



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

Trabajo de Tesis de Maestría en Plantas Medicinales

“Estudio de las propiedades farmacológicas y análisis fitoquímico de los extractos de *Gomphrena perennis* L. (Amaranthaceae)”.

Tesista: Lic. Qca. Adriana Milena Bonilla Bonilla

Directora: Prof. Dra. María Inés Ragone

Codirectora: Msc. Farm. Maria Elena del Valle

2017

A Dios

A mis padres Mary y Jorge

A Ximena y Jorge Andrés

A Diego

AGRADECIMIENTOS

A Dios por bendecirme cada día y darme siempre lo que necesito para ser feliz, por permitirme cumplir este sueño y estar presente en cada día especialmente los que estuve lejos de casa.

A las Facultades de Ciencias Exactas y al departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de La Plata, por permitirme realizar esta Tesis de Maestría en Plantas Medicinales.

A mi Directora de Tesis la Dra. María Inés Ragone por su apoyo constante, sus enseñanzas, paciencia, ayuda infinita y sobretodo por su amistad.

A mi Co-directora la Msc. Maria Elena del Valle por todo los conocimientos, la paciencia y ayuda brindada.

A la Dra. Alicia Consolini Directora del Magíster en Plantas Medicinales, por permitirme desarrollar esta tesis en la Cátedra de Farmacología, brindarme su ayuda, apoyo, conocimientos y consejos.

A la Dra. María Adelaida Rosella Profesora titular de la Cátedra de Farmacognosia y Farmacobotánica, así como del Magíster en Plantas Medicinales por brindarme la oportunidad de desarrollar mi tesis en dicha cátedra y su ayuda constante a lo largo de este proceso.

A la Dra. Alejandra Carbone, la Msc. Marta Colares y al INFIVE-CONICET de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata por proveerme del material vegetal para esta tesis.

Al Msc. Guillermo Schinella de la Facultad de Ciencias Medicas de la UNLP, por su paciente colaboración y guía con la medición de la actividad antioxidante.

A la Dra. María Esperanza Ruiz y a Sebastián Scioli Montoto por toda su colaboración con la determinación del análisis fitoquímico de los extractos con HPLC-UV y su ayuda constante.

A todos los docentes que son parte del Magister en Plantas Medicinales, por hacer de todas sus clases un espacio ameno para la incorporación conocimientos que de una manera u otra hicieron posible esta tesis.

A Soledad, Germán, Matías, Lara, Lucía y a todos los miembros del Laboratorio de Farmacología de la UNLP por su apoyo constante y ayuda incondicional.

A Oscar, Florencia, Silvia, Carlos y a todos los miembros de la Cátedra de Farmacognosia y Farmacobotánica de la UNLP por su ayuda incondicional.

A mi madre Mary por impulsarme siempre a ser mejor cada día y luchar junto a mi por este sueño, a mi Padre Jorge por ser mi sostén y apoyarme siempre sin importar lo

difícil de las condiciones, a mis hermanos Ximena y Jorge Andrés por hacerme sonreír siempre en los momentos más difíciles.

Especialmente quiero agradecer a toda mi familia que hicieron este sueño parte de cada uno de ellos y me apoyaron incondicionalmente, son mi motor y mi motivación para crecer profesional y humanamente día a día.

A mis compañeras y amigas del Magíster Catalina, Tatiana y Silvina que siempre estuvieron ahí, por ese magnífico grupo que llegamos a conformar y que nos va a permitir a todas cumplir con este sueño que un otoño de 2015 iniciamos.

A mis amigos José, Dalis, David, Milton, Pablo, Andrés, Natalia, Carolina, Julián, Karen, Paola, Camilo, Javier y Angélica, que siempre estuvieron presentes de una u otra manera.

A Carolina Reinoso, Beatriz Calderón, la Dra. Celia Ford de Sbarra, por ser mis jefas pero aún más mis amigas y familia estando tan lejos de casa.

A Eva por su ayuda incondicional, por escucharme y aconsejarme, por ser mi amiga y mi apoyo en este país.

A Yadira y Jorge por ayudarme a adaptarme a un nuevo país, con una cultura diferente.

A todas las personas que de una manera u otra hicieron parte de este sueño y me apoyaron día a día para lograrlo.

Y Como olvidar A Diego, mi compañero de vida, a él le agradezco desde mi corazón por todos y cada uno de los sacrificios que hizo para que yo pudiera cumplir este sueño, por tomar cada triunfo y cada momento difícil como propio, por preocuparse siempre por mi bienestar, y darme ánimos y motivos para continuar. Por ser mi bendición diaria.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES:	3
1.1.1. FAMILIA AMARANTHACEAE	3
1.1.1.1. Distribución geográfica:	5
1.1.1.2. Antecedentes botánicos:	5
1.1.1.3. Antecedentes de uso medicinal de la familia Amarantáceas:	7
1.1.1.3.1. <i>Amaranthus muricatus</i> (Moq.) Gillies ex Hicken.	7
1.1.1.3.2. <i>Alternanthera pungens</i> H.B.K.	8
1.1.1.3.3. Género <i>Pfaffia</i> Mart.:	10
1.1.1.4. Antecedentes fitoquímicos de la familia Amarantáceas:	11
1.1.2. GÉNERO <i>GOMPHRENA</i> L.	12
1.1.2.1. Distribución geográfica:	12
1.1.2.2. Antecedentes botánicos de las especies de <i>Gomphrena</i> :	13
1.1.2.3. Antecedentes de uso medicinal de las especies de <i>Gomphrena</i> :	14
1.1.2.3.1. <i>Gomphrena globosa</i> L.	14
1.1.2.3.2. <i>Gomphrena celosioides</i> Mart.	16
1.1.2.4. Antecedentes fitoquímicos:	19
1.1.3. <i>GOMPHRENA PERENNIS</i> L. VAR. <i>PERENNIS</i>	33
1.1.3.1. Características generales y distribución geográfica:	33
1.1.3.2. Antecedentes botánicos:	35
1.1.3.3. Antecedentes de uso medicinal no comprobados científicamente:	37
1.1.3.4. Antecedentes de estudios farmacológicos comprobados científicamente:	37
1.1.3.5. Antecedentes fitoquímicos:	38
1.2. BASES TEÓRICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LA TINTURA DE <i>GOMPHRENA PERENNIS</i> L (GPHT):	38
1.2.1. BASES TEÓRICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIESPASMÓDICAS INTESTINALES	38
1.2.1.1. Características generales y contráctiles del músculo liso	38
1.2.1.2. Características del músculo liso intestinal:	40
1.2.2. BASES PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS EN LA PRESIÓN ARTERIAL DE RATAS NORMOTENSAS	42
1.2.2.1. Características contráctiles del músculo liso vascular y su relación con la presión arterial	42
1.2.2.2. Características de las medidas de la presión arterial en animales de laboratorio	43
1.2.3. BASES TEÓRICAS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CARDIOPROTECTORA FRENTE A LA ISQUEMIA REPERFUSIÓN	44
1.2.3.1. Características contráctiles del músculo cardíaco y efectos de la injuria por isquemia reperusión:	44
1.2.3.2. Evaluación experimental de extractos de plantas sobre músculo cardíaco	45
1.2.4. BASES TEÓRICAS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CENTRAL	46
1.2.4.1. Modelos experimentales utilizados para el estudio de la actividad sedante y ansiolítica	47
1.2.5. BASES TEÓRICAS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	49
1.2.5.1. Oxidación, especies reactivas y radicales libres.	49
1.2.5.2. Sustancias Antioxidantes	51
2. OBJETIVOS	54
2.1. OBJETIVOS GENERALES	55
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES	56

3. MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.1. MATERIAL VEGETAL	59
3.1.1. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DEL MATERIAL VEGETAL	59
3.1.2. ACONDICIONAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	59
3.2. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	60
3.2.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO HIDRO-ALCOHÓLICO AL 20% (GpHT)	60
3.2.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO (DECOCCIÓN)	60
3.2.3. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO AL 20% (EXTRACTO 1 GpHMEOHT)	60
3.2.4. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO PARA LA BÚSQUEDA DE ALCALOIDES (EXTRACTO 2)	60
3.2.5. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO PARA EL ANÁLISIS DE SAPONINAS (EXTRACTO 3)	60
3.2.6. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO PARA LA INVESTIGACIÓN DE GLUCÓSIDOS CARDIOTÓNICOS (EXTRACTO 4)	61
3.2.7. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO AL 20% (EXTRACTO 5)	61
3.2.8. MICRO-DESTILACIÓN AL VAPOR DE ACEITES ESENCIALES (EXTRACTO 6)	61
3.2.9. EXTRACCIÓN CON SOLVENTES DE POLARIDAD CRECIENTE	62
3.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO	62
3.3.1. REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN DE LOS DIFERENTES GRUPOS FITOQUÍMICOS PRESENTES	62
3.3.1.1. Reacción con cloruro férrico (para ácidos hidroxámicos y fenoles)	63
3.3.1.2. Detección de flavonoides	63
3.3.1.2.1. Reacción de Shinoda	63
3.3.1.2.2. Reacciones de caracterización en papel	63
3.3.1.2.4. Reacción de Rosenheim (para Leucoantocianinas)	64
3.3.1.3. Reacción de caracterización de saponinas	64
3.3.1.3.1. Capacidad afrógena	64
3.3.1.3.2. Poder emulgente	64
3.3.1.3.3. Reacción de precipitación con Hidróxido de calcio Ca(OH)_2	64
3.3.1.3.4. Reacción de precipitación con Subacetato de plomo $\text{Pb(CH}_3\text{COO)}_2 \cdot \text{Pb(OH)}_2$	64
3.3.1.3.5. Reacción de Fehling indirecta	65
3.3.1.4. Detección de esteroides/terpenos	65
3.3.1.4.1. Preparación del reactivo de Lieberman-Burchard	65
3.3.1.5. Reacciones para Antraquinonas	66
3.3.1.5.1. Reacción de Bornträger directa (Antraquinonas)	66
3.3.1.5.1. Reacción de Bornträger indirecta (Antraquinonas)	66
3.3.1.6. Reacciones de caracterización de alcaloides	66
3.3.1.7. Reacción para taninos con gelatina al 1%	67
3.4. CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (CCD)	67
3.4.1. FASE ESTACIONARIA	67
3.4.2. FASES MÓVILES:	67
3.4.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA	68
3.4.4. DETECCIÓN	69
3.4.4.1. Reactivos reveladores	69
3.4.4.1.1. Reactivo KOH etanólico 10%	70
3.4.4.1.2. Reactivo cloruro de antimonio-III- (SbCl_3)	70
3.4.4.1.3. Reactivo de Dragendorff (DRG):	70
3.4.4.1.4. Reactivo de productos naturales (RPN)	71
3.4.4.1.5. Reactivo Vainillin-sulfúrico (VS)	71
3.4.4.1.6. Reactivo de Anisaldehído - ácido sulfúrico (AS)	71
3.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA (HPLC-UV)	72
3.6. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES. MÉTODO DE FOLIN – CIOCALTEU	73

3.7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>GOMPHRENA PERENNIS</i> L	74
3.7.1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL	74
3.7.1.1. Reacción con el radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) de amonio (ABTS•+)	75
3.8. ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS	77
3.8.1. PREPARACIONES BIOLÓGICAS	77
3.8.1.1. Intestino aislado de rata	77
3.8.1.2. Corazones aislados de rata	78
3.8.1.3. Ratones utilizados para la realización de test para evaluar comportamiento	79
3.8.1.4. Ratas utilizadas para la evaluación de la presión arterial	79
3.8.1.5. Ratas utilizadas para la evaluación de la actividad diurética:	80
3.8.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA	80
3.8.2.1. Soluciones y drogas empleadas	80
3.8.2.1.1. Protocolos farmacológicos y cálculo de parámetros	81
3.8.2.1.1.1. Curvas concentración - respuesta (CCR) acumulativas con Carbacol (Cbl):	82
3.8.2.1.2. Curvas concentración - respuesta (CCR) acumulativas de calcio (Ca ⁺²) en medio de Tyrode-0-Ca ²⁺ -40 mM K ⁺	82
3.8.2.2. Tratamiento estadístico de los resultados	83
3.8.3. MEDICIONES MECÁNICO CALORIMÉTRICAS EN CORAZONES ENTEROS DE RATA PERFUNDIDOS	83
3.8.3.1. Soluciones y drogas empleadas	83
3.8.3.2. Mediciones mecánico-calorimétricas en corazones enteros perfundidos	84
3.8.3.3. Calibración y estabilización del calorímetro	85
3.8.3.4. Protocolos farmacológicos	87
3.8.3.4.1. Evaluación de los efectos de la perfusión directa de GphT en corazones aislados de rata	88
3.8.3.4.2. Evaluación de los efectos de la perfusión directa de 0,1% de GphT en corazones aislados de rata expuestos a I/R por atontamiento	88
3.8.3.4.3. Evaluación de los efectos de la administración oral GphT en corazones aislados de rata expuestos a I/R por atontamiento:	88
3.8.4. MEDIDAS DE ACTIVIDAD CENTRAL	89
3.8.4.1. Mediciones de la movilidad espontánea en ratones:	89
3.8.4.1.1. Test de campo abierto en ratones	89
3.8.4.1.2. Test de laberinto en cruz elevado:	91
3.8.5. MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN RATAS NORMOTENSAS:	93
3.8.5.1. Tratamiento estadístico de los resultados:	94
3.8.6. MEDIDAS DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA:	95
3.8.6.1. Tratamiento estadístico de los resultados:	96
4. RESULTADOS	97
4.1. ENSAYOS FITOQUÍMICOS:	98
4.1.1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE <i>G. PERENNIS</i> :	98
4.1.2. ANÁLISIS FITOQUÍMICO:	98
4.1.2.1. Antraquinonas:	99
4.1.2.1.1. Cromatografía de capa delgada (CCD) para antraquinonas:	99
4.1.2.2. Arbutina:	100
4.1.2.2.1. Cromatografía de capa delgada (CCD) para arbutina:	100
4.1.2.3. Ácidos hidroxámicos y fenoles:	100
4.1.2.4. Taninos:	100
4.1.2.5. Flavonoides:	101
4.1.2.5.1. Reacción de Shinoda:	101
4.1.2.5.2. Reacciones de toque sobre papel:	101

