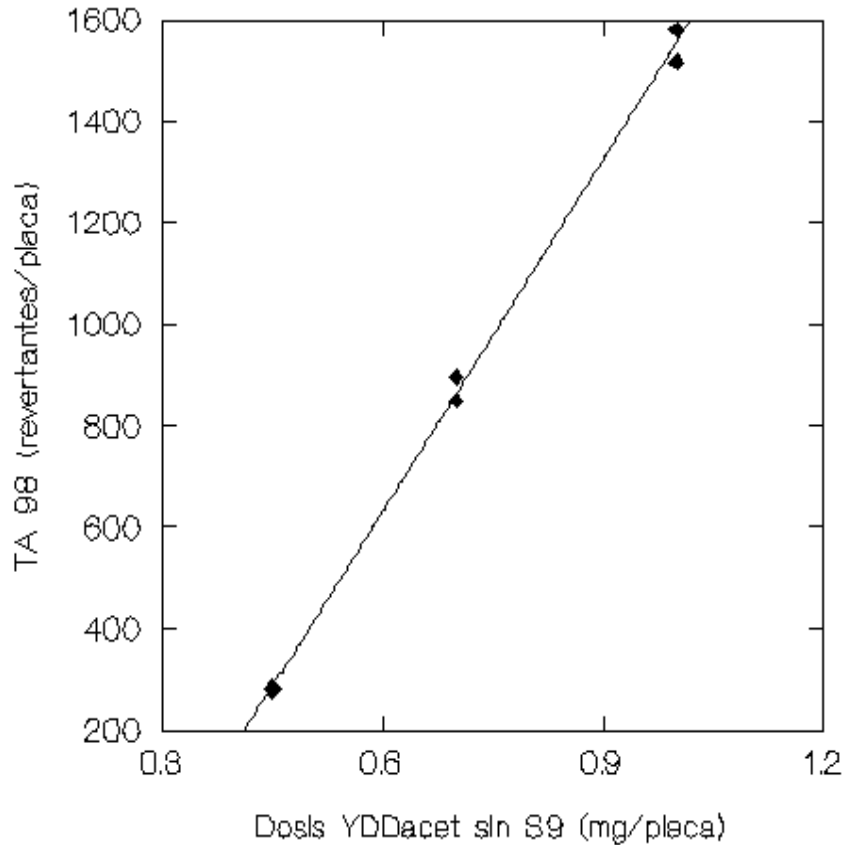


Figura 6.2: Correlación lineal entre cantidad de Revertantes/placa de *Salmonella typhimurium* TA98 y la dosis en mg/placa del extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{acet}), sin activación metabólica.

6.1.3.2. Ensayo de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* sobre las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, con activación metabólica

Los controles negativos usando buffer fosfato arrojaron un valor de 47.0 ± 6.0 y 198.0 ± 15.0 revertantes espontáneos por placa para TA98 y TA100, respectivamente.

El control positivo, usando 2-aminofluoreno (2AF, $2.50 \mu\text{g}$ por placa) como inductor de mutagenicidad para el ensayo con S9 mix, arrojó un valor de 3131.0 ± 38.0 revertantes por placa para la cepa TA98 y 3023.0 ± 45.0 revertantes por placa para la cepa TA100, siendo dicho recuento de revertantes significativamente mayor al control negativo ($P < 0.05$).

Este resultado confirmó las propiedades de reversión y especificidad de la cepa TA98 y TA100 además de la eficacia del S9 mix.

Para la evaluación inicial de la mutagenicidad del extracto acetónico, se realizó el ensayo con tres dosis: 0.45, 4.50 y 45.00 mg sembrados en las placas, con activación

metabólica, para hallar la concentración donde investigar la linealidad de dosis-respuesta y determinar el F.M.

La Tabla 6.11 muestra los hallazgos obtenidos en el ensayo de Salmonella microsoma con preincubación de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA100, tratadas con tres logaritmos de concentración de extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, en presencia de S9 mix.

Tabla 6.11: Efecto mutagénico del extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{acet}) en tres niveles de concentración, utilizando el ensayo de preincubación, con activación metabólica, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

| Agente | | Ensayo de Mutagenicidad con S9 mix - Preincubación | | | |
|---------------------------|----------------------|--|-------------------|----------------------------|-------------------|
| | | Cepa TA98 | | Cepa TA100 | |
| Concentración/placa | | Revertantes/placa | F.M. ^c | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YDD _{acet(BUF)} | 0.00 mg ^a | 47.0 ± 6.0 | | 198.0 ± 15.0 | |
| YDD _{acet(DMSO)} | 0.00 mg ^a | 52.0 ± 2.0 | 1.1 | 196.0 ± 4.0 | 1.0 |
| YDD _{acet} | 0.45 mg | 318.0 ± 11.0 ^b | 6.8 | 222.0 ± 4.0 | 1.1 |
| YDD _{acet} | 4.50 mg | 30.0 ± 3.0 | 0.6 | 228.0 ± 11.0 | 1.2 |
| YDD _{acet} | 45.00 mg | 14.0 ± 2.0 | 0.3 | 208.0 ± 30.0 | 1.1 |
| 2AF | 2.50 µg | 3131.0 ± 38.0 ^b | 66.6 | 3023.0 ± 45.0 ^b | 15.3 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2AF, 2-Aminofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

En presencia de la cepa TA98, la dosis de 0.45 mg por placa presentó una cantidad de revertantes significativamente mayor que el control negativo con activación metabólica (318.0 ± 11.0 revertantes por placa, P<0.05) y un F.M. de 6.8, por lo que se decidió realizar el ensayo de linealidad de dosis-efecto en el rango de concentración de 0.20 a 0.70 miligramos por placa. En las últimas dos concentraciones, los valores de revertantes fueron menores que los revertantes espontáneos y se observó deformación de colonias con fondo opaco, sospechándose toxicidad. Por esta razón se hizo el ensayo de toxicidad para las dosis de 4.50 y 45.00 mg/placa.

En presencia de la cepa TA100, las tres concentraciones del extracto acetónico de la planta mostraron valores de revertantes similares al control negativo sin activación metabólica ($P > 0.05$) y sus valores de F.M fueron cercanos a 1, siendo no mutagénicos (Ames y col., 1975). Esto estaría indicando que en el extracto acetónico no habría sustancias que modificadas por enzimas microsomales se conviertan en mutagénicas para el mecanismo de acción de sustitución de pares de bases en las dosis estudiadas (0.45 a 45.00 mg por placa).

- Ensayo de toxicidad sobre el extracto acetónico de *Ilex dumosa var. dumosa* en la dosis de 4.50 y 45.00 mg/placa para la cepa TA98, con activación metabólica

Las concentraciones de 4.50 y 45.00 mg/placa de extracto acetónico de hojas de yerba señorita, con activación metabólica mostraron sobre las placas del ensayo de mutagenicidad la presencia de colonias deformadas, con disminución de la opacidad de la capa de fondo bacteriana.

Se realizó un ensayo de toxicidad siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Metodos sección 4.3.

La Tabla 6.12 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de toxicidad para la concentraciones de 4.50 y 45.00 mg/placa de extracto acetónico de hojas de *Ilex dumosa var. dumosa*, con activación metabólica, indicando una disminución significativa ($P < 0.05$) en el recuento de colonias de TA98 (25.0 ± 8.0 UFC.mL⁻¹ para 4.50 mg/placa y menor a 10.0 UFC.mL⁻¹ para 45.00 mg/placa) respecto del control negativo (2971.0 ± 42.0 UFC.mL⁻¹). El solvente no mostró toxicidad arrojando valores similares al control con buffer fosfato ($P > 0.05$). Este resultado estaría indicando que la disminución en la concentración bacteriana se debe a toxicidad del extracto en las dosis ensayadas.

Tabla 6.12: Efecto tóxico del extracto acetónico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{acet}) en la concentraciones de 4.50 y 45.00 mg/placa, con activación metabólica, sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

| Ensayo de Toxicidad | | |
|----------------------------|----------------------|-------------------------|
| Agente | Cepa TA98 | |
| Concentración/placa | UFC.mL ⁻¹ | |
| YDD _{acet} (BUF) | 0.00 mg ^a | 2971.0 ± 42.0 |
| YDD _{acet} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 2795.0 ± 67.0 |
| YDD _{acet} | 4.50 mg | 25.0 ± 8.0 ^b |
| YDD _{acet} | 45.00 mg | s/c ^b |

^a, Control negativo de toxicidad

^b, P ≤ 0.05

UFC, Unidades Formadoras de Colonias

s/c, sin crecimiento: <10 UFC/mL

- Ensayo de linealidad dosis-respuesta del extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* con la cepa TA98 en presencia de S9 mix

Se evaluó la relación entre la concentración de extracto acetónico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* y los revertantes en placa en el rango de 0.20 a 0.70 mg/placa, usando 3 concentraciones: 0.20, 0.45 y 0.70 mg/placa, sembrados con activación metabólica.

La Tabla 6.13 resume los hallazgos obtenidos en el ensayo de *Salmonella* microsoma con preincubación de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, tratada con las tres concentraciones de extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, en presencia de S9 mix.

Se observó que en todas las dosis ensayadas el F.M. era superior a 2 y existía una correlación lineal entre la cantidad de revertantes y la concentración de extracto acetónico por placa (Fig.6.3).

La regresión lineal expresada en Revertantes/placa vs. Dosis en mg/placa para la cepa TA98 dio una pendiente b igual a 782.00 (revertantes por placa/dosis) y una ordenada al origen a igual a -32.73 (revertantes por placa), con un coeficiente de determinación r² igual a 0.997.

Tabla 6.13: Efecto mutagénico del extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{acet}) en las dosis estudiadas para evaluar linealidad de efecto vs dosis, utilizando el ensayo de Ames con preincubación, con activación metabólica, con la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

| Ensayo de Mutagenicidad con S9 mix | | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|
| Agente | Concentración/placa | Cepa TA98 | |
| | | Revertantes/placa | F.M. ^c |
| YDD _{acet} (BUF) | 0.00 mg ^a | 46.0 ± 1.0 | |
| YDD _{acet} (DMSO) | 0.00 mg ^a | 52.0 ± 2.0 | 1.1 |
| YDD _{acet} | 0.20 mg | 125.0 ± 13.0 ^b | 2.7 |
| YDD _{acet} | 0.45 mg | 318.0 ± 10.0 ^b | 6.9 |
| YDD _{acet} | 0.70 mg | 516.0 ± 15.0 ^b | 11.2 |
| 2AF | 2.50 µg | 3131.0 ± 38.0 ^b | 68.1 |

^a, Revertantes espontáneos

^b, P ≤ 0.05

^c, Factor de Mutagenicidad; Mutagénico (≥ 2)

2AF, 2-Aminiofluoreno; BUF, Buffer fosfato; DMSO, Dimetilsulfóxido

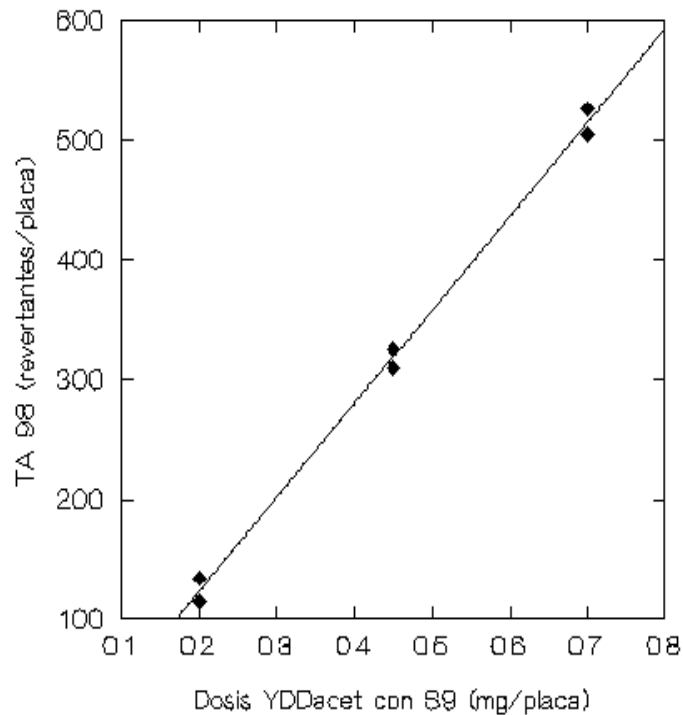


Figura 6.3: Correlación lineal entre cantidad de Revertantes/placa de *Salmonella typhimurium* TA98 y la dosis en mg/placa del extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{acet}), con activación metabólica.

Esta correlación lineal dosis-respuesta confirmó la acción mutagénica del extracto acetónico de la hoja de *Ilex dumosa* var. *dumosa* sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, en presencia de S9 mix, indicando un mecanismo de acción por desplazamiento en el marco de lectura.

6.1.3.3. Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en el extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin y con activación metabólica.

Los resultados encontrados en los ensayos con TA98 indicaron la presencia de sustancias en el extracto acetónico de la hoja de *Ilex dumosa* var. *dumosa* que serían las responsables de inducir la actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella microsoma con y sin activación metabólica por el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura.

Estudios sobre mutagenicidad en el extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no han sido informados.

La Tabla 6.14 resume los parámetros de las regresiones lineales de las curvas de dosis – respuesta en los rangos estudiados de extracto acetónico de la planta, sobre la cepa TA98, sin y con S9 mix.