4.1.2.5.3. Cromatografía de capa delgada (CCD) para flavonoides:	102
4.1.2.6. Alcaloides:	103
4.1.2.6.1. Reacciones generales de coloración y precipitación para alcaloides:	104
4.1.2.6.2. Cromatografía de capa delgada (CCD) para alcaloides:	104
4.1.2.7. Esteroides:	106
4.1.2.8. Saponinas:	107
4.1.2.8.1. Reacciones de caracterización para saponinas:	107
4.1.2.8.2. Cromatografía de capa delgada (CCD) para saponinas:	108
4.1.2.9. Glicósidos cardiotónicos:	108
4.1.2.10. Terpenos:	110
4.1.2.11. Cumarinas:	111
4.1.2.12. Aceites esenciales:	111
4.1.3. Determinación de los perfiles cromatográficos:	112
4.1.3.1. Perfil cromatográfico del extracto metanólico total <i>G. perennis</i> (GphMeOHt)	112
4.1.3.2. Perfil cromatográfico del extracto DCM <i>G. perennis</i> (GphDCM)	113
4.1.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución con detección de absorción ultravioleta (HPLC-UV)	115
4.2. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL	119
4.2.1. Análisis por cromatografía en capa fina: revelado con DPPH•	119
4.3. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS	121
4.3.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA DE GpHT	121
4.3.1.1. Efectos de GphT sobre las Curvas Concentración Respuesta (CCR) de Carbacol (Cbl)	121
4.3.1.2. Efectos de GphT sobre las Curvas Concentración Respuesta (CCR) de Calcio (Ca ⁺²)	123
4.3.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA TINTURA DE <i>GOMPHRENA PERENNIS</i> (GpHT) EN CORAZONES AISLADOS DE RATA EXPUESTOS A UN MODELO DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN POR ATONTAMIENTO:	125
4.3.2.1. Efectos de la perfusión de tintura de <i>Gomphrena perennis</i> L (GpHT) en corazones de rata	126
4.3.2.2. Efectos de la perfusión de tintura de <i>Gomphrena perennis</i> (GpHT) al 0,1% frente a la injuria por isquemia reperfusión en corazones aislados de rata:	127
4.3.2.3. Efectos de la administración oral de tintura de <i>Gomphrena perennis</i> L. (GpHT) en corazones de ratas expuestos a un modelo de isquemia reperfusión con atontamiento moderado:	131
4.3.3. EFECTOS DE GpHT SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL DE RATAS:	134
4.3.4. ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DIURÉTICOS DE GpHT EN RATAS:	135
4.3.5. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE GpHT SOBRE LA ACTIVIDAD CENTRAL EN RATONES:	138
4.3.5.1. Efectos de GphT en la movilidad espontánea y enderezamientos en ratones:	138
4.3.5.1.2. Test de campo abierto en ratones:	138
4.3.5.1.2. Test de laberinto en cruz elevado (LCE):	140
5. DISCUSIÓN	143
5.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO:	144
5.1.1. FLAVONOIDES:	144
5.1.2. ALCALOIDES:	147
5.1.3. SAPONINAS:	148
5.1.4. TRITERPENOS Y ESTEROIDES:	148
5.1.5. GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS:	149
5.1.6. GRUPOS FITOQUÍMICOS AUSENTES EN <i>G. PERENNIS</i>	150
5.1.7. PERFILES CROMATOGRAFICOS:	150
5.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE <i>GOMPHRENA PERENNIS</i> L.	152
5.3. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS	154

5.3.1. ESTUDIO DEL EFECTO ANTIESPASMÓDICO DE LA TINTURA DE <i>GOMPHRENA PERENNIS</i> L.	154
5.3.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS SOBRE LA CONDUCTA DE LA TINTURA Y DECOCCIÓN DE <i>GOMPHRENA PERENNIS</i> L.	156
5.3.3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS CARDÍACOS DE LA TINTURA DE <i>GOMPHRENA PERENNIS</i> L. (GpHT)	158
5.3.4. ESTUDIO DEL EFECTO HIPOTENSOR DE LA TINTURA DE <i>GOMPHRENA PERENNIS</i> L. (GpHT)	163
5.3.5. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DIURÉTICOS DE LA TINTURA DE <i>GOMPHRENA PERENNIS</i> L. (GpHT)	165
6. CONCLUSIONES	167
7. PUBLICACIONES Y A FUTURO....	170
8. BIBLIOGRAFÍA:	173

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales o los productos derivados de ellas son un campo de estudio muy promisorio. Los fitoterápicos son considerados un medicamento seguro por presentar escasos efectos adversos debido a que sus principios activos se encuentran en baja concentración en las preparaciones que se utilizan habitualmente (Capasso y col., 2003). Simultáneamente, sabemos que todo lo natural no es inocuo y que a partir de plantas medicinales se han aislado principios activos de gran utilidad en terapéutica, que han servido para la elaboración de especialidades medicinales.

Tradicionalmente, las plantas medicinales han sido una gran fuente de principios activos, y en muchos casos han sido un importante punto de partida para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, en relación con la variedad y cantidad existente de especies medicinales, pocos son los estudios clínicos y preclínicos que se encuentran en bibliografía sobre el uso y efecto de las plantas medicinales.

Argentina, por su variedad de zonas climáticas, es fuente de numerosas especies vegetales y posee una amplia tradición de uso popular de plantas medicinales. Muchas de las plantas medicinales son utilizadas tradicionalmente por sus efectos a nivel gastrointestinal, como hipnóticos o digestivos, antidiarreicos y carminativos (Soraru y Bandoni, 1978). Sin embargo, sólo muy pocas especies han sido validadas científicamente y se conoce ciertamente la actividad farmacológica. Siendo la información sobre el mecanismo de acción aún más escasa (Alonso y Desmarchelier, 2005; Capasso y col., 2003). Es por ello, que surge la necesidad de evaluar experimentalmente las propiedades farmacológicas de nuestras plantas medicinales, de modo de avalar o desaconsejar ciertos usos populares. Además, los estudios farmacológicos en varios sistemas permiten

encontrar posibles efectos adversos y precauciones o contraindicaciones, así como nuevas aplicaciones terapéuticas de una determinada planta medicinal.

Dado que el enfoque etnofarmacológico es de gran importancia para completar el vademécum fitoterápico con los efectos comprobados, tanto de utilidad terapéutica como los adversos, esta tesis contribuirá en tal aspecto estudiando la farmacodinamia cardiovascular, gastrointestinal y en la conducta espontánea, así como la caracterización fitoquímica de extractos de *Gomphrena perennis* L. (Amaranthaceae).

1.1. Antecedentes:

1.1.1. Familia Amaranthaceae

La familia Amaranthaceae Juss. corresponde al orden Caryophyllales y a la subclase Caryophyllidae, fue descrita en 1789 por el médico y botánico francés Antoine-Laurent de Jussieu, quien propuso su nombre. Está compuesta por cerca de 65 géneros y 900 especies (Cronquist, 1981). Sin embargo, los análisis filogenéticos más recientes (Judd y col., 2002; APG, 2003; Müller y Borsch, 2005) proponen que la familia Chenopodiaceae debe incluirse en Amarantáceas, con lo cual pasaría a estar compuesta por 169 géneros y 2360 especies en el todo el mundo. En Argentina se pueden encontrar 26 géneros y aproximadamente 224 especies (Zuloaga y col., 2008; Stevens, 2001).

Entre las contribuciones más importantes al conocimiento de la familia de esta se encuentra Moquin-Tandon, (1849) quien incluyó 451 especies y 43 géneros agrupados en tres tribus: Celosieae, Achyrantheae y Gomphreneae. En 1880 Bentham y Hooker conservaron las tres tribus, pero propusieron cambiar el nombre de la tribu Achyrantheae por el de Amarantheae, con dos subtribus diferenciadas por la posición del óvulo y el tamaño del funículo. Por su parte Schinz, (1934) realizó un tratamiento posterior para la

familia, en el que incluyó 693 especies y 63 géneros. El sistema de clasificación de Schinz se basó en los sistemas propuestos por Moquin-Tandon (1849) así como Bentham y Hooker (1880), considerando también los caracteres florales, como número de lóculos en las anteras, organización de las flores, dehiscencia del fruto, forma del estigma, posición de los estambres y orientación de la semilla. Sin embargo, dividió la familia en dos subfamilias: Amaranthoideae, compuesta por las tribus Celosieae y Amarantheae, y Gomphrenoideae constituida por Brayulineae y Gomphreneae. A su vez, subdividió la tribu Amarantheae en dos subtribus, con base en la orientación de la semilla: Amaranthinae y Achyranthinae; subdividió la tribu Gomphreneae en las subtribus Gomphreninae y Froelichiinae por la forma del estigma; y dividió la tribu Brayulineae en las subtribus Brayulineinae y Tidestromiinae, con base en la posición de los estambres. Más adelante, Mears (1967) siguió la clasificación de Schinz (1934), considerando un sólo cambio, el cual consistió en reunir las tribus de la subfamilia Gomphrenoideae en una sola denominada *Gomphreneae*.

La importancia económica de la familia radica principalmente en su valor ornamental, sus hojas, tallos e inflorescencias son vistosas, (*Celosia* ("Cresta de gallo"), *Iresine*, *Gomphrena*). En los últimos años ha resurgido el interés por cultivar especies de *Amaranthus*, debido a que sus semillas tienen un alto valor proteico comparable al de otros granos como el trigo y el arroz. (Agudelo, 1991) Ciertas especies de *Alternanthera* y *Amaranthus* poseen propiedades medicinales. (Carrizo, 1998) y varias son malezas importantes. (Sánchez-Del Pino, 1999).

1.1.1.1. Distribución geográfica:

Las especies de la familia Amarantáceas se distribuyen (Fig. 1) en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, con extensiones a las zonas templadas (Agudelo, 2008), pueden desarrollarse en una gran diversidad de hábitats encontrándose en zonas áridas, en ambientes con condiciones severas, otras crecen en bosques tropicales perturbados, muy pocas son marinas, acuáticas o semiacuáticas (Robertson, 1981)



Figura 1. Distribución geográfica de Amarantáceas. (Missouri Botanical Garden)

1.1.1.2. Antecedentes botánicos:

Anatómicamente, las Amarantáceas se pueden caracterizar por presentar un sistema subterráneo con crecimiento secundario anómalo, con anillos o arcos de periciclo, que producen una sucesión de paquetes vasculares embebidos en el tejido parenquimatoso. Estos anillos o arcos pueden formar círculos concéntricos o estar distribuidos irregularmente. (Townsend, 1993)

Son hierbas, subarbuscos o arbustos, anuales o perennes, dioicas o monoicas; glabras o tomentosas, con **tallos** erectos a decumbentes, rastreros o trepadores, a veces flotantes, simples o muy ramificados, rara vez espinosos, suculentos y/o articulados, glabros o densamente pubescentes con mayor cantidad de tricomas en la parte superior de la planta. **Hojas** simples, opuestas o alternas, reducidas en tamaño hacia el ápice a manera de brácteas en la inflorescencia, sésiles o pecioladas; pecíolo acanalado; lámina elíptica, ovada, obovada, linear-lanceolada o romboide, margen entera, base cuneada, redondeada o decurrente, ápice agudo, acuminado, mucronado, retuso, obtuso o emarginado, venación pinnada, camptódroma, broquidódroma o eucamptódroma. Cartáceas a suculentas, hojas superiores más pubescentes que las inferiores, envés más pubescente que el haz sin estípulas, generalmente con un mechón de tricomas en las axilas de las hojas y en los pecíolos, tricomas simples, uncinulados a dendríticamente ramificados (de tipo completamente ramificados y basalmente ramificados). **Inflorescencia** de tipo espiga, racimo o panículas de espigas, simples o compuestas, rara vez flores solitarias, axilares y/o terminales, sésiles o pediceladas. **Flores** regulares, perfectas o menos frecuente imperfectas, actinomorfas, pequeñas, inconspicuas, con 1 bráctea y 2 bractéolas. Perigonio (2-4-) 5, generalmente libre, papiráceo o escarioso. Estambres (2-4-) 5 epitépalos; filamentos libres o soldados formando una cúpula, en la cual se encuentran a veces pseudoestaminodios que alternan con los estambres; anteras dorsifijas, monotecas o ditecas de dehiscencia longitudinal. **Ovario** globoso, subgloboso o cilíndrico; estilos 1-2; estigmas bífidos, trífidos, bilabiados, truncados, o penicilados. **Fruto** generalmente seco, monospermo, indehiscente o dehiscente. **Semilla** una o más, lenticular, subglobosa o subreniforme, parada o negra, algunas veces con arilo; embrión curvo, endosperma harinoso. (Robertson, 1981)

1.1.1.3. Antecedentes de uso medicinal de la familia Amarantáceas:

1.1.1.3.1. *Amaranthus muricatus* (Moq.) Gillies ex Hicken.

- *Nombre común:* “Yerba meona”, “paiquillo”, “ataco” (Fig. 2)
- *Usos populares no comprobados científicamente:*

Tradicionalmente la infusión se usa como diurética, laxante, emoliente y en cataplasma para supurar las infecciones de la piel. (Toursarkissian, 1980; Gorzalczany y col., 1999)

- *Composición química:*

Alcaloides, antraquinonas (dantrón, crisofanol, emodina y reína aisladas como geninas de la fracción hidrolizada en medio ácido, dantrón y 1,6,8-trihidoxi-3-carboxiantraquinona como geninas de la fracción de hidrólisis oxidativa); esteroides, flavonoides (quercetina, ramnetina, isoramnetina, patuletina, penduletina y robinetina aislados como geninas del extracto obtenido con acetona, 3-O-galactósidoquercetina, quercetrina, rutina, 3-O-galactósidoisoramnetina, jaceína, 3-O-rutinósidoisoramnetina, robinina, centaurelna, patueltrina, 3-O-glucósidopatuletina y 3-O-rutinósidopatuletina aislados como glucósidos del extracto metanólico) y saponinas. (Ruiz y col., 2001)



Figura 2. *Amaranthus muricatus* (Moq.) Gillies ex Hicken. (Missouri Botanical Garden)

1.1.1.3.2. *Alternanthera pungens* H.B.K.

Nombre común: “Yerba de pollo” (Fig. 3)

- *Usos populares no comprobados científicamente:*

La planta entera es empleada tradicionalmente en el tratamiento de trastornos gástricos, hepáticos e intestinales y la parte aérea se usa como diurético y emoliente. (Sorarú y Bandoni, 1978)

La especie está codificada en la Farmacopea Nacional Argentina en su sexta edición (FA, Ed 6. 1978)

- *Propiedades farmacológicas comprobadas científicamente:*

Los extractos etanólicos de la parte aérea y el fruto, así como la infusión de *Alternanthera pungens* presentó actividad diurética significativa, la excreción volumétrica urinaria y la excreción urinaria de sodio producida por el extracto etanólico fue similar a la furosemida. (Calderón, 1998)

Además se ha estudiado la actividad antiespasmódica en músculo liso intestinal, la cual resultó ser dosis dependiente y fue bloqueada por atropina. La actividad antiespasmódica encontrada a partir de la infusión del fruto de *Alternanthera pungens* fue mayor que la encontrada en los preparados realizados a partir de tallos y hojas. Además se encontró que la infusión de *Alternanthera pungens* presentó un efecto uterotónico dosis-dependiente.

El extracto acuoso de la parte aérea y las infusiones de fruto, tallo y hojas de *Alternanthera pungens* produjeron un descenso significativo en la presión arterial y una disminución de la contractilidad cardiaca dependiente de la dosis lo que puede llegar a ocasionar un paro diastólico.

Alternanthera pungens tuvo efecto hepatoprotector e hipocolesterolémico, ensayos toxicológicos indicaron que posee un índice terapéutico elevado, no presenta toxicidad a nivel del sistema nervioso central, no modifica la fertilidad ni la reproducción y no afecta la mucosa gástrica. (Calderón, 1998)



Figura 3. *Alternanthera pungens* H.B.K. (Missouri Botanical Garden, 2017)

- Composición química:

Flavonoides (7-O-ramnoquercetina, rutina, 3,7-diglucósidoquercetina y 3-metiléter-4'-O-glucósido-7-O-diglucósidoquercetina han sido aislados de la fracción soluble en metanol de los frutos); antraquinonas (crisofanol y reína fueron aisladas de la fracción soluble en metanol de los frutos) (Ruiz y col., 1996); heterósido saponínico cuya genina es el ácido oleanólico y la parte glucosídica está formada por glucosa y ramnosa; (Ruiz y col., 1991) además se ha identificado como constituyente colina como cloruro en la fracción que corresponde a las bases de amonio cuaternario. (Ruiz y col., 1993)

1.1.1.3.3. Género *Pfaffia* Mart.:

El género *Pfaffia* Mart. Pertenece a la tribu Gomphreneae, incluye aproximadamente 34 especies, distribuidas en Norteamérica, Centro y Sur, sus especies se distribuyen en el área neotropical, extendiéndose desde el sur de México a través de los trópicos, incluyendo la cuenca amazónica hasta Bahía Blanca en Argentina (Borsch, 1995), siendo el área del Sudeste de Brasil el principal centro de diversidad del género. (Siqueira, 1994/1995; Siqueira y col., 1986)



Figura 4. Sistema subterráneo *Pfaffia glomerata* (Spreng.) (Marchioretto, 2008)

Este género, aunque muy cercano morfológicamente del género *Gomphrena*, difiere de él en algunos aspectos tales como: tubo corto estaminal con hilos unidos hasta la mitad de los labios laterales ciliados, estilete casi siempre ausente y estigma bilobado o capitado (Siqueira, 1992).

- *Usos populares no comprobado científicamente:*

Las plantas del género *Pfaffia* son popularmente conocidas como "paratudo" y "ginseng brasileño" (Siqueira y col., 1986) y son ampliamente utilizadas en la medicina popular brasilera como tónica, además de tener propiedades afrodisíacas, analgésicas y

anti-diabéticas, pueden actuar contra el cáncer, para mejorar el proceso de curación, y contrarrestar los trastornos gástricos y el reumatismo (Oliveira, 1986)



Figura 5. *Pfaffia glomerata* (Spreng.) (Marchioretto, 2008)

- **Composición química:** Los principales constituyentes de las raíces de *Pfaffia* son estigmasterol, sitosterol y sus glicósidos, alantoína, nor-triterpenoides (como el ácido pfaffico y sus saponinas denominadas pfaffosideos A, B, C, D, E y F), triterpenoides y ecdisteroides. (Nakai, 1984; Nishimoto y col., 1984; Shiobara y col., 1993; Zimmer y col., 2006)

1.1.1.4. Antecedentes fitoquímicos de la familia Amarantáceas:

Bioquímicamente, la familia Amarantáceas se caracteriza por la presencia de pfaffosideos, saponinas (Shiobara y col., 1993); ecdisteroides (Nishimoto y col., 1987); esteroides (Takemoto y col., 1983; Nakaí y col., 1984; Nishimoto y col., 1984); triterpenoides, protoalcaloides, flavonoides; (Ferreira y Dias, 2004) betacianinas (Cai y col., 2001) y alcaloides de poliamida (Martin-Tanguy y col., 1978). Son acumuladoras de oxalato de calcio y nitrato de potasio y tienen paredes celulares con ácido felúrico. Al igual que otras familias de Caryophyllales, tienen especies con tipos de fotosíntesis C3 y C4 (Cronquist, 1981; Cronquist y Thorne, 1994).

Aunque la familia Amarantáceas tiene una cantidad relativamente grande de géneros, sólo un número limitado de especies han sido estudiadas químicamente. Dentro de estos, el género *Gomphrena*, a pesar de ser el segundo con mayor número de especies en la familia (Handro, 1964), carece de estudios sobre los extractos crudos o compuestos aislados de sus especies estudiadas, con pocos trabajos disponibles en la literatura, desde el punto de vista farmacológico y fitoquímico. (Mahmoud, 2010)

1.1.2. Género *Gomphrena* L.

1.1.2.1. Distribución geográfica:

El género *Gomphrena* perteneciente a la tribu *Gomphreneae* comprende aproximadamente 120 especies encontradas en América, Australia e Indo-Malasia, (Siqueira, 1994/1995) de las cuales cerca de 100 especies son americanas, mientras que las especies australianas referidas a *Gomphrena* probablemente deben excluirse del género. (Zuloaga, 2012)

Las regiones más ricas en especies son Brasil central y austral, el sur de los EE.UU. con México septentrional y en parte el Caribe, el noroeste argentino con el sur de Bolivia; además, varias especies son difundidas como malezas o por el cultivo hasta parecer cosmopolitas (Zuloaga, 2012). En general, todas son especies muy bien adaptadas a distintos tipos de suelos y ambientes (Marzocca, 1984).



Figura 6. Distribución geográfica del género *Gomphrena* L. (Missouri Botanical Garden)

En Argentina Más de 70 especies, variedades y formas del género *Gomphrena* se citan en los herbarios de la Argentina, con ejemplares coleccionados en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Misiones, Santa Fe, La Pampa, Santiago del Estero y San Luis. (Zuloaga, 2012)

1.1.2.2. Antecedentes botánicos de las especies de *Gomphrena*:

La mayoría de las especies de *Gomphrena* son arbustos o hierbas, generalmente con sistemas subterráneos espesados de naturaleza leñosa (xilópodos) o suculentas (raíces tuberosas) (Siqueira, 1992).

Incluye hierbas anuales o perennes, raramente sub-arbustos, erguidos, decumbentes, con sistemas subterráneos generalmente desarrollados. Los tallos son nodosos, generalmente ramificados, lisos o estriados, glabros o pilosos. Las hojas se presentan enteras o reducidas, roscadas, opuestas o alternas; ovadas, lineales, lanceoladas, oblongas, subcordadas, obovadas o espatuladas; base atenuada, obtusa o semi-irregada; ápice agudo, acuminado, obtuso o apiculado; sésiles, o pecioladas, nervios centrales prominentes, glabras o pilosas. Perigonio amarillento, rosado, rojo amarillento o amarillo ennegrecido. Las flores presentan cinco sépalos soldados sólo en la base, ovario bicarpelar, ovado, oblongo o turbinado, uniovulado, estilete semi-alargado corto; estigma bífido. Fruto indehiscente; semilla lenticular u oblonga, embrión con radícula ascendente (Siqueira, 1989).

1.1.2.3 Antecedentes de uso medicinal de las especies de *Gomphrena*:

Los miembros de este género se emplean en la medicina popular en el tratamiento de varias enfermedades y por su valor nutritivo (Salvador y col., 2012) a continuación se detallan algunos ejemplos:

1.1.2.3.1. *Gomphrena globosa* L.

Nombre común: “Siempreviva”, “Botón de soltero”, “Manto de cristal”. (Fig. 7)

- *Usos populares no comprobados científicamente:*

La parte aérea de *G. globosa* se usa tradicionalmente para el tratamiento de oliguria, calor, empacho (Rahman y col., 2012), diabetes, ictericia, hipertensión (Lans, 2006), tos (Nanadagopalan, 2015), ronquera, bronquitis y otras enfermedades respiratorias principalmente como expectorante, (Camejo-Rodriguez y col., 2003), en problemas de próstata (Lans, 2006), como antidiarreico (Beyra y col., 2004), para el corazón, los riñones y la circulación. (Pirondo y col., 2011)



Figura 7. *Gomphrena globosa* (Missouri Botanical Garden)

- *Propiedades farmacológicas comprobadas científicamente:*

Los extractos metanólico y la fracción soluble en hexano de *G. globosa* mostraron actividad antioxidante (Hamiduzzaman y Azam, 2012) y actividad analgésica significativa a dosis de 400 mg/Kg siendo mayor después de los 30 minutos de administración, mientras que desapareció pasada una hora de la administración (Hamiduzzaman, 2013)

La fracción soluble en cloroformo y en tetracloruro de carbono presentó actividad citotóxica, anticancerosa y antimicrobiana con potencia leve a moderada. (Hamiduzzaman y Azam, 2012; Latha y col., 2013) Mientras que el extracto etanólico de las hojas de *G. globosa*, preparado por maceración, promueve la actividad hipotensora sin afectar la función cardíaca. (Arcanjo y col., 2011)

Las inflorescencias *G. globosa* son potencialmente útiles para las industrias alimentaria y farmacéutica por su actividad antiinflamatoria y antioxidante. (Andrade y col., 2012)

- *Composición química:*

Bouillant y col., (1978) informaron por primera vez el aislamiento del flavonol gomphrenol (Tabla 1) de las hojas de *G. globosa*; así como de una serie de fenólicos comunes, presentes en cantidades considerables. Las inflorescencias violeta de *G. globosa* contiene, además de pequeñas cantidades de amarantina, isoamarantina y celosianina, otros siete pigmentos violetas del grupo gomfrenina (Tabla 1), todos ellos pertenecientes a las betacianinas (Minale y col., 1967; Heuer y col., 1992). Así mismo Corke y col., (2005) identificaron seis tipos de gomfrenina mediante la caracterización por HPLC de cromatografía líquida de alto rendimiento [HPLC] de fase inversa [RP]. El *screening* fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *G. globosa* detectó la presencia de saponinas, alcaloides, azúcares reductores y cumarinas (Arcanjo y col., 2011). Por otro

lado a partir del extracto bruto de metanol de la planta entera fueron aislados mediante una combinación de cromatografía en columna y cromatografía en capa fina preparativa sobre gel de sílice estigmasterol, β -sitosterol y ácido isocavícínico (Hamiduzzaman y Azam, 2012). Biswas y col., (2013) detectaron Arginina-betaxantina como una nueva betaxantina y el pigmento amarillo Ulluco en inflorescencias de *G. globosa*. Por otra parte Roriz y col., (2014) encontraron en la infusión una alta concentración de ácidos orgánicos: principalmente ácidos málico, oxálico, cítrico, fumárico, α -Tocoferol, β -Tocoferol, γ -Tocoferol.

1.1.2.3.2. *Gomphrena celosioides* Mart.

Nombre común: "perpetua", "botón de soltero", "globo-amaranto postrado" (Fig. 8)



Figura 8. *Gomphrena Celosioides* (Missouri Botanical Garden)

- *Usos populares no comprobadas científicamente:*

El jugo de la planta entera de *G. celosioides* combinado con pimienta (*Piper nigrum*) y jugo de limón es tradicionalmente usado para curar la urolitiasis, (Prachi y col.,

2009), mientras que la infusión o decocción ha sido utilizada para el tratamiento de la hepatitis viral A y C (Guinnin y col., 2015)

G. celosioides también es usada para el tratamiento de diversas enfermedades dérmicas, infecciosa y parasitarias (Tarnam y col., 2014)

- *Propiedades farmacológicas comprobadas científicamente:*

Sharma y Vijayrergia, (2011) estudiaron los extractos metanólicos de la hoja, el tallo y la raíz de *G. celosioides* y demostraron su eficacia antimicrobiana contra las tres bacterias evaluadas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*). Por otra parte, los extractos de acetato de etilo y metanol mostraron actividad antimicrobiana inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* (Dosumu y col., 2010)

Por su parte, el extracto metanólico de *G. celosioides* también presentó actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* a una concentración de 2000 µg/ml. (Abalaka & Damisa, 2013) y actividad antihelmínticas contra *Pheretimia pasthuma*, *Fasciola gigantica* y *Taenia solium*.(Dosumu y col., 2005)

En un estudio realizado por Oladele y colaboradores, (2009) demostró actividad antiinflamatoria de esta planta dado que inhibió el edema inducido por carragenina en patas de rata.