Tabla 6.14: Parámetros de las curvas de dosis-respuesta llevadas a cabo sobre el extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{acet}), con la cepa TA98, sin y con S9mix

| Cepa TA98 | | |
|-----------------------------------|------------|------------|
| YDD_{acet} | Sin S9 mix | Con S9 mix |
| Linealidad | | |
| dosis-respuesta | | |
| a | -746.61 | -32.73 |
| b | 2299.23 | 782.00 |
| r^2 | 0.998 | 0.997 |
| Rango de concentración (mg/placa) | 0.45-1.00 | 0.20-0.70 |

a, ordenada al origen (revertantes por placa)
b, pendiente (revertantes por placa/dosis)
 r^2 , coeficiente de determinación

Se observó que en todas las dosis el o los compuestos generadores de mutagenicidad en presencia de S9 mix, disminuye la actividad al ser metabolizados empleando el mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura. Esto se evidencia al ver las pendientes (revertantes por placa/dosis) de las curvas de comprobación de linealidad de dosis- respuesta (2299.23 sin activación metabólica y 782.00 con activación metabólica), donde se observa una disminución del efecto mutagénico en presencia de S9 mix (Fig. 6.4).

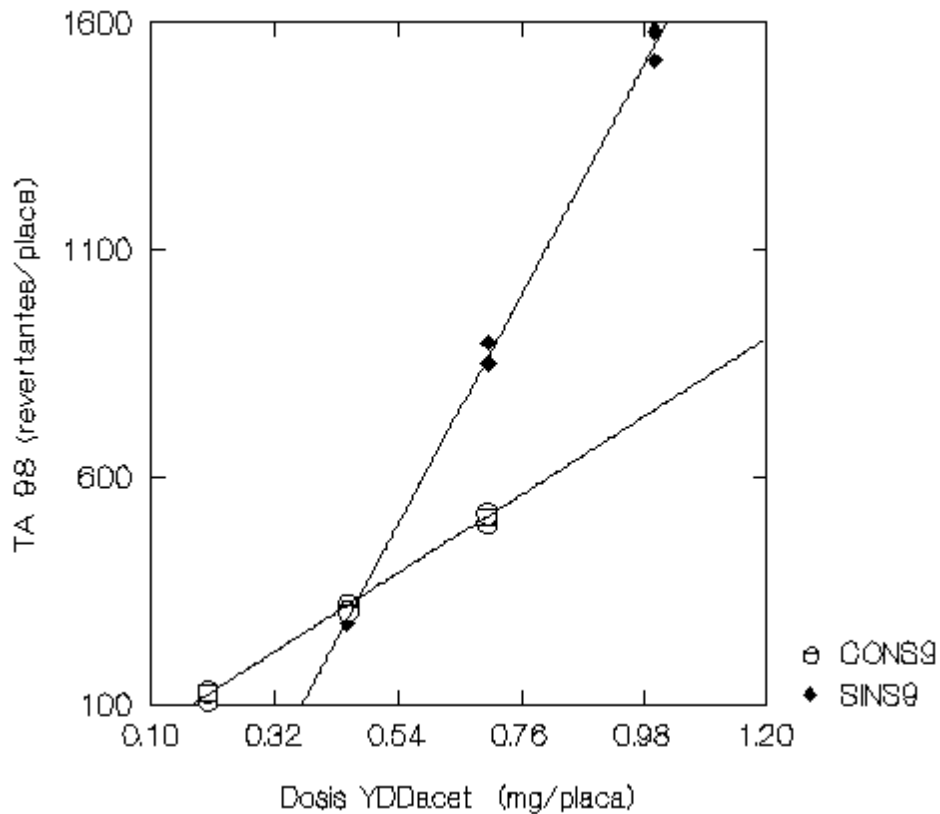


Fig. 6.4: Ensayo de mutagénesis del extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YPP_{acet}), con *Salmonella typhimurium* TA98 con \square y sin \blacktriangle activación metabólica.

La Tabla 6.15 compara las concentraciones de flavonoides presentes en *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*. En la misma se observa que la cantidad de flavonoides presentes en el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* es un orden superior al de *Ilex dumosa*.

Tabla 6.15: Contenidos (% en masa seca) de flavonoides rutina, quercitina y kaempferol en extractos acuosos de *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*^a.

| Plantas | Rutina | Quercitina | Kaempferol | Total de Flavonoides |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|
| <i>I. paraguariensis</i> | 0.0600 ± 0.0054 | 0.0031 ± 0.0009 | 0.012 ± 0.0003 | 0.0751 |
| <i>I. dumosa</i> | 0.0055 ± 0.0005 | 0.0004 ± 0.0002 | 0.0013 ± 0.0002 | 0.0072 |

^a, Adaptado de Filip y colaboradores (2001), Valores como media ± S.D.

Comparando los resultados con los obtenidos para el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (Tabla 6.16), donde hubo un aumento de mutagenicidad en presencia de S9 mix (la pendiente de la curva aumenta de 316.26 a 1776.40 revertantes por placa/dosis), se observó que en presencia de activación metabólica, disminuye el efecto mutagénico del extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* con la activación metabólica (disminución de las pendientes de las curvas de 2299.23 a 782.00 revertantes por placa/dosis).

Tabla 6.16: Parámetros de las curvas de dosis-respuesta llevadas a cabo sobre el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (YPP_{acet}), y el extracto acetónico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (YDD_{acet}), con la cepa TA98, sin y con S9mix

| Linealidad dosis-respuesta | Cepa TA98 | | | |
|-----------------------------------|--|------------|--|------------|
| | Extracto acetónico YPP _{acet} | | Extracto Acetónico YDD _{acet} | |
| | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix |
| a | -7.52 | 32.20 | -746.61 | -32.73 |
| b | 316.26 | 1776.40 | 2299.23 | 782.00 |
| r ² | 0.989 | 0.992 | 0.998 | 0.997 |
| Rango de concentración (mg/placa) | 0.30-1.50 | 0.20-0.80 | 0.45-1.00 | 0.20-0.70 |

a, ordenada al origen (revertantes por placa)

b, pendiente (revertantes por placa/dosis)

r², coeficiente de determinación

Si bien los flavonoides pueden estar concentrados en el extracto acetónico como se indicó en la sección 5.1.2.3, en el caso de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, esta cantidad es significativamente menor a la encontrada en extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, y sus efectos en presencia de S9 mix (aumento de mutagenicidad visto en el extracto de yerba mate), podrían estar enmascarados por otros compuestos

mutagénicos presentes en el extracto, que serían los principales responsables de la mutagenicidad observada sin S9 mix y que frente a las enzimas microsomales estas sustancias fueran modificadas produciéndose una desactivación parcial del efecto mutagénico.

Se han hallado en las hojas de *Ilex dumosa*, saponinas triterpenoides distintas a las encontradas en *Ilex paraguariensis* (Pires y col., 1997; Gnoatto y col., 2005).

La Tabla 6.17 muestra las saponinas primarias presentes en *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*, incluyendo las sustituciones comunes de los grupos R.

La disminución de la mutagenicidad en presencia de activación metabólica podría también deberse a la presencia de taninos en el extracto que pueden estar asociados a estas saponinas presentes en *Ilex dumosa* var. *dumosa*. Se han reportado compuestos con grupos taninos que fueron relacionados con la inducción de cáncer de esófago (Morton, 1980), pero también con mecanismos antimutagénicos y anticarcinogénicos relacionados con la actividad oxidativa (Kada y col., 1985). De Sá Ferreira y Vargas (2009) sugieren que los taninos podrían inducir una acción reparativa por medio del mecanismo de escisión en el ADN dañado en presencia del proceso de metabolización, pero en ausencia de éste, dicho mecanismo podría inhibirse y tal reparación resultaría en un efecto co-mutagénico³.

Tabla 6.17: Saponinas de *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa* y sus diferencias estructurales, incluyendo las sustituciones en los grupos R.

| Especie <i>Ilex</i> | Saponina | Grupo funcional | R | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|------------------------------------|------------------------|------------------|----------------------|----------------|---------------------|----------------|
| <i>paraguariensis</i> ^a | Metasaponina 1 | Acido ursólico | glc (1→3)ara | H | glc | H |
| | Metasaponina 2 | Acido ursólico | glc (1→3)rha(1→2)ara | H | glc | H |
| | Metasaponina 3 | Acido ursólico | glc (1→3)ara | H | glc(1→6)glc | H |
| | Metasaponina 4 | Acido ursólico | glc (1→3)rha(1→2)ara | H | glc(1→6)glc | H |
| | Metasaponina 5 | Acido ursólico | glc (1→3)rha(1→2)ara | H | glc(1→4)glc(1→6)glc | H |
| <i>dumosa</i> ^b | Chikusetsusaponina Iva | Acido oleanólico | gluA | H | glc | H |
| | Dumosaponina 5 | Acido oleanólico | glc (1→2)gal | OH | glc | H |
| | Dumosaponina 6 | Acido oleanólico | ara (1→2)ara | H | glc | H |
| | Dumosaponina 7 | Acido oleanólico | gal | H | glc | H |

gluA= acido glucurónico; glc= glucosa; gal= galactosa; ara: arabinosa; rha: rhamnosa

^aGnoatto y colaboradores (2005)

^bPires y colaboradores (1997)

³Comutagénesis: potenciación del efecto mutagenicos por agentes no mutágenos, incrementando la mutagenicidad de muchos químicos mutágenos y carcinógenos y potencia también como efectos citotóxicos y clastogénicos de los agentes alquilantes. La comutagénesis esta basado en la capacidad conocida de alguna sustancia de inducir un número de mutaciones cercanas relacionadas dentro de un corto segmento de DNA. La comutagénesis no tiene actividad mutagénica intrínseca y no son detectadas durante el screening genotoxicológico.

Los resultados encontrados en los ensayos con TA100 indicaron que en el extracto acetónico de la hoja de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, al igual que para *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, no habría sustancias que induzcan la actividad mutagénica en el ensayo de *Salmonella* microsoma por el mecanismo de sustitución de pares de bases en el rango de dosis estudiadas (0.45 a 45.00 mg por placa).

- Conclusión

El extracto acetónico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* presenta actividad mutagénica a través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, debido a su acción sobre la cepa TA98. Este efecto podría atribuirse a la presencia flavonoides como la quercetina y el kaempferol, presentes en menor concentración que en los extractos acetónicos de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, y a taninos asociados a saponinas características de la planta que, según De Sá Ferreira y Vargas (1999) inducirían una acción reparativa por medio del mecanismo de escisión en el ADN dañado en presencia de S9 mix, pero en ausencia de éste, dicho mecanismo se inhibiría resultando en un efecto co-mutagénico. Se necesitarían realizar más ensayos para corroborar estas conclusiones. Estos estudios deben ser completados con otros que involucren el estudio de los compuestos presentes en cada uno de los extractos.

6.1.4 Comparación de resultados de los ensayos de Salmonella Microsoma en los extractos acuoso, clorofórmico y acetónico de *dumosa* var. *dumosa*, sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sin y con activación metabólica

El extracto acuoso de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no presentó mutagenicidad frente a TA98 ni frente a TA100 en las dosis estudiadas (0.45 a 45 mg/placa).

El extracto clorofórmico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* presenta actividad mutagénica a través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, debido a su acción sobre la cepa TA98. Este resultado podría atribuirse a la concentración de cafeína, que por su afinidad por el solvente cloroformo, se encuentran en mayor concentración. Las enzimas microsomales presentes en los ensayos con S9 mix modificarían estos compuestos suprimiendo su acción mutagénica al ser metabolizados. Este efecto mutagénico no es observado en el extracto acuoso de la planta debido a que el mismo contiene cantidades muy bajas de cafeína, del orden de 0.1 a 0.2% (Maiocchi y Avanza, 1997) (Tabla 6.18).

El extracto acetónico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* presenta actividad mutagénica en el ensayo Salmonella microsoma a través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, debido a su acción sobre la cepa TA98. La presencia de S9 mix disminuiría su acción.

Este efecto podría atribuirse a la presencia flavonoides como la quercetina, rutina y el kaempferol, presentes en menor concentración que en los extractos acetónicos de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, y a taninos asociados a saponinas características de la planta que, según De Sá Ferreira y Vargas (2009) inducirían una acción reparativa por medio del mecanismo de escisión en el ADN dañado en presencia de S9 mix, pero en ausencia de éste, dicho mecanismo se inhibiría resultando en un efecto co-mutagénico. Se debe tener presente que la mutagenicidad encontrada en cada uno de los extractos son resultado de la acción conjunta de los compuestos que contienen.

Tabla 6.18: Parámetros de las curvas de dosis-respuesta llevadas a cabo sobre el extracto acuoso (YDD), clorofórmico (YDD_{cl}) y acetónico (YDD_{acet}) de *Ilex dumosa* var. *dumosa*, con la cepa TA98, sin y con S9mix

| Linealidad dosis-respuesta | Cepa TA98 | | | | | |
|---|---------------------|------------|---|------------|--|------------|
| | Extracto Acuoso YDD | | Extracto Clorofórmico YDD _{cl} | | Extracto Acetónico YDD _{acet} | |
| | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix | Sin S9 mix | Con S9 mix |
| a | - | - | -727.25 | - | -746.61 | -32.73 |
| b | - | - | 63.97 | - | 2299.23 | 782.00 |
| r ² | - | - | 0.991 | - | 0.998 | 1.00 |
| Rango de concentración (mg/placa) | - | - | 15.00-30.00 | - | 0.45-1.00 | 0.20-0.70 |

a, ordenada al origen (revertantes por placa)

b, pendiente (revertantes por placa/dosis)

r², coeficiente de determinación

6.2 Mutagenicidad *in vivo* de *Ilex dumosa* var. *dumosa*: Ensayo de inducción de Micronúcleo en médula osea de ratón

- Ensayo de Micronúcleo en extractos de *Ilex dumosa* var. *dumosa*

Los extractos orgánicos clorofórmico y acetónico de la hoja de *Ilex dumosa* var. *dumosa* mostraron mutagenicidad. Sin bien el extracto acetónico mostró mayor acción mutagénica sobre la cepa TA98, se decidió elegir el extracto clorofórmico de la planta

para poder correlacionar los resultados con los con los hallados en el mismo tipo de extracto de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*.