El extracto de *G. celosioides* mostró efectos diuréticos, natriuréticos (De Paula Vasconcelos y col., 2017) y hepatoprotectores dado que disminuyó las transaminasas séricas, la fosfatasa alcalina y los niveles de bilirrubina (Sangare y col., 2012). Además, *G. celosioides* redujo significativamente las úlceras gástricas inducidas por indometacina en ratas mostrando un efecto anti-ulcerogénico relevante. (Oluwabunmi y Abiola, 2015)

- *Composición química:*

Un estudio fitoquímico inicial con *G. celosioides* reportó la presencia de saponinas, esteroides, aminoácidos, azúcares reductores y no reductores, flavonoides, fenoles, betacianinas y cetonas (Botha y Gerritsma-Vander Vijver, 1986). En las huellas dactilares de espectrometría de masas (ESI-MS), fue posible confirmar la presencia de ácidos fenólicos y flavonoides. (De Paula Vasconcelos y col., 2017)

A partir del fraccionamiento del extracto etanólico de la parte aérea de *G. celosioides* se aislaron los ácidos 4-hidroxibenzoico y 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (o ácido vainílico), estigmasterol, sitosterol, campesterol, palmitato de metilo y estigmasterol-6-en-3-O β - (D - glucopiranosido) (Moura y col., 2004). Aurantiamida y acetato de aurantiamida (Fig. 9) fueron aislados a partir del percolado con n-hexano de *G. celosioides* por medio de cromatografía en columna sobre gel de sílice con 5% de cloroformo en n-hexano y elucidados por análisis espectroscópico usando IR, RMN (¹H y ¹³C) y EI-MS. (Dosumu y col., 2014)

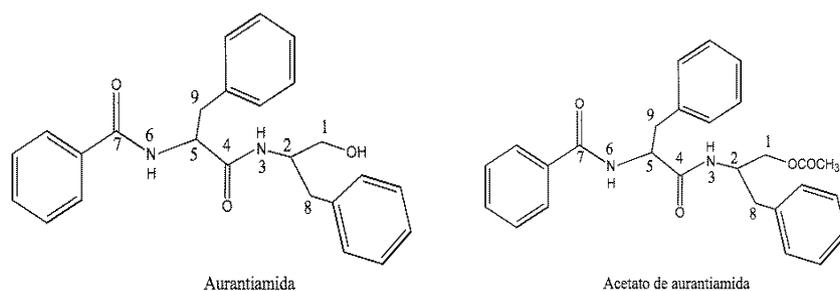


Figura 9. Compuestos aislados de *Gomphrena celosioides*. (Dosumu y col., 2014)

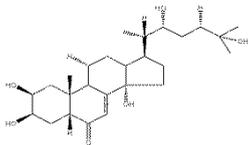
1.1.2.4. Antecedentes fitoquímicos:

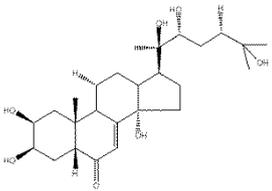
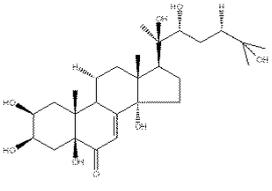
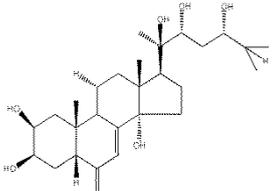
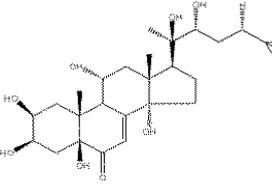
Estudios químicos anteriores con especies de este género nativas de Argentina se relacionaron con el aislamiento de hidrocarburos, alcoholes, esteroides, triterpenoides, ecdisteroides, flavonoides y protoalcaloides. (Buschi y col., 1979, 1980, 1981; Buschi y Pomilio, 1982b; Buschi, 1982; Buschi y Pomilio, 1982a; Buschi y Pomilio, 1983)

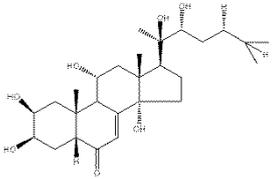
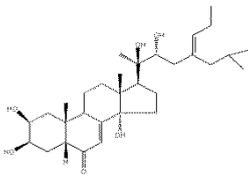
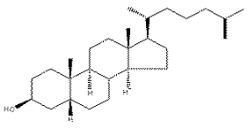
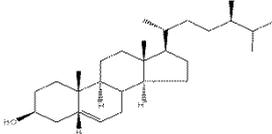
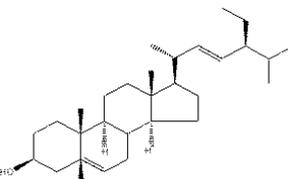
Se han realizado investigaciones sobre la naturaleza química de betalainas en el género *Gomphrena*, es decir, las betacianinas de color rojo a violeta y las betaxantinas amarillas (Hegnauer 1964; Gibbs 1974). *Gomphrena martiana* y *Gomphrena boliviana* producen raras flavonas 5,6,7-trisustituídas y un flavonoide glicosilado, isoramnetina 3-O- β -robinobiosido (Tabla 1), altamente activo contra una bacteria ácida-rápida, *Mycobacterium Phlei* (Pomilio y col., 1992).

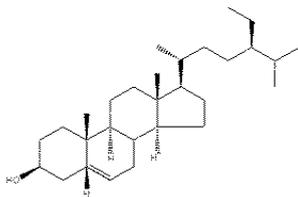
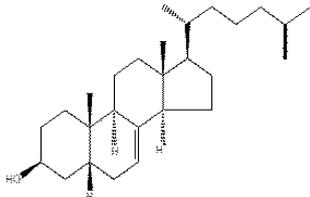
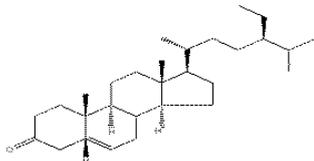
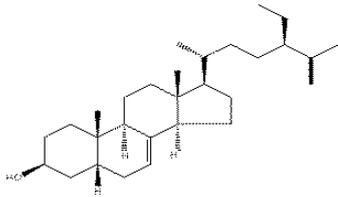
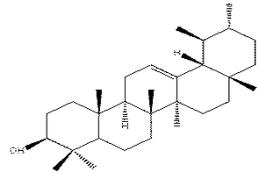
A pesar de los estudios de actividad fitoquímica (Tabla 1) y biológica que se han realizado en ciertas especies, en general sigue siendo necesario profundizar estudio del género *Gomphrena*. (Salvador y col., 2012)

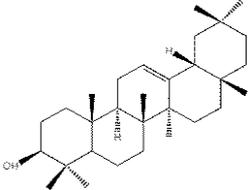
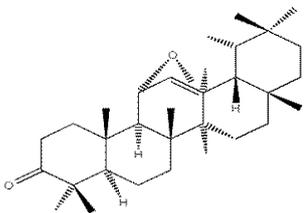
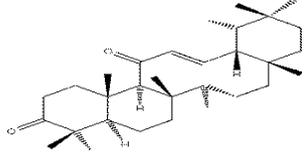
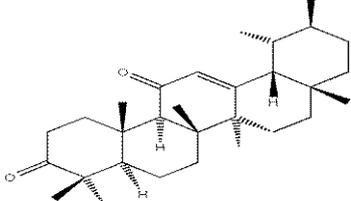
Tabla 1. Compuestos presentes en especies del género *Gomphrena*.

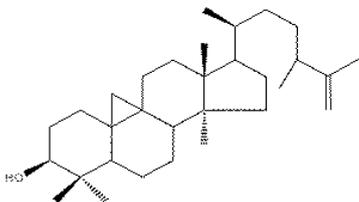
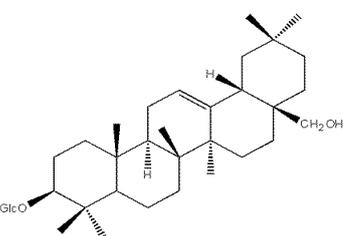
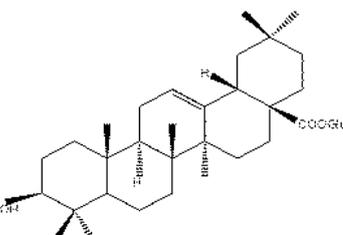
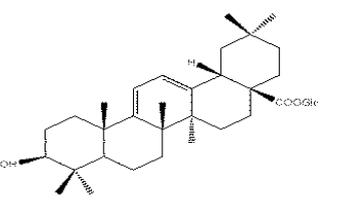
Tipo de compuestos	Nombre de los compuestos	Especies	Referencia
Esteroides	Ecdisona 	<i>G. affinis</i> ^j <i>G. canescens</i> ^j <i>G. cunninghamii</i> ^j <i>G. adispersa</i> ^{c, d, g, i, j} <i>G. haageana</i> ^{c, d, g, i, j}	Savchenko y colaboradores; (1998)

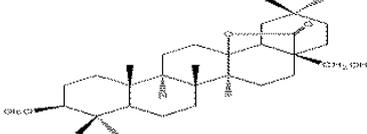
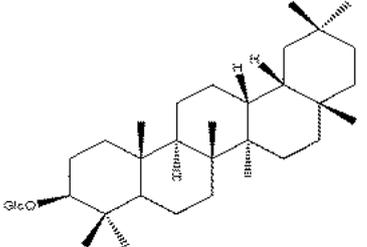
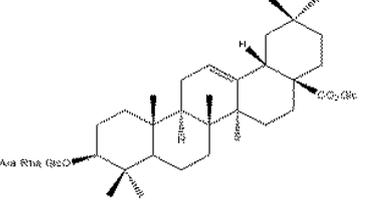
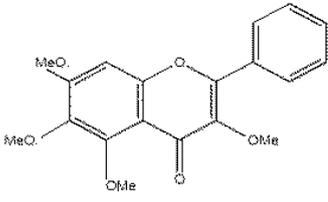
	<p>20-hidroxicdisona</p> 	<p><i>G. affinis</i>^j <i>G. canescens</i>^j <i>G. cunninghamii</i>^j <i>G. dispersa</i>^{c, d, g, i, j} <i>G. haageana</i>^{c, d, g, i, j} <i>G. officinalis</i>^d <i>G. celosioides</i>^a <i>G. haenkeana</i>^a <i>G. meyeniana</i>^a <i>G. perennis</i>^a</p>	<p>Buschi y Pomilio, (1983) Savchenko y colaboradores; (1998) Sarker y colaboradores; (1996) Young, y colaboradores; (1992) Barneji, y colaboradores; (1971)</p>
	<p>Polipodina B</p> 	<p><i>G. affinis</i>^j <i>G. canescens</i>^j <i>G. cunninghamii</i>^j <i>G. dispersa</i>^{c, d, g, i, j} <i>G. haageana</i>^{c, d, g, i, j}</p>	<p>Savchenko y colaboradores; (1998) Sarker y colaboradores; (1996)</p>
<p>Esteroides</p>	<p>Pterosterona</p> 	<p><i>G. affinis</i>^j <i>G. canescens</i>^j <i>G. cunninghamii</i>^j <i>G. dispersa</i>^{c, d, g, i, j} <i>G. haageana</i>^{c, d, g, i, j}</p>	<p>Savchenko y colaboradores; (1998)</p>
	<p>Muristerona A</p> 	<p><i>G. affinis</i>^j <i>G. canescens</i>^j <i>G. cunninghamii</i>^j <i>G. dispersa</i>^{c, d, g, i, j} <i>G. haageana</i>^{c, d, g, i, j}</p>	

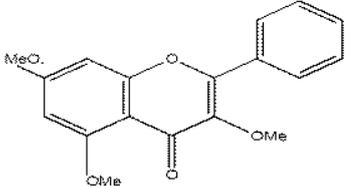
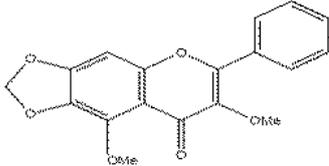
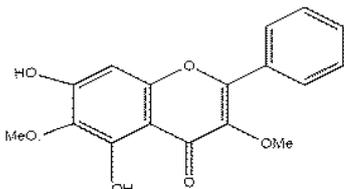
	<p>Ajugasterona C</p> 	<p><i>G. affinis</i>^j <i>G. canescens</i>^j <i>G. cunninghamii</i>^j <i>G. dispersa</i>^{c, d, g, i, j} <i>G. haageana</i>^{c, d, g, i, j}</p>	
	<p>24(28) dehidroamarasterona B</p> 	<p><i>G. affinis</i>^j <i>G. canescens</i>^j <i>G. cunninghamii</i>^j <i>G. dispersa</i>^{c, d, g, i, j} <i>G. haageana</i>^{c, d, g, i, j}</p>	
	<p>Colesterol</p> 	<p><i>G. martiana</i>^a <i>G. boliviana</i>^a <i>G. meyeniana</i>^a</p>	<p>Buschi y Pomilio, (1983)</p>
	<p>Campesterol</p> 	<p><i>G. martiana</i>^a <i>G. boliviana</i>^a <i>G. meyeniana</i>^a</p>	
<p>Esteroides</p>	<p>Estigmasterol</p> 	<p><i>G. martiana</i>^a <i>G. boliviana</i>^a <i>G. meyeniana</i>^a</p>	

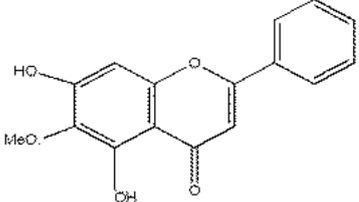
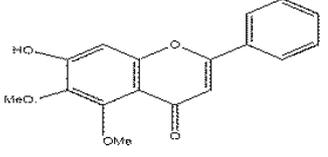
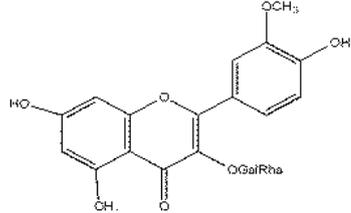
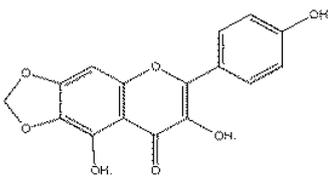
	<p>β-sitosterol</p> 	<p><i>G. holosericea</i>ⁱ <i>G. martiana</i>^a <i>G. boliviana</i>^a <i>G. meyeniana</i>^a</p>	<p>Buschi y Pomilio, (1983) Sant'Ana y colaboradores; (1977)</p>
	<p>Colest-7-em-3-β-ol</p> 	<p><i>G. martiana</i>^a <i>G. boliviana</i>^a <i>G. meyeniana</i>^a</p>	
	<p>Sitosterona</p> 	<p><i>G. martiana</i>^a <i>G. boliviana</i>^a <i>G. meyeniana</i>^a</p>	<p>Buschi y Pomilio, (1983) Buschi y Pomilio, (1982) Buschi y Pomilio, (1982a)</p>
	<p>Sitost-7-en-3-β-ol</p> 	<p><i>G. martiana</i>^a <i>G. boliviana</i>^a <i>G. meyeniana</i>^a</p>	
<p>Triterpenos</p>	<p>α-amirina</p> 	<p><i>G. boliviana</i>^a</p>	<p>Buschi y Pomilio, (1983) Buschi y Pomilio, (1982a) Buschi y colaboradores; (1981)</p>

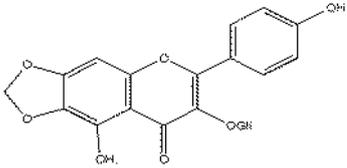
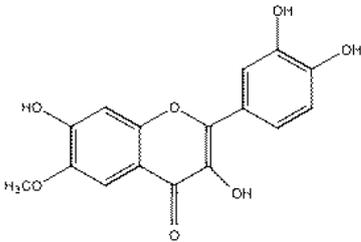
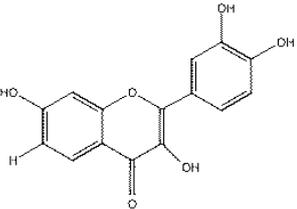
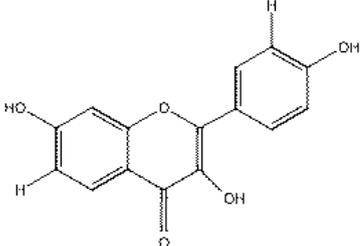
<p>β- amirina</p> 	<p><i>G. martiana</i>^a <i>G. boliviana</i>^a <i>G. meyeniana</i>^a</p>	
<p>3-oxo-11α, 12α-epoxi-D-friedoolean-14-eno</p> 	<p><i>G. clausenii</i>^a</p>	<p>(Ferreira y Dias, 2004)</p>
<p>olean-12-en-3,11-diona</p> 		
<p>urs-12-en-3,11-diona</p> 		

	<p>Ciclolaudenol</p> 	<p><i>G. martiana</i>^a <i>G. meyeniana</i>^a</p>	<p>Buschi y Pomilio, (1982a) Buschi y colaboradores; (1981)</p>
Saponinas	<p>Acido-28-O-β-D-glucopiranosil- ester-olean-11-eno</p> 	<i>G. crocephala</i> ^d	Young y colaboradores; (1997)
	<p>3-O-β-D-glucopiranosil- eritrodiol</p> 		
	<p>28-O-β-D-glucopiranosil-ester- olean-9(11),12-dieno</p> 		

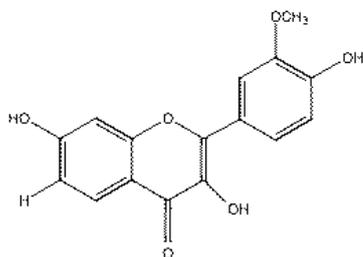
	<p>3-O-β-D-glucopiranosil-11,12-epoxi-olean-28,13-olide</p> 		
	<p>3-O-β-D-glucopiranosil-olean-28,13-olide</p> 		Young y colaboradores; (1997)
	<p>Gomphrenosido</p> 	<i>G. globosa</i> ^a	Tsuji y colaboradores; (1998)
Flavonoides	<p>3,5,6,7-tetrametoxi-flavona</p> 	<i>G. boliviana</i> ^a <i>G. martiana</i> ^a	Pomilio y colaboradores; (1994) Buschi Y Pomilio, (1983) Buschi Y Pomilio, (1982a) Buschi y Pomilio, (1982) Buschi y colaboradores; (1981) Buschi y colaboradores., (1980)

	<p>3,5,7-trimetoxi-flavona</p> 	<p><i>G. boliviana</i>^a <i>G. martiana</i>^a</p>	<p>Buschi y Pomilio, (1983) Buschi y Pomilio, (1982a) Buschi y Pomilio, (1982) Buschi y colaboradores; (1981) Buschi y colaboradores., (1980)</p>
	<p>3,5-dimetoxi-6,7-metillenodioxi-flavona</p> 	<p><i>G. boliviana</i>^a <i>G. martiana</i>^a</p>	<p>Pomilio y colaboradores; (1994) Buschi y Pomilio, (1983) Buschi y Pomilio, (1982a) Buschi y Pomilio, (1982) Buschi y colaboradores; (1981) Buschi y colaboradores; (1980) Buschi y colaboradores; (1979)</p>
	<p>5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona</p> 	<p><i>G. boliviana</i>^a <i>G. martiana</i>^a</p>	<p>Pomilio y colaboradores; (1994) Buschi y Pomilio, (1983) Buschi y Pomilio, (1982a) Buschi y Pomilio, (1982) Buschi y colaboradores; (1981) Buschi y colaboradores; (1980)</p>

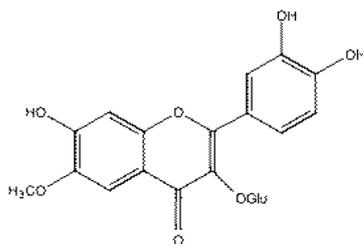
<p>5,7-dihidroxi-6-metoxi-flavona</p> 	<p><i>G. boliviana</i>^a <i>G. martiana</i>^a</p>	<p>Pomilio y colaboradores; (1994) Buschi y Pomilio, (1983) Buschi y Pomilio, (1982a) Buschi y Pomilio, (1982) Buschi y colaboradores; (1981)</p>
<p>7-hidroxi-5,6-dimetoxi-flavona</p> 	<p><i>G. boliviana</i>^a <i>G. martiana</i>^a</p>	<p>Buschi y Pomilio, (1983) Buschi y Pomilio, (1982a) Buschi y Pomilio, (1982) Buschi y colaboradores; (1981)</p>
<p>Isoramnetina-3-O-robinobiosid</p> 	<p><i>G. martiana</i>^a</p>	<p>Buschi y Pomilio, (1983) Buschi y Pomilio, (1982a) Buschi y Pomilio, (1982)</p>
<p>3, 4'-5-trihidroxi-6-7-metilenodioxi-flavonol (Gomphrenol)</p> 	<p><i>G. globosa</i>^c</p>	<p>Bouillant y colaboradores; (1978)</p>
<p>4'-5-dihidroxy-6-7-</p>	<p><i>G. globosa</i>^c</p>	<p>Chong y colaboradores;</p>

<p>Metilendioxi-3-O-β-D-glucos flavonol</p> 		(1981)
<p>Patuletina</p> 		(Ferreira y Dias, 2004)
<p>Quercetina</p> 	<p><i>G. clausenii</i>^a</p>	
<p>Kaempferol</p> 		

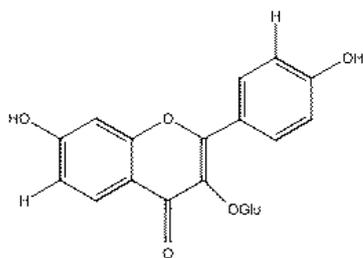
Isoramnetina



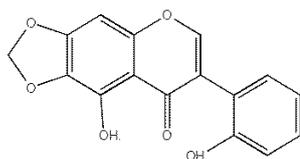
Patuletina-3-O- β -D-glucopiranosido



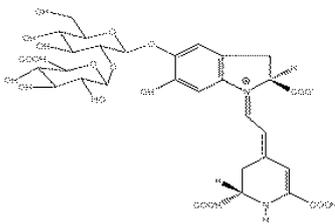
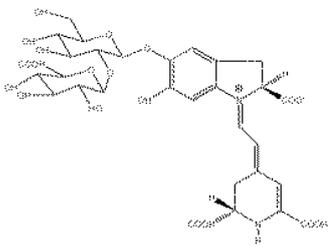
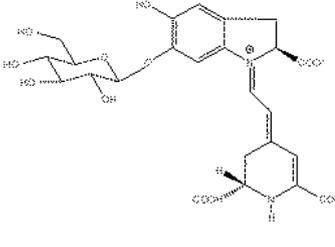
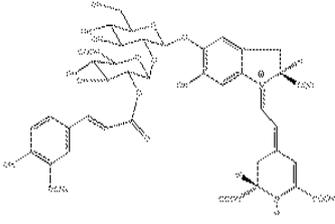
Kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosido

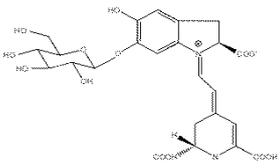
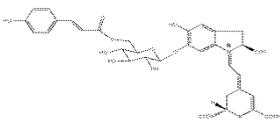
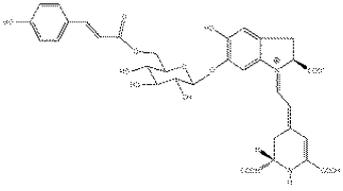
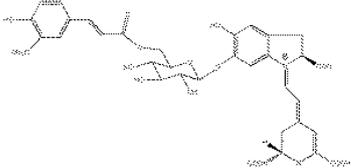
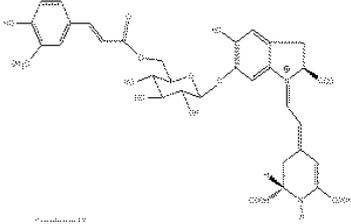


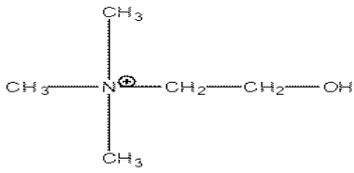
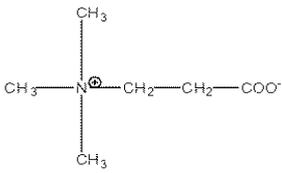
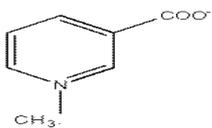
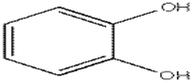
Irisona B

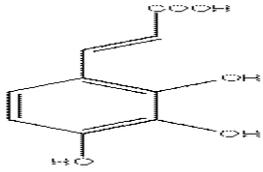


(Ferreira y Dias,
2004)

Betacianinas	Amarantina		<i>G. globosa</i> ^{c, i}	Piattelli y Minale L, (1964) Cai y colaboradores; (2001)
	Isoamarantina		<i>G. globosa</i> ^{c, i}	Piattelli y Minale L, (1964)
	Celosianina			
	Gomphrenina I		<i>G. globosa</i> ⁱ	Piattelli y Minale L, (1964) Cai y colaboradores; (2001) Minale y colaboradores; (1967) Heuer y colaboradores; (1992)

	<p>Gomphrenina II</p> 		
	<p>Gomphrenina III</p> 		
	<p>Gomphrenina IV</p> 		<p>Piattelli y Minale, (1964) Cai y colaboradores; (2001) Minale y colaboradores; (1967) Heuer y colaboradores; (1992)</p>
	<p>Gomphrenina V</p> 		
	<p>Gomphrenina VI</p> 		

<p>Protoalcaloides</p>	<p>Colina</p> 	<p><i>G. martiana</i>^a <i>G. boliviana</i>^a <i>G. haenkeana</i>^a <i>G. meyeniana</i>^a <i>G. perennis</i>^a</p>	<p>Buschi y Pomilio, (1983) Buschi y Pomilio, (1982a) Buschi y Pomilio, (1982)</p>
<p>Betaina</p>	<p>Glicina-betaina</p> 	<p><i>G. decumbens</i>^b</p>	<p>Blunden y colaboradores; (1999)</p>
	<p>Trigonelina</p> 		
<p>Bencenoide</p>	<p>Catecol</p> 	<p><i>G. holosericea</i>ⁱ</p>	<p>Sant'Ana y colaboradores; (1977)</p>

Fenil- propanoide	<p style="text-align: center;">Ácido cafeico</p> 		
------------------------------	--	--	--

Parte usada: ^a Planta entera, ^b Parte aérea, ^c Hojas, ^d Raíces, ^e Tallo, ^f Flores, ^g Semillas.

(Tomada y adaptada de Salvador y colaboradores, 2012)

1.1.3. *Gomphrena perennis* L. var. *perennis*

1.1.3.1. Características generales y distribución geográfica:

Gomphrena perennis (*G. perennis*) es una hierba perenne de la familia de las Amarantáceas, denominada vulgarmente "moco-yuyo" (Alonso y col., 2009), "siempre viva del campo", "flor de papel", "yerba del pollo" (Zubizarreta y Díaz Panizza, 2014). Se distribuye en Sudamérica, fundamentalmente en el Chaco de Argentina y Paraguay, Paraguay oriental, Brasil austral, Uruguay. En la República Argentina su radio de distribución abarca desde el norte hasta la región pampeana, extendiéndose por las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Misiones, Salta, Santiago del Estero y Tucumán. (Zuloaga y col., 2008)

G. perennis se presenta finalizando el invierno con hojas senescentes y con escasas a nulas hojas vivas, pero éstas se desarrollan abundantemente a principios de primavera, estación en que inicia la floración. La formación de inflorescencia es continua por lo que durante el verano y el otoño sus ejemplares presentan hojas, flores y frutos, mientras que a mediados de invierno las estructuras reproductivas y vegetativas se secan. (Alonso y col., 2009)

Alonso, y col., (2009) presentan a *G. perennis* como una potencial especie ornamental, señalando el atractivo del color blanco grisáceo de sus estructuras vegetativas, interrumpidas por las pequeñas inflorescencias blanco cremosas, persistentes, similares a las de *G. globosa*, especie de uso ornamental en jardines. En base a las observaciones realizadas en la sierra La Barrosa (Balcarce), *G. perennis* también podría cultivarse en jardines de rocallas o en canteros bajos, en los que destacaría por el color blanquecino de las estructuras vegetativas y reproductivas, además de su eventual uso para la formación de ramos secos.

En un mapa construido basado en una encuesta de percepción se observa que *G. perennis* constituye un problema creciente en el centro de Córdoba, el centro-noreste de Santa Fe y el sureste de Santiago del Estero (Bayer CropScience, 2013); manifestándose como una maleza con metabolismo C4 y presencia de un sistema radicular tuberoso y una estructura llamada xilopodio con capacidad de rebrote (Carbone, 2015); de secundaria abundancia en cultivos perennes, montes frutales y frecuente en rastrojos, al borde de caminos y otros terrenos modificados, prefiriendo suelos no muy húmedos (Marzocca y col., 1976). Las plantas de *G. perennis* no controladas durante el cultivo de verano dificultan las tareas de cosecha (Nisensohn y col., 2007). Las poblaciones de *G. perennis* manifestaron diferencias en la tolerancia al glifosato dependiendo fundamentalmente del momento en el cual fue aplicado el herbicida. (Carbone, 2015).