El ensayo se realizó de forma equivalente al procedimiento realizado para el extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* (Capítulo 5, sección 5.2).

La Tabla 6.19 muestra los pesos promedio de cada grupo de ratones inyectados con los controles negativo, positivo y las dosis del extracto clorofórmico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*.

Tabla 6.19: Peso de ratones utilizados en el ensayo de Micronúcleo antes de ser inyectados con el Control negativo, el control positivo y las dosis de *Ilex dumosa* var. *dumosa* (en gramos de peso corporal).

| Jaula 1 | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------|
| Control negativo | | | Control Positivo | | |
| | Sol. Fisiológica (NaCl 0.9%) | | | Ciclofosfamida (50.0 mg/kg p.c.) | |
| Cantidad de marcas en ratón | Peso (g) | Cantidad de marcas en ratón | Peso (g) | Cantidad de marcas en ratón | Peso (g) |
| 1 | 24.5 | 1 | 28.2 | | |
| 2 | 27.1 | 2 | 26.1 | | |
| 3 | 26.2 | 3 | 26.6 | | |
| 4 | 25.3 | 4 | 27.4 | | |
| 5 | 25.2 | 5 | 27.3 | | |
| ($\bar{x} \pm SD$) | 25.7 ± 1.0 | ($\bar{x} \pm SD$) | 27.1 ± 0.8 | | |

| Jaula 3 | | | Jaula 4 | | |
|--|----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|
| <i>Ilex dumosa</i> (extracto clorofórmico) | | | | | |
| | 500 mg/kg p.c. | | 2000 mg/kg p.c. | | 1000 mg/kg p.c. |
| Cantidad de marcas en ratón | Peso (g) | Cantidad de marcas en ratón | Peso (g) | Cantidad de marcas en ratón | Peso (g) |
| 1 | 24.3 | 1 | 27.2 | 1 | 26.1 |
| 2 | 26.6 | 2 | 24.2 | 2 | 27.4 |
| 3 | 27.5 | 3 | 26.8 | 3 | 27.0 |
| 4 | 28.0 | 4 | 26.1 | 4 | 25.8 |
| 5 | 26.5 | 5 | 28.2 | 5 | 26.1 |
| ($\bar{x} \pm SD$) | 26.6 ± 1.4 | ($\bar{x} \pm SD$) | 26.5 ± 1.5 | ($\bar{x} \pm SD$) | 26.5 ± 0.7 |

La Tabla 6.20 muestra la incidencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE) en cantidad y porcentaje, obtenidos de un recuento total de 10000 eritrocitos

policromáticos (PCE) (2000 PCE contados por animal) y el índice de toxicidad (I) determinado por la relación entre PCE y eritrocitos normocromáticos (NCE) en un recuento total de 500 eritrocitos por animal.

El ensayo se realizó junto con los ratones inyectados con los extractos de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, utilizando los mismos controles negativos y positivos (Capítulo 5, sección 5.2).

Tabla 6.20: Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE) en médula ósea de ratón e índice de toxicidad (I) de grupos de 5 ratones tratados con un control negativo (NaCl 0.9%), un control positivo (ciclofosfamida 50.0 mg/kg p.c.) y tres concentraciones de extracto clorofórmico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa*.

| TRATAMIENTO | PCE | NCE | I=PCE/NCE | PCE contados | MNPCE (N°) | MNPCE (%) |
|--|--------------------------|--------------------------|-------------------|--------------|------------------|-------------------|
| NaCl 0.9% | 247.0 ± 13.5 | 253.0 ± 13.5 | 0.97 | 9586 | 21 | 0.22 |
| CP ^a | 228.0 ± 9.3 ^b | 272.0 ± 9.3 ^b | 0.84 ^b | 9632 | 118 ^b | 1.23 ^b |
| <i>Ilex dumosa</i> (ext. clorofórmico) | | | | | | |
| 500 mg/kg | 256.0 ± 10.4 | 244.0 ± 10.4 | 1.05 | 9906 | 21 | 0.21 |
| 1000 mg/kg | 265.0 ± 10.9 | 235.0 ± 10.9 | 1.13 | 9573 | 22 | 0.23 |
| 2000 mg/kg | 249.0 ± 9.6 | 251.0 ± 9.6 | 0.99 | 9801 | 24 | 0.23 |

^a CP, Ciclofosfamida, 50.0 mg/kg peso corporal, control positivo

^b, P < 0.05

PCE, Eritrocitos policromáticos en 500 eritrocitos; NCE, Eritrocitos normocromáticos; I, Índice de toxicidad

Valores de PCE y NCE promedio ± desviación estándar

No hubo un aumento significativo ($P > 0.05$) en el número de eritrocitos policromáticos micronucleados ni en el índice de toxicidad en la médula ósea de los ratones inyectados con 500, 1000 y 2000 mg/kg p.c. de extracto clorofórmico de hojas *Ilex dumosa* var. *dumosa* respecto del control negativo. Los resultados mostraron que el extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no era clastogénico en las condiciones del experimento.

Verges y colaboradores (2004) realizaron pruebas de punción cutánea y de provocación alimentaria para evaluar la producción de reacciones alérgicas en animales de experimentación con *Ilex dumosa* Reisseck. Para ello trabajaron con ratas machos de la cepa “Instituto de Biología” del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biofarmacológicas (INBIFAR) de la Facultad de Medicina de la Universidad del Nordeste (UNNE), de 250 g de peso corporal. Llevaron a cabo dos experimentos para evaluar la alergenicidad de las infusiones y extractos de *Ilex dumosa*, con administraciones por vía oral o por vía intraperitoneal durante 42 días. Sus conclusiones

indicaron que las infusiones de *Ilex dumosa* en animales no producían alergia alimentaria ni dérmica.

Informes de estudios previos no sistematizados y una presentación al 1^a Congresso Sul-Americano de Erva Mate y 2^a Reuniao Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da Erva-Mate, (Bonfiglio, N. y col., 1997) sugieren que los extractos de *Ilex dumosa*, administrados por 91 días, vía oral, en dosis de 200 y 400 mg/kg/día, a ratas Wistar, pueden desarrollar efectos adversos sobre el área hematológica, principalmente producción de hemólisis intravascular. Sin embargo se han realizado estudios sobre las acciones farmacológicas de la infusión de *Ilex dumosa* Reisseck en ratas (López Campanher y col., 2000) que demuestran lo contrario. Para ello se administró por vía oral 400 mg/kg/día de extracto acuoso de la planta a ratas de aproximadamente 250 gramos durante 60 días, no indicando cambios fisiológicos o patológicos en los animales en estudio.

Ensayos de micronúcleo en extractos de *Ilex dumosa* no han sido informados.

Comparando los resultados encontrados con los hallados en los extractos clorofórmicos de hojas de yerba mate, se puede afirmar que *Ilex dumosa* var. *dumosa* no presenta efectos clastogénicos o aneuploidogénicos *in vivo* y que *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* sí podría presentar efectos clastogénicos si se confirmara la relación dosis-respuesta. La diferencia en la concentración de cafeína podría jugar un papel fundamental en los hallazgos encontrados por las razones planteadas en los ensayos de mutagenicidad.

- Conclusión

El extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no evidenció efectos clastogénicos o aneuploidogénicos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón, tampoco modificación en la eritropoyesis en las dosis ensayadas (500, 1000 y 2000 mg/kg p.c.). Teniendo en cuenta que la mayor actividad mutagénica sobre la cepa TA98 se observó en el extracto acetónico de la planta, sería importante realizar el ensayo de micronúcleos en este extracto.

6.3 Ensayo de Antimutagenicidad en *Ilex dumosa* var. *dumosa*.

Considerando las razones planteadas en el capítulo 5, sección 5.3, y teniendo en cuenta que los ensayos de mutagenicidad *in vitro* en *Ilex dumosa* var. *dumosa* realizados en el presente trabajo confirmaron acción mutagénica en los extractos clorofórmico y

acetónico de hojas secas, se descartó la posibilidad de que los tres extractos de la planta presenten propiedades antimutagénicas.

Futuros estudios deben ser realizados a efectos de cumplimentar estos hallazgos tendientes a caracterizar cuali y cuantitativamente los extractos y evaluar su capacidad antioxidante.

Teniendo en cuenta los ensayos realizados, las infusiones de *Ilex dumosa* var. *dumosa* presentan menores efectos nocivos que las infusiones de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* cuando se las consume en altas cantidades, principalmente por la baja concentración de cafeína, posible responsable de los efectos clastogénicos en la yerba mate. Por esta razón las infusiones de *Ilex dumosa* var. *dumosa* constituirían un buen sustituto del mate.

La gestión de la empresa correntina Las Marías para que la Comisión Nacional de Alimentación de la Nación (CONAL) reconozca a la variedad *Ilex dumosa* como “yerba mate” dentro del Código Alimentario Argentino fue rechazada el 29 de septiembre de 2006. Una de las razones planteadas fue la baja concentración de cafeína, la cual, a la luz de los resultados presentados, sería conveniente disminuir en su porcentaje (el CAA establece un valor mayor a 0.6%) dada su posible actividad mutagénica y clastogénica.

7. Conclusiones

- El extracto acuoso de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* presenta actividad mutagénica a través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, debido a su acción sobre la cepa TA98. Este resultado podría atribuirse a la presencia de altas concentraciones de cafeoil derivados, como el ácido clorogénico, que es el compuesto más importante dentro del grupo y es predominante en el extracto acuoso. La presencia de altas concentraciones de Mn^{+2} presente en la infusión (mate), haría que el ácido clorogénico produzca la degradación del ADN a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Stich y col., 1981a,b; Duarte y col., 1999; Franke, Ckless, Silveira y col., 2004). Podrían contribuir a este efecto mutagénico los flavonoides presentes en yerba mate, como son la quercetina, la rutina y el kaempferol que actuarían como agentes prooxidantes (Trueba 2003). También se propone la contribución de la cafeína, xantina mayoritaria de las hojas de yerba mate, que se encuentra también presente en las infusiones de la planta en altas concentraciones.
- La metabolización hepática disminuye la mutagénesis inducida. Por lo tanto el sistema P450 de los mamíferos presenta capacidad de reducir el efecto mutagenico observado en los ensayos sin actividad metabolica. La enzima catalasa podría ser el factor responsable de la disminución de la genotoxicidad (Duarte y col. 1999).
- No se observó mutagenicidad a través del mecanismo de sustitución de pares de bases en el marco de lectura (ausencia de mutagenicidad con la cepa TA100) como indican otros autores (Leitao y Braga, 1994; Fonseca y col., 2001). Esto puede deberse a las variaciones de concentración de las sustancias dentro de una misma especie y más aún si son cultivadas en distintos países y a las diferentes condiciones de preparación de los extractos.
- El extracto clorofórmico de hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* presenta actividad mutagénica sobre la cepa de Salmonella TA98 través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura TA98. Dicha actividad es aún mayor que en el extracto acuoso de la planta. Este resultado podría atribuirse a la presencia de altas concentraciones de cafeína que por su afinidad por el solvente cloroformo, se encontraría en mayor concentración. También podrían contribuir a la

mutagenicidad la presencia de compuestos aromáticos policíclicos como el benzo[a]pireno y el fluoranteno, informados como mutagénicos para TA98 y TA100 en presencia de S9 mix.

Las enzimas microsomales presentes en los ensayos con S9 mix modificarían estos compuestos ejerciendo una disminución de la inducción de la mutagenicidad a altas concentraciones, observándose el mismo patrón que en el extracto acuoso.

- También se observó mutagenicidad en presencia de la cepa TA100, cuyo mecanismo de acción es a través de la sustitución de pares de bases. Se sugirió la presencia de compuestos policíclicos aromáticos (PAHs), como el benzo[a]pireno, que se encontrarían concentrados en el solvente orgánico y que su actividad en el extracto acuoso no se observaría debido a la baja cantidad de los mismos en la infusión. Las enzimas microsomales presentes en los ensayos con S9 mix modificarían estos compuestos presentes en el extracto clorofórmico potenciando su acción mutagénica.
- El extracto acetónico de hojas de *Ilex paraguariensis var. paraguariensis* presenta actividad mutagénica a través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, debido a su acción sobre la cepa TA98. Este efecto podría atribuirse a la presencia principal de flavonoides como la quercetina y el kaempferol. El aumento significativo de la actividad mutagénica en presencia de S9 mix podría deberse a la biotransformación (activación) del kaempferol a quercetina a través del sistema P450 (CYP) mono-oxigenasa (Duarte Silva y col., 1997).
- Los ensayos de mutagenicidad *in vivo* realizados en el extracto clorofórmico mostraron una posible actividad clastogénica en concentraciones de 2000 mg/kg p.c. aunque no se pudo demostrar la relación lineal de dosis-respuesta. La sustancia principal responsable de esta actividad podría ser la cafeína, concentrada en este extracto. Otros autores como Wnuk y colaboradores (2009) han hallado mutagenicidad en linfocitos humanos para extractos acuosos de yerba mate y cafeína sola, atribuyendo su acción en la infusión a esta última.

- Considerando que también se halló mutagenicidad en el extracto acetónico de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, sería importante también realizar un ensayo de mutagenicidad *in vivo* en dicho extracto.
- Es importante recordar que el mate es una infusión caliente de *Ilex paraguariensis*, donde el calor puede producir lesiones esofágicas (Victoria y col. 1987). Sin embargo, el presente trabajo sugiere que la injuria térmica no es la única causa determinante de la generación de cáncer esofágico y orofaríngeo sino también las sustancias que contiene la bebida caliente.
- Los ensayos de mutagenicidad *in vitro* e *in vivo* en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* realizados en el presente trabajo confirmaron la acción mutagénica y genotóxica en los tres extractos de hojas secas.
Estos hallazgos estarían descartando en forma definitiva la posibilidad de los extractos de las hojas de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* presenten propiedades antimutagénicas
- El extracto acuoso de las hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no presenta mutagenicidad en los rangos de concentración investigados (0.45 a 45.00 mg/placa). Esto puede deberse a que este extracto presenta cantidades significativamente menores de polifenoles como cafeoil derivados y flavonoides y de cafeína, compuestos a los que se les atribuyó la actividad mutagénica observada en el Ensayo de Salmonella microsoma con la cepa TA98 en presencia de los extractos acuosos de *Ilex paraguariensis* var. *Paraguariensis*.
- El extracto clorofórmico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* presenta actividad mutagénica en el ensayo de Salmonella microsoma a través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, debido a su acción sobre la cepa TA98. Este resultado podría atribuirse a la concentración de cafeína, que por su afinidad por el solvente cloroformo, se encuentra en mayor concentración. Las enzimas microsomales presentes en los ensayos con S9 mix modificarían este compuesto suprimiendo su acción mutagénica. Este efecto no es observado en el extracto acuoso debido a que el mismo contiene una baja concentración de cafeína. Estudios

posteriores tendientes a evaluar cuali y cuantitativamente el contenido de cafeína en el extracto permitiría dar sustento a las hipótesis planteadas.

- No se observó mutagenicidad en el extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* en presencia de la cepa TA100, cuyo mecanismo de acción es a través de la sustitución de pares de bases. Se sugirió la ausencia de compuestos como los policíclicos aromáticos (PAHs), entre otros, a los cuales se les atribuyó la mutagenicidad observada en el extracto clorofórmico de yerba mate.
- El extracto acetónico de hojas de *Ilex dumosa* var. *dumosa* presenta actividad mutagénica a través del mecanismo de desplazamiento en el marco de lectura, debido a su acción sobre la cepa TA98. Este efecto podría atribuirse a la presencia flavonoides como la quercetina y el kaempferol, presentes en menor concentración que en los extractos acetónicos de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, y a taninos asociados a saponinas características de la planta que, según De Sá Ferreira y Vargas (1999) inducirían una acción reparativa por medio del mecanismo de escisión en el ADN dañado en presencia de S9 mix, pero en ausencia de éste, dicho mecanismo se inhibiría resultando en un efecto co-mutagénico. Se necesitarían realizar más ensayos para corroborar estas conclusiones.
- El extracto clorofórmico de *Ilex dumosa* var. *dumosa* no evidenció efectos clastogénicos o aneuploidogénicos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón, tampoco modificación en la eritropoyesis en las dosis ensayadas (500, 1000 y 2000 mg/kg p.c.).
- Teniendo en cuenta que la mayor actividad mutagénica sobre la cepa TA98 se observó en el extracto acetónico de la planta, sería importante realizar el ensayo de micronúcleos en este extracto.
- Considerando que los ensayos de mutagenicidad *in vitro* en *Ilex dumosa* var. *dumosa* realizados en el presente trabajo confirmaron acción mutagénica en los extractos clorofórmico y acetónico de hojas secas, se descartó la posibilidad de que los tres extractos de esta planta presenten propiedades antimutagénicas.

- Estos estudios deben ser complementados con otros que involucren el estudio de los compuestos presentes en cada uno de los extractos.
- Estos resultados abren nuevos interrogantes y dejan abiertas futuras investigaciones tendientes a estudiar la composición química de los extractos de ambas plantas mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y mediante columnas preparativas separar sus constituyentes. Estas fracciones deberán ser estudiadas en su acción mutagenica y así avanzar en el conocimiento de los posibles causantes del efecto mutagénico observado.
- Teniendo en cuenta los ensayos realizados, las infusiones de *Ilex dumosa* var. *dumosa* presentan menores efectos nocivos que las infusiones de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* cuando se las consume en altas cantidades, principalmente por la baja concentración de cafeína, posible responsable de los efectos clastogénicos en la yerba mate. Por esta razón las infusiones de *Ilex dumosa* var. *dumosa* constituirían un buen sustituto del mate.

8. Bibliografía

- Abós A.2002. Macedonio Fernández, la biografía imposible. Plaza Janés Editores, Buenos Aires.
- Aeschbacher H.U., Meier H., Jaccaud E. 1986. The effect of caffeine in the *in vivo* SCE and micronucleus mutagenicity tests. *Mutat. Res.*, 174(1):53-8.
- Albertini R., Anderson D., Douglas G., Hagmar J., Hemminki K., Merlo F., Nataranja A., Norpp H., Shuker D., Tice R., Waster M., Aitio A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.*, 463:111-172.
- Alia M., Ramos S., Matcos R., Granado-Serrano A.B., Bravo L., Goya L. 2006. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 212:110–8.
- Ames B.N.1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxigenradical and degenerative diseases. *Science*, 221: 1256-1264.
- Ames B.N., Profet M. and Gold L.S. 1997. The causes and prevention of cancer gaining perspective. *Environmental Health Perspectives*, 105: 4865-4873.
- Amimoto K., Yoshikawa K., Arihara S. 1993. Triterpenes and triterpene glycosides from the leaves of *Ilex rotunda*. *Phytochem.*, 33:1475–80.
- Andersen T., Fogh J. 2001.Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *J. Hum. Nutr. Diet.*, 14:243–50.
- Anesini C., Ferraro G., Filip R. 2006. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. *Food Chem.*, 97:459–64.
- Arbiser J.L., Li X.C.,Hossain C.F.,Nagle D.G., Smith D.M., Miller P.,Govindarajan B., Di Carlo J., Landis-Piwowar K.R., Dou Q.P. 2005. Naturally occurring proteasome inhibitors from Mate tea (*Ilex paraguayensis*) serve as models for topical proteasome inhibitors. *J. Invest. Dermatol.*, 125:207–12.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Rodríguez Y., Martin Y., Díaz D.2009. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c y OF-1. *Retel*, 24(2):7- 29.
- Arencibia D.F., Vidal A., Rosario L.A., Suarez Y.E., Delgado L. 2011. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *VacciMonitor*, 20(1):28-33. www.finlay.sld.cu/vaccimonitor.htm

- Athayde M.L., Coelho G.C., Schenkel E.P. 2000. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St-Hil Phytochem., 55:853–7.
- Barnes W., Tuley E., Eisenstadt E.1982. Base-sequence analysis of HisC revertants of the *hiG46* missense mutation in *Salmonella typhimurium*, Environ. Mutagen. 4-297 (abstr. Aa-1).
- Attia S., Kliesch U., Schriever-Schwemmer G., Badary O., Hamada F., Alder D. 2003. Etoposide and merbarone are clastogenic and aneugenic in the mouse bone marrow micronucleus test complemented by fluorescence in situ hybridization with the mouse minor satellite DNA probe. Environ. Mol. Mutagen. 24:51-60.
- Barret R.1910. Lo que son los yerbales. Talleres Gráficos “El Arte”, Montevideo.
- Bastos D.H.M., Fornari A.C., Queiroz Y.S., Torres E.A.F.S. 2006. Bioactive compounds content of Chimarrao infusions related to the moisture of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. Braz. Arch. Bio. Tech., 49:399–404.
- Bates M.N., Hopenhayn C., Rey O.A., Moore L.E. 2007. Bladder cancer and Mate consumption in Argentina: a case-control study. Cancer Lett., 246:268–73.
- Bhaskar Gollapudi B., McFadden L.G. 1995. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. Mutat. Res., 347(2): 97-99.
- Bixby M., Spieler L., Menini T., Gugliucci A. 2005. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. Life Sci., 77:345–58.
- Bohm H., Boeing H., Hempel J., Raab B., Krok A. 1998. Flavonols, Flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. Ernahrungswiss, 2:147-63
- Boletín Oficial de la República Argentina (BORA) N° 29.859 y 29.940. 2002. Instituto Nacional de la Yerba Mate. Ley N° 25.564 y Decreto 1240/2002. *Buenos Aires*.
- Bolsi A. 1988. Misiones (una aproximación geográfica al problema de la yerba mate y sus efectos en la ocupación del espacio y el doblamiento) Folia Histórica del Nordeste N°7. Instituto de Historia, Facultad de Humanidades (UNNE); Instituto de Investigaciones Neohistóricas, CONICET, FUNDANORD. Resistencia.
- Bonfiglio N., Valduga E., Paz R., Stankiewicz A., Cechette D., Dieterich S. 1997. Avaliacao dos possiveis efeitos toxicos do extrato de *Ilex dumosa* Reiss. Parte 2 –

- determinaciones hematológicas. Congreso Sul-americano da Erva- Mate, 1.; Reunión Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da Erva- mate, 2. Curitiba. Anais. Colombo: Embrapa-CNPQ, pág. 413.
- Bos R.P., Prinsen W.J., Van Rooy J.G., Jongeneelen F.J., Theuvs J.L., Henderson P.T. 1987 Fluoranthene, a volatile mutagenic compound, present in creosote and coal tar. *Mutat. Res.*, 187(3): 119-25.
 - Bracesco N., Dell M., Rocha A., Behtash S., Menini T., Gugliucci A., Nunes E. 2003. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *J. Altern. Complement Med.*, 9:379–87.
 - Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56:317-33.
 - Bravo L., Goya L., Lecumberri E. 2007. LC/MS characterization of phenolic constituents of Mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Res. Int.*, 40:393–405.
 - Brown J.E., Khodr H., Hider R.C., Rice-Evans C.A. 1998. Structural dependence of flavonoids interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J*, 330:1173-8.
 - Bunge A. 1934. La cercana tragedia del mate. *Revista de Economía Argentina* N° 188, Buenos Aires.
 - Cañigeral S., Vila R., Wihtl M. 1998. (Eds) Plantas medicinales y drogas vegetales para infusión y tisana. Manual para Farmacéuticos y Médicos. Milan: OEMF International srl.
 - Carducci C.N., Dabas P.C., Muse J.O. 2000. Determination of inorganic cations by capillary ion electrophoresis in *Ilex paraguariensis* (St. H.), a plant used to prepare tea in South America. *J. AOAC Int.*, 83:1167–73.
 - Caria H., Chaveca T., Laires A., Rueff J. 1995 Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 343:85-94.
 - Carini M., Facino R.M., Aldini G., Calloni M., Colombo L. 1998. Characterization of phenolic antioxidants from Mate (*Ilex paraguayensis*) by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun in Mass Spec.*, 12:1813–9.

- Carver J.H., Carrano A.V., MacGregor J.T. 1983. Genetics effects of the flavonols quercetin, kaempferol, and galangin on chinese hamster ovary cells in vitro. *Mutat. Res.*, 113:45-60.
- Castellsague X., Munoz N., De Stefani E., Victora C.G., Castelletto R., Rolon P.A. 2000. Influence of Mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. *Int. J. Cancer*, 88:658–64.
- Catena C., Conti D., Villani P., Nastasi R., Archilei R., Righi E. 1994. Micronuclei and 3AB in human and canine lymphocytes after *in vitro* X- irradiation. *Mutat. Res.* 312:1-8.
- Chandra S., De Mejia G.E. 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J. Agric. Food Chem.*, 52:3583–90.
- Channarayappa J., Ong T. 1990. Micronuclei assay in cytokinesis-blocked binucleated and conventional mononucleated methods in human peripheral lymphocytes. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 10: 273 – 279.
- Chebil L., Humeau C., Anthoni J., Dehez F., Engasser J.M., Ghoul M. 2007. Solubility of Flavonoids in Organic Solvents. *J. Chem. Eng. Data*, 52 (5): 1552–1556.
- Choi J. S., Lee H. J., Park K. Y., Ha J. O. and Kang S. S. 1997. *In vitro* antimutagenic effects of anthraquinone aglycones and naphthopyrone glycosides from *Cassia tora*. *Planta Med.*, 63: 11-14.
- Choi Y.H., Sertic S., Kim H.K., Wilson E.G., Michopoulos F., Lefeber A.W.M., Erkelens C., PratKricun S.D., Verpoorte R. 2005. Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 53:1237–45.
- Código Alimentario Argentino (C.A.A), Capítulo XV “Productos estimulantes o frutivos”– Artículo 1193
- Comisión Reguladora de la Producción y Comercio de la Yerba Mate (CRYM). 1971. La Yerba Mate. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Buenos Aires.
- Comisión Tripartita para el Incremento de la Producción Yerbatera. 1991. Video institucional e informe de gestión. Gerencia Ejecutiva. Posadas.
- Consejo Federal de Inversiones (CFI). 1975. Formación y desarrollo de las Estructuras Agrarias Regionales. Buenos Aires.

- Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT). 1988. Strain difference in the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 204: 307-316.
- Dall'Orto V.C. 2005. Comparison of tyrosinase biosensor and colorimetric method for polyphenol analysis in different kinds of teas. *Anal. Lett.*, 38:19–33.
- De Pasquale C. 1991. Controlled double-blind clinical trial of mate in subjects on a low – energy diet. *Clinica Dietológica*, 18: 27-38.
- Dertinger S., Torous D., Tometsko K. 1996. Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutat. Res.*, 371:283-292
- De Serres E.S., Shelby M.D.1979. Recommendations on data production and analysis using the Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 64: 159—165.
- De Stefani E., Correa P., Oreggia F., Deneo Pellegrini H., Fernandez G., Zavala D., Carzoglio J., Leiva J., Fontham E., Rivero S. 1988. Black tobacco, wine and Mate in oropharyngeal cancer. A case-control study from Uruguay. *Rev Epidemiol. Sante Publique*, 36:389–94.
- De Stefani E., Correa P., Fierro L., Fontham E., Chen V., Zavala D. 1991. Black tobacco, Mate, and bladder cancer. A case-control study from Uruguay. *Cancer*, 67:536–40.
- De Stefani E., Fierro L., Correa P., Fontham E., Ronco A., Larrinaga M., Balbi J., Mendilaharsu M. 1996. Mate drinking and risk of lung cancer in males: a case-control study from Uruguay. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 5:515–9.
- De Stefani E., Fierro L., Mendilaharsu M., Ronco A., Larrinaga M.T., Balbi J.C., Alonso S., Deneo-Pellegrini H. 1998. Meat intake, 'Mate' drinking and renal cell cancer in Uruguay: a case-control study. *Br. J. Cancer* , 78:1239–43.
- Dickel M.L., Rates S.M., Ritter M.R.2007. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, 109:60–71.
- Ding G., Nakahara T., Miyakoshi J. 2003. Induction of kinetochore-positive and kinetochorenegative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. *Mutagenesis* 18(5): 439-443.
- Dorr R. 1988. New findings in the pharmacokinetic, metabolic, and drug-resistance aspects of mitomycin C. *Semin Oncol* 15 Suppl 4: 32-41.

- Duarte M.P., Laires A., Gaspar J., Leao D., Santos Olivera J., Rueff J. 1999. Genotoxicity of instant coffee: posible involvement of phenolic compounds. *Mut. Res.*, 442:43-51.
- Duarte Silva I., Rodrigues A., Gaspar J., Maia R., Laires A., Rueff J. 1996. Mutagenicity of kaempferol in V79 cells: The role of cytochromes P450. *Teratogénesis, Carcinogénesis y Mutagénesis*, 16 (4): 229-241.
- Duarte Silva I., Rodriguez A., Gaspar J., Maia R., Laires A., Rueff J. 1997. Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis*, 12(5):383-390.
- Duke J.A. 1992. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. Boca Raton, Fla.: C.R.C Press.
- Ekasari I., Fokkens R.H., Bonestroo M.H., Schols H.A., Nibbering M.M.N., Pilnik W. 1993. Characterization of mutagenic compounds in heated orange juice by UV and mass spectra. *Food Chem.*, 46(1): 77-79.
- Ellard S., Parry E. 1993. A modified protocol for the cytochalasin B *in vitro* micronucleus assay using whole human blood or separated lymphocyte cultures. *Mutagenesis*, 8: 317 – 320.
- Enns G.M., Roeder E., Chan R.T., Ali-Khan Catts Z., Cox C.A., Golabi M. 1999. Apparent cyclophosphamide (cytoxan) embryopathy: a distinct phenotype?. *Am J Med Genet*, 86: 237-241.
- EPA. Environmental Protection Agency. 1998. Toxic Substances (7101). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. United States Government Printing Office Editions. Health Effects Test Guidelines Washington: IRL Press.
- Esmelindro A.A., Girardi Jdos S., Mossi A., Jacques R.A., Dariva C. 2004. Influence of agronomic variables on the composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) extracts obtained from CO2 extraction at 30 degrees C and 175 bar. *J. Agric. Food Chem.*, 52(7):1990-5.
- Fagundes R.B., Abnet C.C., Strickland P.T., Kamangar F., Roth M.J., Taylor P.R., Dawsey S.M. 2006. Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking Mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. *B.M.C Cancer*, 6:139–45.
- Falck G., Catalán F., Norppa H. 1997. Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin B. *Mutat. Res.*, 392: 71 – 79.

- Fawcett D. 1995. Tratado de histología. 12va ed. Ed. INTERAMERICANA. Madrid. Pág.:266 - 270.
- Fenech M., Neville S., Rinaldi J. 1994. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis- blocked lymphocytes. *Mutat. Res.*, 313: 203-207.
- Fenech M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.*, 455:81-95.
- Ferrandiz M.L., Alcaraz M.J. 1991. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions*, 32:283-8.
- Ferreira F. 1997. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguariensis* St Hil saponins. *Phytotherapy Res.*, 11:79–81.
- Filip R., Lopez P., Coussio J., Ferraro G. 1998 Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. *Phytotherapy Res.*, 12:129–131.
- Filip R., Lotito S.B., Ferraro G., Fraga C.G. 2000. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr. Res.*, 20:1437–46.
- Filip R., Lopez P., Giberti G., Coussio J., Ferraro G. 2001. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*, 72:774–8.
- Fonseca C.A., Otto S.S., Paumgarten F.J., Leitao A.C. 2000. Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities of Mate-Chimarrao (*Ilex paraguariensis*). *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 19:333–46.
- Franke S.I.R., Ckless K., Silveira J.D., Rubensam G., Brendel M., Erdtmann B. and Henriques J.A.P. 2004. Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices. *Food Chem.*, 88 (1): 45-55.
- Fujita Y., Wakabayashi K., Nagao M., Sugimura T. 1985. Characteristics of major mutagenicity of instant coffee. *Mutat. Res.*, 142: 227-230.
- García López A., Vizoso Parra A., Ramos Ruiz A., Piloto Ferrer J., Pavón Gonzalez V., Rodriguez Leyes E.A. 2001. Estudio toxicogenético de un polisacárido del gel de *Aloe vera* L. *Rev. Cubana Plant. Med.* 2001(2) Ciudad de la Habana.
- Gaspar J., Rodrigues A., Laires A., Silva F., Costa S., Monteiro M.J., Rueff J. 1994. On the mechanisms of genotoxicity and metabolism of quercetin. *Mutagenesis* 9: 445–449.
- Ghozlan R., Pras M., Bettoun A. 1981. Periodic arthralgia: teratogenicity of colchicines and its influence on pregnancy and sterility. *Ann. Med. Interne. (Paris)* 132: 493-495.

- Gilani S.H., Chatzinoff M. 1983. Embryopathic effects of cyclophosphamide. *Environ. Res.*, 31: 296-301.
- Giulian R., Iochims dos Santos C.E., de Moraes Shubeita S., da Silva L.M., Dias J.F., Yoneama M.L. 2007. Elemental characterization of commercial Mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) before and after hot water infusion using ion beam techniques. *J. Agric. Food Chem.*, 55:741–6.
- Gnoatto S.C.B, Schenkel E.P., Bassani V.L. 2005. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *J. Braz. Chem. Soc.*, 16:723–6.
- Goldenberg D. 2002. Mate: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.*, 38:646–9.
- Goldenberg D., Golz A., Joachims H.Z. 2003. The beverage Mate: a risk factor for cancer of the head and neck. *Head Neck*, 25:595–601.
- Goldenberg D., Lee J., Koch W.M., Kim M.M., Trink B., Sidransky D., Moon C.S. 2004. Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 131:986–93.
- Gonzalez de Mejia E., Song Y.S., Ramirez-Mares M.V., Kobayashi H. 2005. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. *J. Agric. Food Chem.*, 53:1966–73.
- Gorgen M., Turatti K., Medeiros A.R., Buffon A., Bonan C.D., Sarkis J.J., Pereira G.S. 2005. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* decreases nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *J. Ethnopharmacol.*, 97:73–7.
- Gortari J. 2001. Economía política del tractorazo. *Diario El Territorio, Suplemento dominical, Posadas, 17 de junio de 2001.*
- Gortari J. El Mercosur y la economía yerbatera. 1997. *Anales del Primer Congreso Sudamericano sobre la Cultura de la Yerba Mate. Realidad Económica N° 154, Instituto Argentino para el Desarrollo Económico, Bs.As., 1988.*
- Gorzalczany S., Filip R., Alonso M.R., Mino J., Ferraro G.E., Acevedo C. 2001. Choleric effect and intestinal propulsion of 'Mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *J. Ethnopharmacol.*, 75:291–4.
- Goshima G., Kiyomitsu T., Yoda K., Yanagida M. 2003. Human centromere chromatin protein hMis12 essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J. Cell. Biol.* 160: 25-39.
- Gosmann G., Guillaume D., Taketa A.T., Schenkel E.P. 1995. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. *J. Nat. Prod.*, 58:438–41.

- Grawé J., Zetterberg G., Amnéus H. 1993. DNA content determination of micronucleated polychromatic erythrocytes induced by clastogens and spindle poisons in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutagenesis* 8: 249-255.
- Groot H. de, Rauén U. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 3:249-55.
- Guerrero-García R. 1997. Manual de Laboratorio de Hematología. Universidad Veracruzana, México. Pág. 39, 45, 50.
- Gugliucci A. 1996. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 224:338-44.
- Gugliucci A., Menini T. 2002. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. *Life Sci.*, 72:279-92.
- Gugliucci A., Stahl A.J. 1995. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 35:47-56.
- Gupta P., Sharma T. 1981. Nonrandom distribution of aberrations and identification with C and G bandings of the position of breakage points on muntjac chromosome induced by mitomycin C, bromodeoxyuridine and hydroxylamine. *Mutat. Res.*, 81:63-74.
- Hamada S., Slade H.D. 1980. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, 44: 331-384.
- Hamada S., Yamasaki K., Nakanishi S., Omori T., Serikawa T., Hayashi M. 2001. Evaluation of general suitability of the rat for the micronucleus assay: the effect of cyclophosphamide in 14 rats. *Mutat. Res.* 495: 127-134.
- Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S. 1994. The correlation between active oxygen and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, 16:845-50.
- Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K., Speck W., Zeiger E. 1983. *Salmonella* mutagenicity results for 250 chemicals, *Environ. Mutagen.*, 5: 3-142(Suppl.).
- Hayashi M., Sofuni T., Ishidate M. 1982. High sensitivity in micronucleus induction of a mouse strain (MS). *Mutat. Res.*, 105: 253-256.
- Hayashi M., Norppa H., Sofuni T., Ishidate M. 1992 a. Mouse bone marrow micronucleus test using flow cytometry. *Mutagenesis*, 7:251-256.
- Hayashi M., Norppa H., Sofuni T., Ishidate M. 1992 b. Flow cytometric micronucleus test with mouse peripheral erythrocytes. *Mutagenesis*, 7: 257-264.

- Hayashi M., Tice R., Macgregor J.T., Anderson D., Blakey D., Kirsh-Volders M. 1993. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mut. Res.* 5:120-134.
- Hayashi M., McGregor J., Gatehouse D., Adler I., Blakey D., Detinger S., Krishna G., Monta T., Russo A., Sutou S. 2000. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35:234-252.
- Heddle J., Lue C., Saunder E., Benz R. 1978. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as a measure by micronucleus method. *Cancer Res.* 38: 2983-2988.
- Heddle J.A., Hite M., Kerthart B.K., Mavournin J.T., MacGregor G., Newll W., Salamone M.F. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 123:61-118.
- Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M.D., Tucker J.D., Vanparys P., MacGregor J.T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.* 18: 277-291.
- Herrera A., Barrueco C., Caballo C., Peña E. 1992. Effect of permethrin on induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultures human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, 20:218-228.
- Hodnick W.F., Kung F.S., Roettger W.J., Bohmont C.W., Pardini R.S. 1986. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem. Pharmacol.*, 35:2345-57.
- INYM 2006. <http://www.inym.org.ar>.
- Isono K., Yourno J. 1974. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: *Salmonella* DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71:1612-1617.
- Ito E., Crozier A., Ashihara H. 1997. Theophylline metabolism in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1336:323-30.
- Junqueira L., Carneiro J. 1996. *Histología básica*. 4a ed. Ed. Masson, S.A. México. pág: 229-245.
- Kada T. Environmental desmutagens and antimutagenic agents. *Environ. Mutagen.* 1984; 240:135-151.

- Kada T., Kaneko K., Matsuzaki T., Hara Y. 1985. Detection and Chemical identification of natural bio-antimutagens. A case of the green tea factor. *Mutat. Res.*, 150: 127-132.
- Kamangar F., Schantz M., Abnet C.C., Fagundes R., Dawsey S. 2008. High levels of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mate Drinks. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17(5):1262–8.
- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Ardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate J., Lorge E., Norppa H., Surrallés J., Hude W., Wakata A. 2000. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Environ Mol Mutagen* 35:167-172.
- Kojima H., Miwa J.M., Mori M., Masahiro O. Konishi H. 1989. Desmutagenic effect of oolong tea. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 30: 233-239.
- Kraemer K.H., Taketa A.T., Schenkel E.P., Gosmann G., Guillaume D. 1996. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. *Phytochemistry*, 42:1119–22.
- Krishna G., Brott D., Urda G., McKeel M., Zandee J., Theiss J. 1993. Comparative micronucleus quantitation in pre- and post-column fractionated mouse bone marrow by manual and flow methods. *Mutat. Res.*, 302: 119-127.
- Krishna G, Urda G, Theiss J. 1994. Comparative mouse micronucleus evaluation in bone marrow and spleen using immunofluorescence and Wright's Giemsa. *Mutat Res* 323:11-20.
- Krishna G., Hayashi M. 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.*, 455:155-166.
- Kubo I., Muroi H., Masaki H. 1993. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. *J. Agr. Food Chem.*, 41: 107-111.
- Kusamram W.R., Tepsuwan A. and Kupradium P. 1998. Antimutagenic and anticarcinogenic potential of some Thai vegetables. *Mutation Res.*, 402: 247-258.
- Lanzani, A., Cardillo, M., Petrini, M. C. 1979. Preparazione di concentrati proteici da semi di girasole per via umida. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 56: 48-51.
- Leitao A.C., Braga R.S. 1994. Mutagenic and genotoxic effects of Mate (*Ilex paraguariensis*) in prokaryotic organisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27:1517–25.
- Levin D.E., Yamasaki E., Ames E. 1982a. A new *Salmonella* tester strain for the detection of frameshift mutagens: a run of cytosines as a mutational hot-spot, *Mutat. Res.*, 94:315–330.