1.1.3.2. Antecedentes botánicos:

G. perennis es una hierba perenne, erguida o más o menos enderezada, llega a alcanzar los 50 cm o más de altura. (Zuloaga, 2012) Presenta un sistema radicular profundo formado por numerosas raíces tuberosas (Fig. 10), el cual se encuentra unido en su parte superior a la estructura conocida con el nombre de xilopodio (XL). Dicha estructura subterránea protege yemas capaces de rebrotar dando ramificaciones aéreas luego de transitar por condiciones adversas. Presenta abundantes cristales de oxalato de calcio en forma de drusas cuyo número aumenta al incrementarse el grosor de la raíz. (Playuk, 2016)

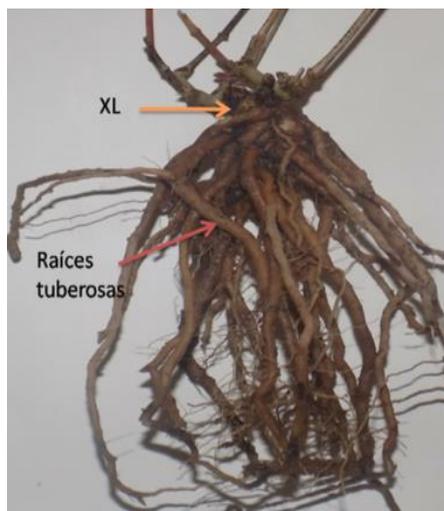


Figura 10. Xilopodio (XL) y raíces tuberosas *G. perennis* (Playuk, 2016)

Sus **tallos** son aéreos de crecimiento indefinido, consistencia herbácea y nudos bien marcados, alcanza alturas de hasta 1,5m; presentan una epidermis con células redondeadas y pared periclinal externa con depósito de gruesa cutícula y numerosos tricomas (Fig. 11), simple uniseriados-pluricelulares y no glandulares, las uniones entre las células que conforman el pelo son de tipo nodosas. (Playuk, 2016) Las **hojas** son simples, con filotaxis opuesta y sin presencia de anexos foliares, con un patrón de venación reticulado; presenta estomas de tipo anomocítico en ambas epidermis (anfiestomáticas) (Carbone, 2015),

pecíolo no diferenciado claramente, lámina generalmente elíptica, aguda, con indumento bastante denso de pelos adpresos. (Zuloaga, 2012) Los tricomas presentan las mismas características con los encontrados en tallo. Posee estructura Kranz (C4) de tipo atriplicoide. (Carbone, 2015). Entre los haces vasculares se observan células incoloras de gran tamaño, que contienen cristales de oxalato de calcio en forma estrellada (drusas) (Playuk, 2016). Las **inflorescencias** son pseudoespigas densas, sostenidas por brácteas herbáceas ovadas más cortas, agrupadas a su vez en una inflorescencia espiciforme generalmente ramificada, terminada en un fascículo con involucreo de brácteas herbáceas ovado-orbiculares u ovadas, brevísimamente acuminadas hasta agudas. Las **flores** presentan tépalos escariosos, amarillento rojizos, raramente blancos o rojos, claramente más largos que las bractéolas, oblongos o alargado-ovados, agudos o casi agudos, generalmente enteros. Estambres a la madurez por lo general más largos que el perigonio, filamentos soldados en los 3/4-4/5 inferiores, lóbulo anterífero subnulo, laterales oblongos, agudos, enteros o casi, alcanzando el ápice de las anteras o más cortos. Ovario ca. 0.7 mm de longitud, con estilo de ca. 0.2 mm y estigma 2-partido de ± 1.5 mm con ramas erguidas, filiformes (Zuloaga, 2012).

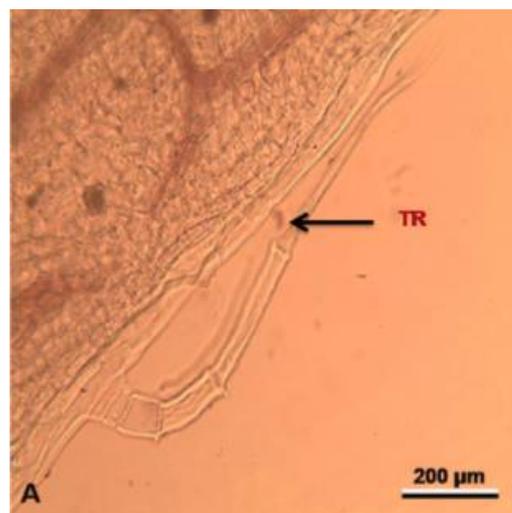


Figura 11. Tricomas del tallo *G. perennis* (Playuk, 2016)

1.1.3.3. Antecedentes de uso medicinal no comprobados científicamente:

El valor medicinal de *G. perennis* fue señalado etnobotánicamente por:

- Arenas, (1987) como hemostático; las raíces trituradas se ponen en agua por la tarde y se dejan en maceración hasta la mañana siguiente; el jugo resultante es bebido para la prevención de hemorragias menstruales.
- Orfila y D'Alfonso, (1999) como estomacal, emoliente, diurética, depurativa.
- Goleniowski y col. (2006) quienes reportaron el uso de las flores como antidiarréico, febrífugo y contra dolores reumático.
- Basualdo y col. (2004) para afecciones del corazón y como tranquilizante. (Parte aérea y flor)

1.1.3.4. Antecedentes de estudios farmacológicos comprobados científicamente:

La falta de estudios científicos que avalen los usos medicinales y etnobotánicos mencionados en el apartado anterior, han sido el principal disparador para la realización de esta tesis de maestría.

Dentro de los escasos antecedentes farmacológicos comprobados científicamente para *G. perennis* se destacan los siguientes:

- Pomilio y col. (1991) reportaron propiedades anticancerígenas y actividad citotóxica para *G. perennis*; además ha sido demostrada su actividad antimicrobiana (Tomesi y col., 1986)
- Matsunaga y col. (2000) demostraron el efecto inhibitorio moderado del extracto metanólico y su fracción butanólica de *G. perennis* sobre la actividad de la 5-lipoxigenasa.

1.1.3.5. Antecedentes fitoquímicos:

Los antecedentes fitoquímicos de *G. perennis* encontrados en bibliografía también son escasos, de allí que uno de los objetivos de esta tesis sea el estudio fitoquímico de los extractos de esta planta que pueda explicar o justificar en parte su uso tradicional.

En este aspecto, en bibliografía se ha encontrado un estudio comparativo realizado con diferentes especies de *Gomphrena* donde se reportó la presencia de 20-hidroxiecdisona, los protoalcaloides betaína y colina en *G. perennis*, (Tabla 1) (Buschi y Pomilio, 1983).

1.2. Bases teóricas para el estudio de las propiedades farmacológicas de la tintura de *Gomphrena perennis* L (GphT):

1.2.1. Bases teóricas para el estudio de las propiedades antiespasmódicas intestinales

1.2.1.1. Características generales y contráctiles del músculo liso

El músculo liso es considerado un músculo no estriado, debido a que sus miofibrillas forman agrupamientos irregulares en lugar de la regularidad que presentan en músculos como el cardíaco o el esquelético (músculos estriados).

El músculo liso se encuentra constituyendo los órganos internos y vísceras siendo su función principal determinar el movimiento del material que contienen. Los movimientos de las fibras del músculo liso están determinadas por la contracción y relajación del mismo, el cual a su vez es regulado por el sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático).

Las contracciones en el músculo liso son mucho más lentas que en el músculo esquelético o músculo cardíaco debido a que la actividad de miosina ATPasa de este tipo de músculo tiene una tasa de hidrólisis de ATP mucho más lenta (10 a 100 veces más baja que la del músculo esquelético) (Goodman y Gilman, 2014)

Su contracción es disparada por el ión calcio (Ca^{2+}). Dado que el músculo liso tiene escaso o nulo reservorio de Ca^{2+} en depósitos intracelulares, la fuente principal de calcio para la contracción es la contribución desde el medio extracelular. Desde allí ingresa a la célula a través de los canales de tipo L voltaje-dependientes o canales sensibles a las dihidropiridinas (DHP).

El inicio de la contracción en el músculo liso, dado por el influjo de Ca^{2+} puede ser iniciado tanto por un potencial de acción (músculos lisos con actividad eléctrica de membrana), o por la unión de un neurotransmisor o fármaco agonista a un receptor acoplado a una proteína Gq (en todos los tipos de músculos lisos).

Cuando se activa un receptor dado acoplado a una proteína Gq se activa una cascada de segundos mensajeros intracelulares que llevan a un aumento en las concentraciones de intracelulares Calcio $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Inicialmente la activación de Gq, cataliza la hidrólisis de GTP y la activación de la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima (PLC) cataliza la escisión de los fosfatidilinosoles de membrana (PIP_2) en inositoltrifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Por un lado, IP_3 estimula la apertura de canales de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (aporte minoritario en el músculo liso), mientras que DAG activa a una proteína-quinasa C (PKC) encargada de aumentar la posibilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L por fosforilación de los mismos, lo que permite el influjo de Ca^{2+} a través de dichos canales (Rang y col., 2008; Goodman y Gilman, 2014).

Cuando el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ llega a concentraciones de $10\ \mu M$, el Ca^{2+} se une a la calmodulina formándose el complejo Ca-calmodulina. Este complejo estimula la actividad enzimática de la quinasa de la cadena liviana de la miosina (KCLM) la cual fosforila a dicha cadena (CLM), reacción que promueve la interacción entre la miosina y la actina. El acoplamiento actinomiosínico está acoplado a una reacción exotérmica de hidrólisis del ATP, que libera la energía necesaria para el proceso contráctil.

Cuando se activan los mecanismos de remoción de Ca^{2+} y la actividad de estos supera a los mecanismos de influjo de Ca^{2+} , la concentración citosólica de este ion vuelve a su valor de reposo ($0.1\ \mu M$). En este punto, el complejo Ca-calmodulina-KCLM se disocia, y comienza a predominar la acción de una fosfatasa. Esta enzima desfosforila la cadena liviana de miosina (CLM), produciéndose así la relajación (Rang y col., 2008).

1.2.1.2. Características del músculo liso intestinal:

El intestino posee una capa muscular circular interna y otra capa de fibras longitudinales presentes en la superficie externa del intestino. En el músculo liso gastrointestinal se encuentran presentes una variedad de subtipos de receptores muscarínicos (mayoritariamente M1, M2 y M3). La activación de estos receptores por agonistas como acetilcolina o carbacol o el bloqueo de los mismos por antagonistas como atropina permiten el estudio de los efectos espasmódicos o antiespasmódicos respectivamente de este tipo de músculo liso (Emendorfer y col., 2005; Goodman y Gilman, 2014). Es por ello que el duodeno e íleon de rata fue el modelo *ex vivo* elegido en esta tesis para el estudio de los efectos antiespasmódicos de la tintura de *G. perennis* (GphT).

El sistema nervioso entérico en interacción especializada con varios elementos determina la motilidad gastrointestinal. Este sistema se origina en las células de la cresta neural y da lugar a dos plexos nerviosos: el plexo submucoso de Meissner y el plexo mientérico de Auerbach. Dentro de éstos plexos, se encuentra una red organizada de neuronas que en conjunto con las células intersticiales de Cajal, generan los patrones motores que rigen la motilidad gastrointestinal. Por su parte, el sistema nervioso entérico tiene una estrecha conexión con el sistema nervioso central lo cual crea respuestas de tipo aferente y eferente e intercambia información entre ambos sistemas (Romero-Trujillo y col., 2012).

Los neurotransmisores más comunes secretados por las neuronas del sistema nervioso entérico son principalmente acetilcolina y noradrenalina, otras que pueden destacar son la serotonina, la dopamina, colecistocinina, sustancia P, polipéptido intestinal vasoactivo, somatostatina, leu-encefalina, metencefalina y bombesina. La acetilcolina estimula la actividad gastrointestinal, mientras que la noradrenalina inhibe la liberación de acetilcolina mediante su acción en los receptores alfa-2 (α_2) ubicados presinápticamente en las terminales colinérgicas (Romero-Trujillo y col., 2012; De Carvalho y col., 2014).

La actividad eléctrica del músculo liso gastrointestinal se divide en dos tipos básicos de ondas eléctricas: ondas lentas y espigas. Las ondas lentas están constituidas por cambios lentos y ondulantes del potencial de membrana en reposo y son atribuidas a la interacción entre las células musculares lisas con las células intersticiales de Cajal. Por su parte, las espigas se generan cuando el potencial de reposo del músculo gastrointestinal llega a -40 mV (de su valor de -50 o -60 mV), lo que promueve la entrada de Ca^{2+} por canales de Ca^{2+} tipo L que desencadenan el tono basal y contracciones pendulares. El movimiento pendular es el único que perdura en el intestino una vez aislado.

1.2.2 Bases para el estudio de los efectos en la presión arterial de ratas normotensas

1.2.2.1. Características contráctiles del músculo liso vascular y su relación con la presión arterial

Las células de músculo liso conforman las paredes de numerosos órganos, vísceras y estructuras en el organismo lo que incluye a los vasos sanguíneos. Es sabido que la contracción del músculo liso vascular determina el diámetro de la vasculatura en general y esto determina el flujo sanguíneo a cada tejido. Las células del músculo liso vascular pueden presentar contracciones tónicas y fásicas en respuesta a diferentes estímulos mediadas en todos los casos por la interacción actina-miosina para desarrollar la fuerza, siendo el Ca^{+2} el ion responsable del inicio de la respuesta contráctil (Morgan, 1990). La contracción en el músculo liso vascular posee iguales características que las descritas con anterioridad (ver sección 1.2.1.1). La concentración de Ca^{2+} citosólica es la que determina el grado de contracción. En los vasos, es tan importante el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular como su liberación desde el retículo sarcoplásmico. Sin embargo la importancia relativa del aporte de cada una de estas fuentes de Ca^{+2} varía entre los distintos lechos vasculares (Mitchell y col., 2003)

El aumento en el tono vascular deriva en una aumento en la resistencia periférica total lo cual está asociado a varias patologías entre ellas la hipertensión arterial.

1.2.2.2. Características de las medidas de la presión arterial en animales de laboratorio

La presión arterial es definida como la fuerza ejercida por la sangre contra cualquier área de la pared arterial, siendo controlada tanto por el gasto cardíaco (GC) como por la resistencia periférica total (RPT). Sin embargo, tanto GC como la RPT dependen a su vez de otros factores fisiológicos tales como: la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción del corazón en el caso del GC y de la actividad contráctil y del eje renina angiotensina en el caso de la RPT. Por lo tanto, el control de la presión arterial está dado por la acción de sistemas de mecanismos de regulación que guardan una compleja relación entre sí (Goodman y Gilman, 2014).

Existen varios métodos para la medida de la presión arterial en animales de laboratorio. Entre ellos podemos distinguir los siguientes: a) pletismografía del manguito de la cola, b) los catéteres intra-arterial, y c) la telemetría de radio. Mientras que el primero es un método no invasivo, los métodos invasivos (b y c) arrojan resultados más precisos dado que los valores son tomados directamente en cualquier arteria (arteria radial, femoral, braquial) (Kramer y Remie, 2005) Además, la técnica invasiva es por lo general bien adecuada para la reactividad vascular a diversos agonistas y antagonistas (Van Vliet y col., 2000)

En esta tesis se utilizó el método de canulación de la arteria carótida para medir los efectos de la tintura de *G. perennis* (GphT) en ratas normotensas.

1.2.3. Bases teóricas para el estudio de la actividad cardioprotectora frente a la isquemia reperusión

1.2.3.1. Características contráctiles del músculo cardíaco y efectos de la injuria por isquemia reperusión:

El músculo cardíaco es un músculo absolutamente dependiente de la presencia extracelular de Ca^{2+} para efectuar la contracción. La misma se inicia con la unión de Ca^{2+} a troponina C (Leavis y Kraft, 1978; Zot y Potter, 1987). Durante la contracción, el músculo cardíaco está sometido a cambios rápidos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ menores a $0.1 \mu\text{M}$ en el estado de reposo, hasta concentraciones de $25\text{-}50 \mu\text{M}$ durante la contracción (Fabiato, 1981). Por otro lado, cuando el miocardio retorna sus niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de reposo el corazón comienza a relajarse. Los transportadores que más participan en la relajación cardíaca son el intercambiador $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ y la SERCA, que compiten por la remoción de Ca^{2+} del citosol, determinando en parte la cantidad de Ca^{2+} almacenada en el RS (Bers, 2001).