- Levin D.E., Hollstein M.C., Christman M.F., Schwiers E.A., Ames B.N. 1982b. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A:T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79: 7445–7449.
- Lima J.B., Da-Cunha M.P., Da Silva R.C., Galardo A.K. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg., 68: 329-333.
- Lindahl M., Tagesson C. 1997. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. Inflammation , 21:347-56.
- Lindholm C., Norppa H., Hayashi M., Sorsa M.1991. Induction of micronuclei and anaphase by cytochalasin B in human lymphocytes cultures. Mutation Research, 260: 369 – 375.
- López Campanher A., Malgor L., Valsecia M., de Markowsky E., Mendoza L. 2000. Estudio de las acciones farmacológicas de una nueva especie de yerba mate: *Ilex dumosa* Reiss en línea en: <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2000/cyt.htm> .
- Loria D., Barrios E., Zanetti R. 2009. Cancer y *yerba mate* consumption: a review of possible associations. Rev. Panam. Salud Pública, 25(6): 530-9.
- Lunceford N., Gugliucci A. 2005. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. Fitoterapia, 76:419–27.
- Mac Gregor J.T., Wehr C.M., and Gould D.H. 1980. Clastogen-induced micronuclei an peripheral erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. Environ. Mutagen, 2: 509-514.
- Maei Y., Schmid W. 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis chemical mutagens. Principles and methods for their detection. Ed. Hollander. Plenum Press. New York; 4: 31-34.
- Maiocchi, M.G., Avanza, J.R. 1997. Contenidos en saponinas de los extractos de *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas - UNNE.
- Malaveille C., Hautefeuille A., Pignatelli B., Talaska G., Vineis P., Bartsch H. 1996. Dietary phenolics as anti-mutagens and inhibitors of tobacco related DNA adduction in the urothelium of smokers. Carcinogenesis, 17: 2193–2200.
- Malling H.V. 1971. Dimethylnitrosamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes, Mutat. Res., 13: 425–429.

- Marchisio P.F., Sales A., Cerutti S., Marchevski E., Martinez L.D. 2005. On-line preconcentration/ determination of lead in *Ilex paraguariensis* samples (Mate tea) using polyurethane foam as filter and USN-ICP-OES. *J. Hazard Mater*, 124:113–8.
- Maron D.M. and Ames B.N. .1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113: 173–215.
- Martinet A., Hostettmann K., Schutz Y. 1999. Thermogenic effects of commercially available plant preparations aimed at treating human obesity. *Phytotherapy Research* 6:231–8.
- Martinet A., Ndjoko K., Terreaux C., Marston A., Hostettmann K., Schutz Y. 2001. NMR and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. *Phytochem. Anal.*, 12:48–52.
- Marx F., Janssens M. J. J., Urfer P., Scherer R. 2003. Caffeine and Theobromine Composition of Mate (*Ilex paraguariensis*) Leaves and five Plantations of Misiones, Argentina. *Plant Food of Human Nutrition* 58: 1-8.
- Mattern I.E. 1981. Basis of evaluation of an Ames test. *Prog. Mutat. Res.* 2: 187-190.
- Mazzafera P. 1997. Mate drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chem.*, 60:67–71.
- Millin D.J., Cruickshank D. 1988. Hot beverages coffee, tea, cocoa and others, in: Ranken Ed., *Food Industries Manual*, 2nd edition., New York, pp. 216–226.
- Miura Y.H., Tomita I., Watanabe T., Hirayama T. 1998. Fukui S. Active oxygen generation by flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.*, 21:93-6.
- Momarandú.com *diario on line*, Corrientes, edición del 27 de agosto de 2006.
- Montero R., Serrano L., Dávila V., Segura Y., Arrieta A., Fuentes R., Abad I., Valencia L., Sierra P., Camacho R. 2003. Metabolic polymorphisms and micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environ. Mol. Mutagen.*, 42: 216-222.
- Morita K., Inoue T., Kada T. (1978) Desmutagenic factor of vegetable extracts on mutagenic principles of tryptophan pyrolysates. *Mutat. Res.* 54: 243-244.
- Mortelmans K., Zeiger E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Res.*, 455: 29–60.
- Morton J.F. 1980. The Australian pine or beefwood (*Casuarina equisetifolia* L.), an invasive “weed” in Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 93:87–95.

- Mosimann A.L, Wilhelm-Filho D., da Silva E.L. 2006. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors*, 26:59–70.
- Muccillo Baisch A.L., Johnston K.B., Paganini Stein F.L. 1998. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* in mesenteric arterial bed of rats. *J. Ethnopharmacol.*, 60:133–9.
- Naboulet L. 1917. *La justicia en Misiones*. Jean Valjean Editor, Barcelona.
- Nakamura Y.K., Suganuma E., Kuyana N., Sato K., and Ohtsuki K. 1998. Comparative bio-antimutagenicity of common vegetables and traditional vegetables in Kyoto. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62:1161-1165.
- Natake M., Kanazawa K., Mizuno M., Ueno N., Kobayashi T., Danno G.I., Minamoto S. 1989. Herb water-extracts markedly suppress the mutagenicity of TRP-P-2. *Agr. Biol. Chem.* 53(5): 1423-1425.
- Nehlig A., Debry G. 1994. Potential Genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffee: a review. *Mutat. Res.*, 317(2): 145-62.
- Newell A.M.B, Chandra S., Gonzalez de Mejia E. 2007. Ethnic teas and their bioactive components. In: Tunick MH, de Mejia EG, editors. *Hispanic foods: chemistry and flavor*. Washington, D.C.: Amer. Chem. Soc., pág. 127–31.
- Niikawa M., Hayashi H., Sato T., Nagase H., Kito H. 1993. Isolation of substances from glossy privet (*Ligustrum lucidum* Ait) inhibit the mutagenicity of benzo(a)pyrene in bacteria. *Mutat. Res.* 319(1):1-9.
- Niklison J. 1914. Informe sobre las condiciones de trabajo en el Alto Paraná. Boletín del Departamento Nacional del Trabajo N° 26. Ministerio del Interior, Buenos Aires.
- Norppa H., Renzi L., Lindholm C. 1993. Detection of whole chromosomes in nuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis* 8:519-525.
- Nüsse M., Miller B., Viaggi S., Grawé J. 1996. Analysis of the DNA content distribution of micronuclei using flow sorting and fluorescent in situ hybridization with a centromeric DNA probe. *Mutagenesis*, 11: 405-413.
- OECD Guideline For Testing of Chemicals 474. 1983. Genetic Toxicology: “Micronucleus Test”
- OECD Guideline For Testing of Chemicals 401. 1987. Acute Oral Toxicity.
- OECD. 2009. Genetic Toxicology: *In vivo* Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, in bone marrow cells TG 474 (Annual Report 2009). Public Affairs and

- Communications Directorate Editions. Paris, France: OECD online Bookshop Editions; 7-123. Disponible en: <http://www.oecd.org/bookshop>
- Oguri A., Suda M., Totsuka Y., Sugimura T., Wakabayashi K., 1998. Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines. *Mutat. Res.*, 402: 237–245.
 - Opala T., Rzymiskip P., Pischel I., Wilczak M., Wozniak J. 2006. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on bodyweight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects – a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Eur. J. Med. Res.*, 11:343–50.
 - Ortiz R, Medina H, Rodríguez L, González-Márquez H, Cortés E. 2004. Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats. *Environ. Mol. Mutagen.*, 43: 179-185.
 - Osanai K., Landis-Piwowar K.R., Dou Q.P., Chan T.H. 2007. A para-amino substituent on the D-ring of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate as a novel proteasome inhibitor and cancer cell apoptosis inducer. *Bioorg. Med. Chem.*, 15:5076–82.
 - Ouyang M.A., Liu Y.Q., Wang H.Q., Yang C.R. 1998. Triterpenoid saponins from *Ilex latifolia*. *Phytochem.*, 49:2483–6.
 - Paganini Stein F.L., Schmidt B., Furlong E.B., Souza-Soares L.A., Soares M.C., Vaz M.R., Muccillo Baisch A.L. 2005. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biol. Res. Nurs.*, 7:146–56.
 - Parry E., Parry J., Corso C., Doherty A., Haddad F., Hermine T., Johnson G., Kayani M., Quick E., Warr T., Williamson J. 2002. Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. *Mutagenesis* 17: 509-521.
 - Pascoe S., Stemp G. 1990. A modified method and staining technique for the in vitro micronucleus test in human lymphocytes using cytochalasin B. *Mutation Research*, 234: 253 – 255.
 - Pavei C., Guzzato P., Petrovick P., Gosmann G., Gonzalez-Ortega G. 2007. Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill (Mate) fruits. *J. Liquid Chromatogr. Related Tech.*, 30:87–95.

- Pereira Jotz G., Sampaio Menezes H., Galleano Zetter C., Vargas Alves R.J., Chacur R., Buzzatti C., Dias de Oliveira M., Maeso Montes T.H., Hübner M., Walker Zettler E. 2006. Mate (*Ilex paraguariensis*) as an etiological agent of neoplasia in the aerodigestive tract. An experimental study. Intl Arch Otorhinolaryngol São Paulo, 10:306–11.
- Piloto Ferrer J., Ramos Ruiz A., Vizoso Parra A., García López A., Guerra M., Rivero R. 2006. Evaluación del potencial genotóxico de *Boerhavia erecta* L. Rev Cubana Plant. Med., 11(1) Ciudad de la Habana.
- Piloto Ferrer J., Vizoso Parra A., Ramos Ruiz A., García López A., Remigio Montero A., Vega Hurtado A., Gonzalez Sanabria M.L., Rodriguez Ferradá C., Carballo C. 2009. Plantas medicinales. Diez años de evaluaciones toxicogenéticas en el CIDEM. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (5), 428 – 434 .
- Pintos J., Franco E.L., Oliveira B.V., Kowalski L.P., Curado M.P., Dewar R. 1994. Mate, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil. Epidemiology, 5:583–90.
- Pires V.S., Guillaume D., Gosmann G., Schenkel E.P. 1997. Saponins from *Ilex dumosa*, an Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) adulterating plant. J. Agric. Food Chem., 45:1027–31.
- Pires V.S., Gosmann G., Guillaume D., Schenkel E.P. 2002. Triterpenes and saponins from *Ilex psammophila*. Nat. Prod. Lett., 16:401–6.
- Pittler M.H., Ernst E. 2004. Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review. Am. J. Clin. Nutr., 79:529–36.
- Pomilio A.B., Trajtemberg S., Vitale A.A. 2002. High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. Phytochem. Anal., 13(4):235-41.
- Pons F.W., Müller P. 1990. Induction of Frameshift mutations by caffeine in *Escherichia coli* K12. Mutagenesis, 5(2):173-7.
- Popp R., Schimmer O. 1991. Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy, and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids. Mutat. Res., 246:205-13.
- Prieto G., Errecalde C., Trotti N. 1999. Farmacología clínica de los antineoplásicos. Monografía Medicina Veterinaria, 19(2):1-8.

- Pronczuk J., Laborde A., Heuhs L., Moyna P., Romaniello L., Vásquez A. 1987. Mate drinking: another source of caffeine. *Vet. Hum. Toxicol.*, 29: 70-71.
- Rahman A., Shahabuddin S., Hadi S.M., Parish J.H. 1989. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu (II): role of Cu (I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis*, 10:1833-9.
- Rahman A., Fazal F., Greensill J., Ainley K., Parish J.H., Hadi S.M. 1992. Strand scission in DNA induced by dietary flavonoids: role of Cu(I) and oxygen free radicals and biological consequences of scission. *Mol. Cell. Biochem.*, 111:3-9.
- Ramirez-Mares M.V., Chandra S., de Mejia E.G. 2004. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat. Res.*, 554:53–65.
- Rastogi P.B., Levin R.E. 1987. Induction of sperm abnormalities in mice by quercetin. *Environ. Mutagen.*, 9: 79–86.
- Ratty A.K., Das N.P. 1988. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 39:69-79.
- Reginatto F.H., Athayde M.L., Gosmann G., Schenkel E.P. 1999. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species – Caffeine and theobromine in erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. *J. Braz. Chem. Soc.*, 10:443–6.
- Rietjens I.M.C.M., Boersma M.G., van der Woude H., Jeurissen S.M.F., Schutte M.E., Alink G.M. 2005. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutat. Res.*, 574: 124–138.
- Rinkus S.S., Legator M.S. 1981. Salmonella revisited: A replay to Ames and McCann. *Can Res.*, 41: 4196—4203.
- Rojo de Camargo C.M., Toledo M.C.F. 2002. Coffee and Mate tea as a dietary source of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in Campinas. *Food Sci. Tech.*, 22:49–53.
- Rolon P.A, Castellsague X., Benz M., Munoz N. 1995. Hot and cold Mate drinking and esophageal cancer in Paraguay. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 4:595–605.
- Rosefort C., Fauth E., Zanki H. 2004. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleated and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis*, 19: 277 – 284.
- Rueff J., Laires A., Bra´s A., Borba H., Chaveca T., Gaspar J., Rodrigues A., Cristovão L., Monteiro M. 1989. DNA damage and oxygen species, in: Lambert,

- Laval_Eds., DNA Repair and Their Biological Implications in Mammalian Cells, Plenum, New York, pág. 171–181.
- Ruschenburg U.1985. Benzo[a]pyrene content of coffee and some other foodstuff. In: IIE colloque scientifique sur le café, Lomé. Paris: Association Scientifique Internationale du Café; pág. 205 – 12.
 - Russo A., Acquaviva R., Campisi A., Sorrenti V., Di Giacomo C. 2000. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. Cell. Biol. Toxicol., 16:91-8
 - Sá Ferreira Fernández I.C., Ferrao Vargas V.1999. Mutagenicity of medicinal plants extracts in Salmonella/microsoma assay. Phytotherapy Res., 13(5):397-400.
 - SAGPyA. 1998. Cadena Alimentaria de la Yerba Mate Revista Alimentos Argentinos N°6, Subsecretaría de Alimentación y Mercados, Buenos Aires.
 - Sahu S.C., Gray G.C. 1993. Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by moricetin. Cancer Lett., 70:73-9.
 - Sahu S.C., Gray G.C. 1996. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione-S transferase in isolated rat liver nuclei. Cancer Lett., 104:193-6
 - Sahu S.C., Gray G.C. 1997. Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. Food Chem. Toxicol., 35:4436-47.
 - Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F. 1995. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. Free Radic. Biol. Med., 19:481-6.
 - Salamone M., Heddle J.A., Stuart E., Katz M. 1980. Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents: mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. Mutat. Res., 74: 347-356.
 - Saldana M.D.A., Mazzafera P., Mohamed R.S. 1999. Extraction of purine alkaloids from mate (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂. J. Agric. Food Chem., 47 (9): 3804-3808.
 - Sannomiya M., Cardoso R.P., Figueiredo M.E., Rodrigues C.M., C. dos Santos L., V. dos Santos F., Serpeloni J.M., Cólus I.M.S., Vilegas W. and Varanda E.A. 2007. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. Journal of Ethnopharmacology, 112(2): 319-326.
 - Schenkel E.P., Heinzmann B.M., Montanha J.A., Taketa A., Koppitke L., Gosmann G.1989. Comparison of saponins from *Ilex paraguariensis* St. Hil. And *Ilex Dumosa*

- Reiss. In: Simposio Brasil China de Química e Farmacologia de Productos Río de Janeiro. Anais. Río de Janeiro: Productos Naturais, 80.
- Schinella G.R., Troiani G., Davila V., de Buschiazzi P.M., Tournier H.A. 2000. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 269:357–60.
 - Schlemitz S., Pfannhauser W. 1997. Supercritical fluid extraction of mononitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from tea—correlation with PAH concentration. Z Lebensm Unters Forsch, 205: 305 – 10.
 - Schmezer P., Pool B.L., Lefevre P.A., Callander R., Ratpan F., Tinwell H., Ashby J. 1990. Assay-Specific genotoxicity of n-nitrosodibenzylamine to the rat liver *in vivo*. Environ. Mol. Mutagen., 15: 190-197.
 - Schmid W. 1975. The micronucleus test. Mutat. Res., 31: 9-15
 - Schmid W. 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis chemical mutagens. Principles for their detection. Ed. Hallander. Plenum Press. New York; 4: 31-34.
 - Schmalko M.E., Alzamora S.M. 2001. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during YerbaMate processing. Drying Tech. 19(3&4):599–610.
 - Schubert A., Zanin F.F., Pereira D.F., Athayde M.L. 2006. Annual variations of mehtylxanthines in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) samples in Ijuí and Santa Maria, State of Rio Grande Do Sul. Quim. Nova, 29:1233–6.
 - Serke S., Hunh D. 1992. Identification of CD71 (transferrin receptor) expressing erythrocytes by multiparameter-flow-cyrometry (MP-FCM): correlation to the quantitation of reticulocytes as determined by conventional microscopy and by MP-FCM using a RNA-staining dye. Br J. Haematol., 81: 432-439.
 - Sewram V., De Stefani E., Brennan P., Boffetta P. 2003. Mate consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in Uruguay. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 12:508–13.
 - Shalmashi A., Golmohammad F. 2010. Solubility of caffeine in water, ethil acetate, ethanol, carbon tetrachloride, methanol, chloroform, dichloromethane and acetone between 298 and 323 K. Latin Am. Applied Res., 40: 283-285.
 - Shanabruch W.G., Walker G.C. 1980. Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) involved in *recAC lexAC*-dependent mutagenesis, Mol. Gen. Genet., 179: 289–297.
 - Simic D., Vukovic-Gacic B., Knezevic-Vukcevic J. 1997. Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. Mutat. Res., 402:51-57.

- Simula A.P., Priestly B.G. 1992. Species differences in the genotoxicity of cyclophosphamide and styrene in three *in vivo* assays. *Mutat. Res.* 271: 49-48.
- Stich H.F., Rosin M.P., Wu C.H., Powrie W.D. 1981a. A comparative genotoxicity study of chlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid). *Mutat. Res.* 93(3): 201-212.
- Stich H.F., Rosin M.P., Wu C.H., Powrie W.D. 1981b. The action of transition metals on the genotoxicity of simple phenols, phenolic acids and cinnamic acids. *Mutat. Res.* 14(3): 251-260.
- Sullivan B., Blower M., Karpen G. 2001. Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nature* 2:584-596.
- Susuki S., Takada T., Sugawara Y. 1991. Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. *Japan J. Cancer Res.*, 82:1061-4.
- Susuki Y., Shimizu H., Nagae Y., Fukumoto M., Okonogi H., Kadokura M. 1993. Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.*, 22: 101-106.
- Taketa A.T. 2004. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Mate). *J. Braz. Chem. Soc.*, 15:205-11.
- Taketa A.T., Gnoatto S.C., Gosmann G., Pires V.S., Schenkel E.P., Guillaume D. 2004. Triterpenoids from Brazilian *Ilex* species and their *in vitro* antitrypanosomal activity. *J. Nat. Prod.*, 67:1697-700.
- Taketa A.T., Schmittmann-Schlager T., Guillaume D., Gosmann G., Schenkel E.P. 2000. Triterpenoid glycosides and a triterpene from *Ilex brevicuspis*. *Phytochem.*, 53:901-4.
- Tenorio Sanz M.D., Torija Isasa M.E. 1991. Mineral elements in Mate herb (*Ilex paraguariensis* St. H.). *Arch. Latinoam. Nutr.* 41:441-54.
- Tice R.R., Luke C.A., Shelby M.D. 1987. Methyl isocyanate: an evaluation of *in vivo* cytogenetic activity. *Environ. Mol. Mutagen.*, 9: 37-58.
- Tomasz M, Chowdary D, Lipman R, Shimotakahara S, Veiro D, Walker V, Verdine G. 1986. Reaction of DNA with chemically or enzymatically activated mitomycin C: isolation and structure of the major covalent adduct. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6702-6706.
- Torous D., Dertinger S., Hall N., Tometsko C. 2000. Enumeration of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood: a flow cytometric study. *Mutat. Res.*, 465:91-99.

- Torres-Bugarín O., De Anda-Casillas A., Ramirez-Muñoz M.P., Sánchez-Corona J. Cantú J.M., Zúñiga G. 1998. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat.Res.* 413:277-281.
- Torres-Bugarín O., Ventura Aguilar A., Zamora-Perez A., Gomez-Meda B.C., Ramos-Ibarra M.L., Morgan-Villela G., Gutierrez-Franco A., Zúñiga-González G. 2004. Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutat. Res.* 565(1): 91-101.
- Torres E.1999. Cosechas de injusticias. Editorial Arandura, Asunción, Paraguay.
- Trueba G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed.* 22(1).
- Turkmen N., Sari F., Velioglu Y.S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black Mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chem.* 99:835–41.
- Ü ndeger U., Aydy´n S., Basaran A.A., Basaran N.S., 2004. The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. *Toxicology Letters*, 151: 143–149.
- Uyeta M., Taue S. and Mazaki M. 1981. Mutagenicity of hydrolysates of tea infusions. *Mutat. Res.*, 88:233-240.
- Van Acquire S.A., Van den Berg D.J., Tromp M.N., Griffioen D.H., Van Bennekom W.P., Van der Vijgh W.J., y *col.* 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20:331-42.
- Vanaclocha B. 1998. Monografías de plantas medicinales. En Arteché A. (Dir.), *Fitoterapia. Vademecum de Prescripción.* 3ª Ed. Barcelona.
- Vanderkerker K, Vanparys P, Verschaeve L, Kirsch-Volders M. 1989. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis*, 4:6-11.
- Vanparys P., Vermeiren F., Sysmans M., Temmerman R. 1990. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat. Res.*, 244:95-103.
- Vargas Alves R.J., Pereira Jotz G., Souza do Amaral V., Montes T.M.H., Sampaio Menez H. 2008. The evaluation of maté (*Ilex paraguariensis*) genetic toxicity in human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay. *Toxicology in Vitro*, 22 (3): 695-698.

- Vargas V., Guidobono R. y Henriquez J. 1991. Genotoxicity of plant extracts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online], 86 (1.2): 67-70.
- Vassallo A., Correa P., De Stefani E., Cendan M., Zavala D., Chen V., Carzoglio J., Deneo- Pellegrini H. 1985. Esophageal cancer in Uruguay: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.*, 75:1005-9.
- Vera Garcia R., Basualdo I., Peralta I., de Herebia M., Caballero S. 1997. Minerals content of Paraguayan YerbaMate (*Ilex paraguariensis*, S.H.). *Arch. Latinoam. Nutr.*, 47:77-80.
- Verschaeve L., Vanderkerken K., Kirsch-Volders M. 1988. C-banding as a simple tool to discriminate between micronuclei induced by clastogens and aneugens. *Stain. Technol.*, 63:351-354.
- Verges E., Berardi A., Mendoza L., Rigoni E., Botello G, Malgor, L., Valsecia M. 2004. *Ilex dumosa* Reisseck: Resultados negativos en las pruebas de punción cutánea y de provocación alimentaria en la producción de reacciones alérgicas en animales de experimentación. Universidad del Nordeste, Comunicaciones científicas y tecnológicas.
- Victoria C.G., Muñoz M., Day N.E., Barcelos L.B., Peccin D.A., Braga N.M. 1987. Hot beverages and esophageal cancer in southern Brazil: a case control study. *Int. J. Cancer*, 39: 710-716.
- Vizoso Parra A., Ramos R. Alberto, Villaescusa Gonzalez A., Betancourt Badell J., García López A., Piloto Ferrero J., Décalo Michelena M. 2002. *Passiflora incarnata* L. y *Senna alata* (L.) Roxo: Estudio toxicogenético que emplea 2 sistemas de ensayos a corto plazo. *Rev. Cubana Plant. Med.*, 2002(1) Ciudad de la Habana.
- Waleh N.S., Rapport S. J., Mortelmans K.E. 1982. Development of a toxicity test to be coupled to the Ames *Salmonella* assay and the method of construction of the required strains, *Mutat. Res.*, 97:247-256.
- Walker G.C., Dobson P.P. 1979. Mutagenesis and repair deficiencies of *Escherichia coli umuC* mutants are suppressed by the plasmid pKM101. *Molecular and General Genetics*, 172: 17-24.
- Waskiewicz S. 2005. La masacre de Oberá, 1936. Editorial Universitaria, 2da edición, Posadas.
- Watanabe K, Ohta T, Shirasu Y. 1989. Enhancement and inhibition of mutation by *o*-vanillin in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 218:105-9.

- Wnuk M., Lewinska A., Oklejewicz B., Bugno M., Slota E., Bartosz G. 2009. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.*, 679: 18–23.
- Wrobel K., Wrobel K., Urbina E.M. 2000. Determination of total aluminum, chromium, copper, iron, manganese, and nickel and their fractions leached to the infusions of black tea, green tea, *Hibiscus sabdariffa*, and *Ilex paraguariensis* (Mate) by ETA-AAS. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 78:271–80.
- Yahagi T., Degawa W., Seino Y., Matsushima T., Nagao M., Sugimura T., Hashimoto Y. 1975. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives, *Cancer Lett.*, 1: 91–97.
- Yamamoto K., Kikuchi Y. 1980. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat. Res.*, 71:127-131.
- Yamamoto T., Juneja L.R., Chu D.C., Kim M., editors. 1997. Chemistry and applications of green tea. New York: CRC Press. pág 61–73.
- Yano I., Nishiizumi C., Yochikawa K., Arihara S. 1993. Triterpenoid saponins from *Ilex integra*. *Phytochem.*, 32:417–20.
- Yen G.C., Chen H.Y. 1996. Relationship between antimutagenic activity and major components of various teas. *Mutagenesis*, 11: 37–41.
- Yen G.C., Chen H.Y., and Peng H.H. 2001. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food and Chemical Toxicology*, 39: 1045-1053.
- Yoshino H., Urano K. 1996. Mutagenic compounds in exhaust gas from a municipal waste incinerator. *Tox. and Environ. Chem.*, 57: 123-136.
- Yoshino M., Murakami K. 1998. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal. Biochem.*, 257:40-4.
- Yoshino M., Haneda M., Naruse M., Murakami K. 1999. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol. Genet. Metab.*, 68:468-72.
- Younghwa N., Ven-Shun L., Yuka N., Kenneth B., Harold K. 2001. Synthesis, DNA cross-linking activity, and cytotoxicity of dimeric Mitomycins. *J. Med. Chem.*, 44:3453-3462.
- Zeiger E. 1985. The *Salmonella* mutagenicity assay for identification of presumptive carcinogens, in: H.A. Milman, E.K. Weisburger (Eds.), *Handbook of Carcinogen Testing*, Noyes Publishers, Park Ridge, NJ, p.83–99.