El influjo de Ca^{2+} a través del sarcolema se efectúa por canales de Ca^{2+} tipo L (o lentos) y los T (o transitorios de rápida inactivación). Ambos tipo de canales son activados por despolarización de la membrana mientras que pueden inactivarse tanto de modo tiempo como voltaje-dependiente. (Shuba y Mc Donald, 1995). La activación de los canales de Ca^{2+} tipo L durante el potencial de acción cardíaco permite la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS) al citosol (Fabiato, 1983; Bers, 2001).

Dado que el tejido cardíaco posee una estricta dependencia del metabolismo aeróbico y requiere altas cantidades de ATP para lograr la contracción y relajación en cada latido, la primer consecuencia de la isquemia (por disminución o suspensión de flujo

sanguíneo hacia el corazón) es la inhibición de la cadena respiratoria lo cual impacta sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial y por ende en la conservación de la energía y en la función contráctil del corazón (Halestrap y col., 2007; Di Lisa y col., 2007; Baines, 2009). En forma simplificada, la isquemia posee cuatro atributos: 1) la producción de acidosis, 2) hipoxia o falla en el suministro de oxígeno, 3) alteración en los niveles de los fosfatos de alta energía y 4) elevación de las concentración de potasio extracelular (Bers, 2001).

Por otra parte, la reperfusión o restauración del flujo si bien le permite al miocardio restaurar el metabolismo aeróbico y salvar a los miocitos del daño producido por la isquemia puede iniciar o agravar alteraciones en el músculo cardíaco dando lugar al daño conocido como injuria por reperfusión (Kloner y Jennings, 2001). Si bien el corazón puede tolerar pequeños períodos de isquemia, la persistencia del período isquémico predispone al miocardio a un déficit severo de ATP que resulta en una injuria irreversible ocasionando la muerte de los cardiomiocitos (Halestrap y col., 2004; Ferdinandy y col., 2007).

1.2.3.2. Evaluación experimental de extractos de plantas sobre músculo cardíaco

En esta tesis, se abordó el estudio de los efectos de la tintura de *G. perennis* (GphT) sobre las funciones cardíacas a través del preparado de corazón aislado y perfundido mediante la técnica de Langendorff. (Ver materiales y métodos, sección 3.7.3.2.) Esta técnica es muy útil como modelo de contractilidad del corazón entero, porque registra la presión intraventricular durante todo el proceso experimental y se nutre por la vía fisiológica arterial. En nuestro laboratorio, contamos con un calorímetro artesanal en el cual introducimos el corazón perfundido y por lo tanto registramos simultáneamente la presión intraventricular desarrollada por los corazones y el flujo de calor total durante todo

el experimento. (Ponce-Hornos y col., 1982; Consolini y col., 2007). En este modelo es posible estudiar la isquemia reperfusión dado que el sistema utilizado permite interrumpir la perfusión coronaria sin afectar la medición de los parámetros mencionados.

Las consecuencias mecánico-energéticas de la isquemia y reperfusión (I/R) son: un aumento de la presión diastólica (contractura) con una caída en el flujo de calor asociada a la disminución brusca del metabolismo aeróbico durante la isquemia y una reducción de la recuperación de la contractilidad con contractura diastólica asociado a un aumento en el flujo de calor por la reactivación de los mecanismos que remueven activamente el Ca^{2+} acumulado en citosol (SERCA, NCX, UCam, Ca-ATPasa sarcolemal) durante la reperfusión. El calor proviene de la hidrólisis exotérmica del ATP consumido para mantener esos transportes y el ATP hidrolizado por el sistema actomiosínico durante la contractura diastólica y la recuperación contráctil. Con el transcurso de R, la presión diastólica se reduce y la contractilidad aumenta en diversos grados según el tiempo de la isquemia. Si la isquemia es relativamente breve, la R da lugar a un “*corazón atontado*” con reducida economía contráctil (relación entre la contractilidad y el flujo de calor que estima la energía consumida). Si la isquemia es muy prolongada, se disparan procesos apoptóticos y la consecuente muerte del tejido miocárdico (*infarto*). Los modelos de isquemia reperfusión moderada utilizados en esta tesis son modelos experimentales sin infarto.

1.2.4. Bases teóricas para el estudio de la actividad central

La relevancia en la búsqueda de nuevas sustancias con actividad sobre el sistema nervioso central radica en que los fármacos de síntesis, que actualmente se prescriben, poseen gran cantidad de efectos adversos entre los cuales se destaca la dependencia que causa su uso. Por esta razón, la búsqueda de nuevos principios activos derivados de

especies vegetales, que no generen este tipo de efectos colaterales está altamente fundamentada.

1.2.4.1. Modelos experimentales utilizados para el estudio de la actividad sedante y ansiolítica

Los modelos experimentales de animales utilizados para el estudio del comportamiento relacionado con la ansiedad están basados en la suposición de que la ansiedad en animales es comparable con la ansiedad en el hombre. Si bien la ansiedad es una respuesta deseable que sirve para la adaptación a un entorno desconocido, especialmente cuando se está enfrentado con el peligro o la amenaza, las variantes patológicas de la misma pueden impedir la vida diaria de las personas que la padecen. Los modelos animales son instrumentos indispensables para dilucidar y entender los mecanismos neurobiológicos que son la base de la ansiedad normal así como de sus variaciones de patológicas (Ohl, 2005).

Los modelos experimentales a utilizar para el estudio de la actividad central de cualquier sustancia deben reunir tres condiciones para que el resultado arrojado por el mismo sea de utilidad y con validez científica. A saber: validez de constructo, validez de apariencia y validez predictiva. De esta manera se logra que el modelo: recree experimentalmente las condiciones que dan lugar a la enfermedad en el hombre, tenga fidelidad en la reproducción de los aspectos generales de la patogenia en el humano y que la respuesta a los tratamientos prediga los efectos de dichos tratamientos en la clínica.

Dentro de los modelos utilizados para evaluar propiedades ansiolíticas existen esencialmente dos tipos: aquellos que tienen fundamento etológico, es decir, que no

requieren condicionamiento previo y aquellos que requieren manipulaciones específicas para generar la respuesta de ansiedad (Campos y col., 2013)

El modelo para el estudio de la actividad ansiolítica de *G. perennis* utilizado en esta tesis fue el **laberinto en cruz elevado** (método etológico). El aparato utilizado consiste en dos ramas colocadas en cruz, dos de ellas tienen paredes y las otras dos no. El balance entre curiosidad y temor se da por la tendencia exploratoria natural de los roedores y, al mismo tiempo, su temor a transitar por espacios sin reparo físico. La conducta natural muestra una preferencia por los brazos cerrados o con paredes mientras que el tratamiento con drogas ansiolíticas hace que dicha preferencia disminuya (Wikinski, 2016) Este test es rápido, económico, simple y posee la facultad de identificar efectos ansiolíticos de algunos fármacos como benzodiazepinas al mismo tiempo que es bidireccionalmente sensible a las manipulaciones de la ansiedad (ansiógénesis y ansiólisis). Además el test como se describió anteriormente está basado en la conducta espontánea del animal con lo cual se evita la necesidad de entrenamiento. Su principal desventaja es la menor sensibilidad para evaluar agentes ansiolíticos con mecanismos de acción diferentes a la modulación alostérica GABA_A (Cardenas y Navarro, 2002).

Otro test utilizado en esta tesis para evaluar los efectos centrales de la tintura de *G. perennis* (GphT) fue el **test de campo abierto** (*Open field*). En este test, el animal es colocado libremente en una caja con piso cuadriculado y dimensiones estandarizadas, es uno de los test más antiguos empleados en psicofarmacología. Mediante el uso del mismo se evalúa los efectos de fármacos o extractos de plantas en las medidas conductuales de exploración (locomoción, olfateo y enderezamientos) y miedo o emocionalidad (acicalamiento, defecación, micción). Si bien el test de campo abierto es uno de los test más sencillos utilizados para evaluar los efectos centrales de diferentes sustancias, presenta

la principal desventaja de que es un test muy sensible ante las variaciones de determinados factores potencialmente estresantes (Cardenas y Navarro, 2002).

1.2.5. Bases teóricas para el estudio de la actividad antioxidante

1.2.5.1. Oxidación, especies reactivas y radicales libres.

La oxidación de diferentes compuestos es un proceso esencial de los organismos aeróbicos desde que el oxígeno se constituyó en el último aceptor de electrones en el sistema que produce energía en forma de ATP. (Schinella, 2014) Todas las células aeróbicas son capaces de sintetizar especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO); siendo la cadena respiratoria mitocondrial, la principal fuente de producción de estos. (Finkel y Holbrook, 2000)

Las ERO y ERN (“especies reactivas del nitrógeno”, donde el nitrógeno participa en su formación) incluyen compuestos que son radicales libres y no radicales; se caracterizan por una alta reactividad química, una vida media muy corta y su capacidad de producir efectos deletéreos en el organismo (Gutteridge y Halliwell, 2010; Azzi y col. 2004)

Las ERO y ERN (Tabla 2) intervienen en procesos biológicos vitales a través de la regulación de procesos celulares, tales como proliferación, metabolismo y diferenciación. (Finkel y Holbrook, 2000; Valko y col., 2007; Finkel, 2011; Ray y col., 2012).

Tabla 2. Principales ERO y ERN (radicales y no radicales) de interés biológico.

	Radicales libres		Especies no radicales	
Especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO)	Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
	Hidroxilo	HO^{\bullet}	Hidroperóxidos	ROOH
	Alcoxi	RO^{\bullet}	Hipoclorito	ClO^-
	Peroxi	ROO^{\bullet}	Oxígeno singlete	1O_2
	Lípido radical	R^{\bullet}	Ozono	O_3
	Radical carbonato	$CO_3^{\bullet-}$		
Especies reactivas del nitrógeno (ERN)	Óxido nítrico	NO^{\bullet}	Peroxinitrito	$ONOO^-$
	Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\bullet}	Aducto peroxinitrito / CO_2	$ONOOCO_2^-$

(Tomada de Rios-Cañavate y Schinella, 2014)

En condiciones fisiológicas, el equilibrio entre la generación y la eliminación de las especies reactivas es necesario para mantener la función adecuada de las proteínas involucradas en la señalización sensible a procesos redox. (Trachootham y col., 2008). Para ello, el organismo posee un sistema de defensa antioxidante para eliminar las ERO/ERN y mantener la homeostasis redox. Este sistema incluye componentes enzimáticos y no enzimáticos. Entre los primeros componentes se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), que convierte el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 ; el cual es reducido a H_2O por la catalasa o descompuesto por peroxidasas dependientes del glutatión. En el segundo grupo de componentes se incluyen la vitamina E, carotenos, ácido ascórbico, glutatión, peptidohistidina, transferrina, ferritina, uratos y tioles de proteínas plasmáticas. Estos dos

últimos revisten mayor importancia por su capacidad captadora de radicales libres en el plasma sanguíneo (Valko y col., 2007).

El aumento significativo de ERO/ERN producido por desequilibrios entre sus procesos de formación y el sistema de defensa antioxidante genera estrés oxidativo; lo que produce la pérdida de la integridad celular, la función enzimática y la estabilidad genómica. Este daño oxidativo parecería estar involucrado en el envejecimiento y en varias enfermedades degenerativas relacionadas con él, como las enfermedades cardiovasculares, cataratas, disfunciones cognitivas y cáncer (Finkel y Holbrook, 2000; Valko y col., 2007).

La suplementación de la dieta con compuestos antioxidantes se propone como una alternativa para combatir o evitar el estrés oxidativo y mejorar la eficacia del sistema de defensa antioxidante (Aruoma, 1994).

1.2.5.2. Sustancias Antioxidantes

Las sustancias antioxidantes se pueden definir de diversas maneras:

- Químicamente una sustancia antioxidante “es cualquier sustancia cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con la de un sustrato oxidable retrasa significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato” (Halliwell y Gutteridge, 1995)
- Farmacológicamente las sustancias antioxidantes son definidas como “cualquier sustancia que retrase, prevenga o elimine el daño oxidativo en una molécula diana” (Gutteridge y Halliwell, 2010)
- Basado en su mecanismo de acción las sustancias antioxidantes pueden ser definidas como: "cualquier sustancia que neutraliza directamente o indirectamente las ERO, aumentando la actividad de las defensas antioxidantes o inhibiendo la producción de ERO" (Khlebnikov y col., 2007)

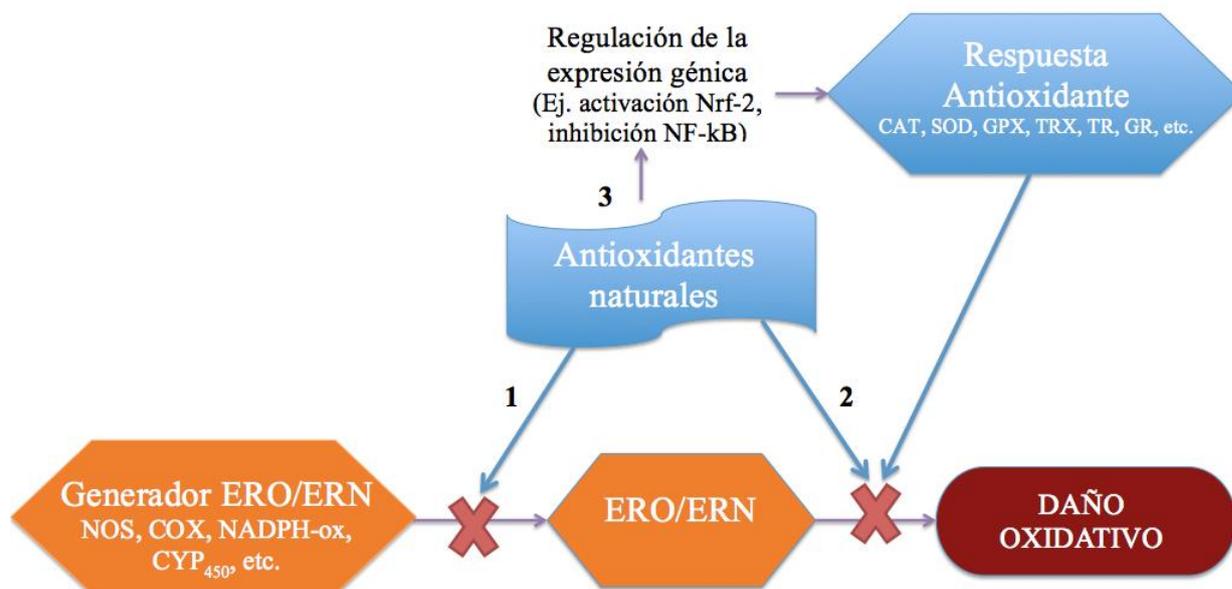


Figura 12. Mecanismos de acción de antioxidantes: Suprimiendo la formación de ERO/ERN (1), atrapando las ERO/ERN (2), aumentando o protegiendo el sistema de defensa antioxidante (3). (Adaptado de López-Alarcón y Denicola, 2013)

Las sustancias antioxidantes tienen la capacidad de formar un nuevo radical que sea estable posterior a su oxidación, después de atrapar el radical libre (Halliwell, 1990) y su actividad antioxidante se puede dar a través de diversos mecanismos (Carocho y Ferreira, 2013; López-Alarcón y Denicola, 2013):

- 1) Suprimiendo la formación de ERO/ERN, por inhibición de los sistemas enzimáticos que las generan o quelando los elementos metálicos que producen radicales libres.
- 2) Atrapando las ERO/ERN.
- 3) Aumentando o protegiendo el sistema de defensa antioxidante: regulando la expresión génica de factores de transcripción implicados en el proceso o por medio de la respuesta antioxidante de enzimas inducidas.