- Zeiger E., Anderson B., Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K, Speck W. 1987. *Salmonella* mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals, Environ. Mutagenesis, 9 (9): 1–110.
- Zeiger E., Anderson B., Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K. 1988. *Salmonella* mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals, Environ. Mutagen., 9 (1.12): 1–158.
- Zeiger E., Haseman J.K., Shelby M.D., Margolin B.H., Tennant R.W. 1990. Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals, Environ. Mol. Mutagen., 16 (Suppl. 18): 1–14.
- Zeiger E. 2007. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? Guest Editorial. Mutat. Res., 626: 1–3
- Zuin V.G., Montero L., Bauer C., Popp P. 2005. Stir bar sorptive extraction and highperformance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. J. Chromatogr. A., 1091:2–10.
- Zúñiga González G., Torres Bugarín O, Ramirez-Muñoz M.P., Delgado-Lamas J.L., De Loza-Saldaña R., Cantú J.M. 1996. Micronucleated erythrocytes in splenectomized patients with and without chemotherapy. Mutat. Res. 361: 107-112.
- Zúñiga González G., Torres Bugarín O., Luna Aguirre J., González Rodríguez A., Zamora Perez A., Gomez Meda B.C., Ventura Aguilar A.J., Ramos Ibarra M.L., Ramos Mora A., Ortíz G.G. y col. 2000. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds). Mutat. Res., 467: 99-103.
- Zúñiga González G., Torres Bugarín O., Ramos Ibarra M.L., Zamora Perez A., Gomez Meda B.C., Ventura Aguilar A.J., Ramos Mora A., Ortíz G.G., Alvarez Moya C., Ontiveros Lira D. y col. 2001a. Variation de micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to the age. An increment of micronucleated polychromatic erythrocytes after the administration of colchicines. Environ. Mol. Mutagenesis, 37: 173-177.
- Zúñiga González G., Torres Bugarín O., Zamora Perez A., Gomez Meda B.C., Ramos Ibarra M.L., Martínez González S., González Rodríguez A., Luna Aguirre J., Ramos Mora A., Ontiveros Lira D. y col. 2001b. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among Young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. Mutat. Res., 494: 161-167.

9. Anexos

9.1. Anexo 1: Soluciones y Medios de cultivo para el ensayo de Ames

- Vogel Bonner medio E (50x).

Uso: medio mínimo

| Ingrediente | Por litro |
|---|-----------|
| H ₂ O destilada tibia (45°C) | 670 mL |
| Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 10 g |
| Acido citrico monohidrato | 100 g |
| Fosfato de potasio dibásico anhidro (K ₂ HPO ₄) | 500 g |
| Fosfato de sodio y amonio (NaH ₂ NH ₄ PO ₄ ·4H ₂ O) | 175 g |

Agregar las sales al agua tibia en el orden indicado en un vaso de 2 litros con agitador magnético en plancha calefactora. Cada sal debe disolverse completamente antes de agregar la siguiente. Ajustar el volumen a 1 litro. Distribuir en botellas de vidrio de 500 ml. Autoclavar con tapa floja por 2 minutos a 121°C. Cuando las soluciones se han enfriado, ajustar las tapas.

- Solución 0.5mM histidina/biotina.

Uso: ensayo de mutagenicidad (agregar 10 ml a 100 ml de agar top)

| Ingrediente | Por litro |
|------------------------------|-----------|
| D-Biotina (P.M. 247,3) | 30,9 mg |
| L-Histidina.HCl (P.M. 191,7) | 24,0 mg |
| H ₂ O destilada | 250 mL |

Disolver la biotina en agua caliente a ebullición. Esterilizar por filtración a través de filtro de membrana de 0.22 µm o autoclave durante 20 minutos a 121°C. Almacenar en botellas de vidrio a 4°C.

- Top agar.

Uso: ensayo de mutagenicidad.

| Ingrediente | Por litro |
|----------------------------|-----------|
| Agar | 6 g |
| Cloruro de sodio (NaCl) | 5 g |
| H ₂ O destilada | 1000 mL |

El agar debe disolverse en baño maría o a través de un corto autoclavado. Mezclar y transferir alícuotas de 100 ml a botellas de vidrio de 250 ml con tapas a rosca. Autoclavar por 20 minutos con tapas flojas. Dejar enfriar el agar y ajustar las tapas.

- Solución salina (1.65 M KCl y 0.4 M MgCl₂).

Uso: ensayo de mutagenicidad con S9 mix.

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por 500 mL</u> |
|--|---------------------------|
| Cloruro de potasio (KCl) | 61,5 g |
| Cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) | 40,7 g |
| H ₂ O destilada estéril | a volumen final de 500 mL |

Disolver los ingredientes en agua. Autoclavar durante 20 minutos a 121°C. Almacenar en botellas de vidrio en heladera o a temperatura ambiente.

- 0.2 M Buffer fosfato de Sodio, pH 7.4

Uso: ensayo de mutagenicidad con S9 mix

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por 500 mL</u> |
|--|-------------------|
| 0,2 M dihidrógeno fosfato de sodio ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) (13,8 g/500 mL) | 60 mL* |
| 0,2 M hidrógeno fosfato de sodio (Na_2HPO_4) (14,2 g/500 mL) | 440 mL* |

* Estos son valores aproximados. Chequear el pH. Si es demasiado bajo, agregar 0.2M de hidrógeno fosfato de sodio hasta pH 7.4. Esterilizar por autoclavado durante 20 minutos a 121°C.

- Solución 0.1 M NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)

Uso: ensayo de mutagenicidad con S9 mix.

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por 10 mL</u> |
|------------------------------------|------------------|
| NADP (P.M. 765,4) | 383 mg* |
| H ₂ O destilada estéril | 5 mL |

Agregar NADP a tubos de vidrio pre-pesados con tapas a rosca. No agregar agua. Es conveniente preparar una docena o más de estas alícuotas secas a la vez. Envolver los tubos con papel metálico para proteger de la luz y etiquetar cada tubo con el peso correcto. No es necesario pesar exactamente 383 mg, si el peso está indicado en la etiqueta, se le coloca el volumen de agua calculado para una solución 0.1M. Colocar todos los tubos pesados de NADP en una jarra con tapa que contenga en el fondo silica gel o algún otro desecante. Almacenar en congelador a -20°C. Cuando se necesita hacer S9 mix, tomar un tubo de la jarra, agregar la cantidad de agua especificada y mezclar con vortex para que el NADP se disuelva. Colocar los tubos en un baño de hielo. No se ha sido necesario esterilizar las soluciones de NADP, pero puede hacerse a través de un filtro de 0.22 µm. Las soluciones de NADP almacenadas en congelador son estables por 6 meses.

* Esta cantidad de NADP aplica al peso molecular de 765.4. Chequear que el peso correcto de NADP esté indicado en cada lote.

- Glucosa 6 fosfato 1 M.

Uso: ensayo de mutagenicidad con S9 mix.

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por 10 mL</u> |
|------------------------------------|------------------|
| Glucosa-6- fosfato (G-6-P) | 2,82 g |
| H ₂ O destilada estéril | 10 mL |

Pre-pesar alícuotas de glucosa-6-fosfato como se describe para NADP y almacenar en jarras desecadoras en el congelador. Las soluciones de G-6-P pueden ser almacenadas en congelador y ser estables por 6 meses. Si es necesario, las soluciones pueden esterilizarse por filtración usando filtro de 0.22 µm.

- S9 mix (enzimas microsomales de hígado de rata + cofactores)*

Uso: ensayo de mutagenicidad

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por 50 mL</u> |
|---|------------------|
| | S9 mix estándar |
| Hígado de rata S9 (inducido con Aroclor-1254) | 2,0 mL(4%) |
| Sales de MgCl ₂ -KCl | 1,0 mL |
| 1 M Glucosa-6- fosfato | 0,25 mL |
| 0,1 M NADP | 2,0 mL |
| H ₂ O destilada estéril | 19,75 mL |

* Hígado de otras especies de mamíferos como hamster o ratón pueden ser usados. Otros tejidos también. Los ingredientes deben ser agregados en forma inversa lo indicado en la tabla, siendo el hígado agregado a la solución buffer. La solución debe prepararse fresca y mantenerse en hielo. Todo S9 mix no usado debe descartarse. Nunca volver a congelar el S9.

- Solución de Ampicilina (8mg/ml).

Uso: test de resistencia a Ampicilina – Placas maestras para cepas factor R.

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por 100 mL</u> |
|-----------------------------|-------------------|
| Ampicilina trihidrato | 0,8 g |
| Hidróxido de sodio (0,02 N) | 100 mL |

No ha sido necesario esterilizar soluciones de ampicilina pero puede realizarse por filtración usando filtro de 0.22 µm. Almacenar en botella de vidrio a 4°C.

- Solución de Cristal violeta (0.1%).

Uso: Test de sensibilidad a cristal violeta (para confirmar mutación rfa).

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por 100 mL</u> |
|----------------------------|-------------------|
| Cristal Violeta | 0,1 g |
| H ₂ O destilada | 100 mL |

Almacenar a 4°C en botellas de vidrio con tapa a rosca. Envolver la botella con papel metálico para protegerla de la luz.

- Placas de medio mínimo con glucosa (AGM)

Uso: ensayo de mutagenicidad.

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por litro</u> |
|----------------------------|------------------|
| Agar | 15 g |
| H ₂ O destilada | 930 mL |
| Sales VB 50X | 20 mL |
| Glucosa 40% | 50 mL |

Agregar 15 g de agar a 930 ml de agua destilada en un vaso de 2 litros. Autoclavar por 20 minutos a vapor continuo. Cuando la solución se halla enfriado un poco, agregar 20 ml de sales VB 50X y 50 ml de glucosa al 40% estéril. Para mezclar, usar colocar una barra agitadora magnética al frasco antes de autoclavar. Luego de agregar todos los ingredientes, agitar. Colocar 30 ml en cada caja de Petri.

- Placas de agar glucosado mínimo con histidina/biotina.

Uso: placas maestras para cepas no factor R. Test de requerimiento de histidina.

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por litro</u> |
|--|------------------|
| Agar | 15 g |
| H ₂ O destilada | 914 mL |
| Sales VB 50X | 20 mL |
| Glucosa 40% | 50 mL |
| Histidina.HCl.H ₂ O estéril (2 g cada 400 ml de H ₂ O) | 10 mL |
| Biotina 0,5 mM estéril | 6 mL |

Autoclavar el agar y el agua. Agregar glucosa al 40% estéril, sales VB 50X e histidina a la solución de agar caliente. Permitir que la solución se enfríe un poco y agregar la biotina estéril. Mezclar y colocar en cajas.

- Placas de agar glucosado mínimo con Ampicilina.

Uso: placas master para cepas que llevan plásmidos pkM101- Test para resistencia a Ampicilina.

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por litro</u> | <u>Conc. por placa</u> |
|--|------------------|------------------------|
| Agar | 15 g | 1,5% |
| H ₂ O destilada | 910 mL | - |
| Sales VB 50X | 20 mL | 1X |
| Glucosa 40% | 50 mL | 2% |
| Histidina.HCl.H ₂ O estéril (2 g cada 400 ml de H ₂ O) | 10 mL | 260 µM |
| Biotina 0,5 mM estéril | 6 mL | 3 µM |
| Solución Ampicilina (8 mg/mL 0,02 HCl) | 3,15 mL | 25 µg/mL |

Autoclavar el agar y el agua. Agregar glucosa al 40% estéril, sales VB 50X e histidina a la solución de agar caliente. Mezclar. Enfriar a aproximadamente 50°C. Agregar la biotina estéril y la solución de ampicilina asépticamente.

Las sales VB 50X y la glucosa 40% son esterilizadas por separado a través de autoclave durante 20 minutos. Las soluciones de histidina y biotina pueden ser autoclavadas o esterilizadas por filtración. Las placas usadas para resistencia a ampicilina pueden almacenarse hasta 2 meses a 4°C. Luego debería ser chequeada la actividad del antibiótico con una cepa no factor R. Las placas maestras deben prepararse dentro de los pocos días luego de que el agar fue plaqueado.

- Placas de agar nutritivo.

Uso: Test para genotipo: sensibilidad a cristal violeta y sensibilidad a UV. – Test de viabilidad de bacterias.- Recuento de UFC/ml vs. D.O.

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por litro</u> |
|----------------------------|------------------|
| Caldo nutritivo oxoid N° 2 | 25 g |
| Agar | 15 g |
| H ₂ O destilada | 1000 mL |

Agregar los ingredientes a un vaso de 2 litros conteniendo una barra agitadora magnética. Autoclavar durante 30 minutos a vapor continuo. Mezclar y colocar en placas.

9.2. Anexo 2: Soluciones para el ensayo de Micronúcleo

- Solución de Ciclofosfamida (50 mg/kg): 1.5 mg/mL para inyección de 1 mL de solución en un ratón de 30 g.

Uso: inyección intraperitoneal de ratones utilizados como control positivo en el ensayo de Micronúcleo

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por 100 mL</u> |
|----------------------------|-------------------|
| Ciclofosfamida | 0,15 g |
| H ₂ O destilada | 100 mL |

- Coloración de Giemsa al 5%.

Uso: tinción de extendidos con médula ósea de fémures de ratón

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por 100 mL</u> |
|---------------------------------------|-------------------|
| Eosina -azul de metileno según Giemsa | 0,5 g |
| Glicerina | 50 mL |
| Alcohol metílico absoluto | 50 mL |

Mezclar 0.5 g de polvo de Giemsa + 50 mL de glicerina calentado a 50 grados durante 2 horas, añadir 50 mL de actohol metílico absoluto, dejar a temperatura ambiente 7-14 días (maduración). Filtrar antes de su empleo.

- Solución isotónica de NaCl 0.9% (Solución fisiológica)

Uso: inyección intraperitoneal de ratones utilizados como control negativo en el ensayo de Micronúcleo

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por 100 mL</u> |
|------------------------------------|-------------------|
| Cloruro de sodio (NaCl) | 0,9 g |
| H ₂ O destilada estéril | 100mL |

- Albúmina bovina al 5%.

Uso: solución diluyente de médula ósea de fémures de ratón.

| <u>Ingrediente</u> | <u>Por 100 mL</u> |
|------------------------------------|-------------------|
| Albúmina bovina | 5 g |
| H ₂ O destilada estéril | 100mL |