Diferentes estudios han demostrado la actividad antioxidante *in vitro* de una gran variedad de productos naturales y las propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos de origen vegetal (Prior y col., 2005; Rice-Evans y col., 1997; Pietta, 2000; Cos y col.,

2000; Pannala y col., 2001; Brewer, 2011). Los compuestos fenólicos simples (Flavonoides, cumarinas, lignanos, fenilpropanoides) o los polifenoles de estructura más compleja (proantocianidinas y taninos catéquicos), se encuentran en las plantas generalmente en altas concentraciones y son conocidos por su capacidad antioxidante, lo que ha llevado a que adquieran un potencial interés farmacológico en patologías asociadas con la generación de ERO, en las cuales pueden evitar el daño oxidativo por diferentes mecanismos, como los anteriormente mencionados (Rios-Cañavate y Schinella, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

- a) Validar los usos en medicina popular de *Gomphrena perennis* L. como antiespasmódico intestinal, hipotensor y diurético mediante el estudio farmacológico en diferentes modelos experimentales.
- b) Evaluar si la tintura de *Gomphrena perennis* L. posee actividad cardioprotectora y efecto a nivel del sistema nervioso central, ya sean como posibles indicaciones o como efectos adversos.
- c) Determinar si los extractos de *Gomphrena perennis* L. poseen actividad antioxidante que permita validar o desaconsejar su uso tradicional.
- d) Efectuar el estudio fitoquímico de los extractos *Gomphrena perennis* L. que permitan justificar en parte su uso tradicional.

2.2. Objetivos particulares

- a) Evaluar la actividad gastrointestinal de la tintura de *Gomphrena perennis* L (*G. perennis*) en duodeno e íleon aislados de rata mediante el uso de curvas concentración- respuesta y estudiar el mecanismo de acción farmacológico.
- b) Evaluar las propiedades cardiovasculares “in vivo” de la tintura de *G. perennis*, mediante la medición de la presión arterial de ratas normotensas.
- c) Evaluar las propiedades cardíacas de la tintura de *G. perennis* en corazón aislado de rata, a través de un estudio mecánico-energético y sus efectos en un modelo de atontamiento por isquemia de no flujo y reperfusión.
- d) Evaluar los efectos de la tintura de *G. perennis* en el comportamiento espontáneo de ratones, y en situación de conflicto.
- e) Evaluar los efectos diuréticos, natriuréticos y kaliuréticos de la extractos de *G. perennis* a través de la medición del volumen de excreción urinaria y la determinación de la concentración de iones sodio y potasio en orina de ratas.
- f) Determinar la capacidad antioxidante total de los extractos de *G. perennis* mediante la reacción con el radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenztiazolin-6-sulfonato) de amonio (ABTS•+) y el contenido de fenoles totales usando el método de Folin – Ciocalteu.
- g) Analizar mediante cromatografía en capa delgada (CCD) las sustancias antioxidantes presentes en los extractos metanólico y de diclorometano de *G. perennis* capaces de decolorar el radical estable 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH•)
- h) Realizar mediante cromatografía en capa delgada (CCD) un *screening* fitoquímico con el propósito de obtener información respecto de la presencia

y/o ausencia de diferentes metabolitos secundarios en los extractos de *G. perennis*, y las correspondientes reacciones de caracterización.

- i) Analizar la tintura y el extracto metanólico de *G. perennis* aplicando la técnica de Cromatografía líquida de alta resolución con detección de absorción ultravioleta (HPLC-UV) que permite la determinación del perfil cromatográfico (*finger print*)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

3.1.1. Recolección e identificación botánica del material vegetal

Las semillas de *G. perennis* procedentes de la Estación Experimental INTA Banderas, Provincia de Santiago del Estero, Argentina; fueron remitidas a la *Mg Sc. Lic. Alejandra Victoria Carbone*, integrante del INFIVE (Instituto de Fisiología Vegetal) de la *Universidad Nacional de La Plata (UNLP)* para su identificación. Parte de ese material fue sembrado en el INFIVE y las plantas obtenidas se mantienen con la finalidad de cosechar los órganos reproductivos. El material utilizado para la realización esta tesis proviene de la parte aérea de dichas plantas adultas, el cual se recolecto en la primavera (octubre) en las horas de la mañana.

Un ejemplar adulto completo, se herborizó y se depositó como material de referencia en el Herbario del Área de Botánica, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (LPAG) (Holmgren y col., 1990).

3.1.2. Acondicionamiento y almacenamiento del material vegetal

El material vegetal fresco fue secado a estufa a 40°C y posteriormente triturado a polvo grueso, el cual fue almacenado al abrigo de la luz y la humedad.



Figura 13. Material vegetal fresco de G. perennis

3.2. Extracción del material vegetal

3.2.1. Preparación del extracto hidro-alcohólico al 20% (GphT)

Se pesaron 16g de polvo de la parte aérea desecada de *G. perennis* y se agregaron 80 ml de etanol 70°, se dejó en maceración dinámica en un envase ámbar tapado por 48 horas en un lugar fresco, posteriormente se filtró.

3.2.2. Preparación del extracto acuoso (decocción)

Se pesaron 2g del polvo de la parte aérea desecada de *G. perennis* y se agregaron 20 ml de agua destilada; se mantuvo en ebullición por 15 minutos, se enfrió, filtro y se repuso el volumen original de 20ml de agua destilada.

3.2.3. Preparación del extracto metanólico al 20% (Extracto 1 GphMeOHt)

Se pesó 1g del polvo grueso de parte aérea desecada de *G. perennis* se le agregaron 5ml de metanol y se calentó en baño por 10 minutos y posteriormente se filtró. (Wagner y Bladt, 1996)

3.2.4. Preparación del extracto metanólico para la búsqueda de alcaloides (Extracto 2)

Al extracto metanólico (GphMeOHt) preparado como se describió en el numeral anterior se le adicionó 1 ml de solución de amoniaco al 10% para extraer los alcaloides libres. (Wagner y Bladt, 1996)

3.2.5. Preparación del extracto para el análisis de saponinas (Extracto 3)

Se preparó un extracto metanólico según el método descrito en el numeral 2.2; se evaporó hasta alrededor de 1 ml, se mezcló con 0,5 ml de agua; luego se extrajo con 3 ml

de n-butanol (saturado con agua). La fase butanólica se utilizó para investigación Cromatografía de capa delgada (CCD) (Wagner y Bladt, 1996)

3.2.6. Preparación del extracto para la investigación de glucósidos cardiotónicos (Extracto 4)

Se mezcló 1 g de *G. perennis* con 5 ml de metanol 50% y 10 ml de solución de acetato de plomo (II) al 10% y después se calentó durante 10 min en baño de agua. El filtrado se enfrió a temperatura ambiente y después se extrajo dos veces con cantidades de 10 ml de diclorometano (DCM). Los extractos de DCM combinados se evaporaron y el residuo se disolvió en DCM-metanol (1:1) (Wagner y Bladt, 1996)

3.2.7. Preparación del extracto de diclorometano al 20% (Extracto 5)

Se pesó 1g del polvo grueso de *G. perennis*, se mezcló con 10ml de Diclorometano (DCM). Se extrajo por calentamiento a reflujo por 15 min. El filtrado se evaporó a sequedad, y el residuo se disolvió en 0,5 ml de tolueno. (Wagner y Bladt, 1996)

3.2.8. Micro-destilación al vapor de aceites esenciales (Extracto 6)

En un balón de 50 ml conectado con un tubo de vidrio (en forma de U) se depositó 5g de polvo grueso de *G. perennis* y 50 ml de agua, se calentó a ebullición y se realizó una destilación a través del tubo en U lentamente hasta que aproximadamente 1 ml de la mezcla de agua y aceite esencial, se cuela en el tubo de ensayo. Con 1 ml de xileno, los compuestos lipófilos se disolvieron agitando en la fase superior; La solución liofílica se separó con una pipeta y se utilizó 20-100µl para la investigación de CCD. (Wagner y Bladt, 1996)

3.2.9. Extracción con solventes de polaridad creciente

5g del polvo grueso de parte aérea desecada de *G. perennis* fue extraído por calentamiento en baño de María a 37°C con diclorometano (DCM), durante 30 minutos con agitación frecuente. Este procedimiento se repitió dos veces más. Los extractos se filtraron por papel y se reunieron.

El marco de la extracción anterior se dejó secar a temperatura ambiente y se volvió a extraer con Acetato de etilo (AcEt) como segundo solvente de extracción, procediendo de igual manera que con el solvente anterior.

El marco de la extracción anterior se dejó secar a temperatura ambiente y se volvió a extraer con metanol (MeOH) como tercer solvente de extracción, procediendo de igual manera que con el solvente anterior.

Se usaron solventes Merck® grado analítico los cuales fueron evaporados a presión reducida en un evaporador rotatorio Heidolph. El rendimiento de los extractos de diclorometano (GphDCM), acetato de etilo (GphAcEt) y metanol (GphMeOH) fue calculado en porcentaje (gramos de extracto/100 gramos de material vegetal seco).

3.3. Análisis fitoquímico

3.3.1. Reacciones de caracterización de los diferentes grupos fitoquímicos presentes

Para caracterizar los diferentes grupos fitoquímicos se llevaran a cabo las siguientes reacciones (Domínguez, 1973).

3.3.1.1. Reacción con cloruro férrico (para ácidos hidroxámicos y fenoles)

Se colocó 0.5 ml del extracto acuoso en un tubo de ensayo, agregando dos gotas de solución acuosa de tricloruro férrico al 1%.

3.3.1.2. Detección de flavonoides

3.3.1.2.1. Reacción de Shinoda

Se colocó 1ml del extracto a investigar en un tubo de ensayo, se agregó unas granallas de Mg y 0.5 ml de HCl, cuando se enfrió se agregó 0.5 ml de alcohol amílico y 2ml de agua destilada, se agitó y se dejó en reposo.

3.3.1.2.2. Reacciones de caracterización en papel

Sobre un papel de filtro se marcaron con lápiz cinco círculos de 0,5cm de diámetro aproximadamente, en cada uno de ellos utilizando un capilar se sembró gotas de cada uno de los extractos hidroalcohólico (GphT), metanólico (GphMeOHt) y diclorometánico (GphDCM) de *G. perennis* se secó y se agregó sobre cada círculo gotas de los siguientes reactivos respectivamente:

Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 10%

Solución de Cloruro Férrico al 1% (FeCl_3)

Solución etanólica de Cloruro de Aluminio (AlCl_3)

Solución de Ácido Bórico (H_3BO_3)

Se secó y se observó al UV a 365nm. A uno de los círculos no se le agregó ningún reactivo, este se tomó como blanco o control negativo.

3.3.1.2.4. Reacción de Rosenheim (para Leucoantocianinas)

Se tomó 0,5ml del extracto hidroalcohólico de *G. perennis* y se agregó 0,2ml ácido clorhídrico concentrado (HCl_c), se llevó a baño por 10min y se enfrió. Se agregó 0,2ml alcohol amílico y 2ml de agua destilada, se agitó y se dejó reposar.

3.3.1.3. Reacción de caracterización de saponinas

3.3.1.3.1. Capacidad afrógena

Se tomó 2ml del extracto acuoso de *G. perennis* en un tubo de ensayo se agitó enérgicamente por 20 segundos y se dejó reposar por 30min. Posteriormente se agregó ácido clorhídrico para ver la conservación de la espuma.

3.3.1.3.2. Poder emulgente

Se tomó 2m del extracto acuoso de *G. perennis* y se agregó gota a gota y agitando enérgicamente 1ml de aceite vegetal.

3.3.1.3.3. Reacción de precipitación con Hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$

Se tomó 2ml del extracto acuoso de *G. perennis* y se agregó gotas de solución de Hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$

3.3.1.3.4. Reacción de precipitación con Subacetato de plomo $Pb(CH_3COO)_2 \cdot Pb(OH)_2$

Se tomó 2ml del extracto acuoso de *G. perennis* y se agregó gotas de solución de Subacetato de plomo $Pb(CH_3COO)_2 \cdot Pb(OH)_2$.

3.3.1.3.5. Reacción de Fehling indirecta

- ***Preparación de reactivo de Fehling***

Fehling A:

Se pesaron 3,5g de sulfato de cobre cristalizado, se aforó a 100mL con agua destilada.

Fehling B:

Se prepararon 100mL de hidróxido de sodio al 5% y se le agregaron 15 g de tartrato de sodio y potasio.

Reacción de Fehling indirecta

Se tomó 5ml del extracto acuoso de *G. perennis*, se agregó 2ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl_c), se llevó a ebullición por 3 min, se enfrió y se filtró. Al filtrado se le agregó Hidróxido de sodio (NaOH) hasta reacción alcalina al papel tornasol, se agregó igual volumen de reactivo de Fehling A y B en partes iguales y se llevó a ebullición.

3.3.1.4. Detección de esteroides/terpenos

El reactivo de Lieberman-Burchard se emplea para la observación de los distintos compuestos orgánicos, como triterpenos, los cuales dan una coloración rosa a púrpura y esteroides que presentan color azul-verdoso.

3.3.1.4.1. Preparación del reactivo de Lieberman-Burchard

Se tomó 2ml del GphDCM, se evaporó en un vidrio de reloj a sequedad y se retomaron con gotas de cloroformo anhidro, se agregaron 1,8ml de anhídrido acético y 0,2ml de ácido sulfúrico concentrado.

3.3.1.5. Reacciones para Antraquinonas

3.3.1.5.1. Reacción de Bornträger directa (Antraquinonas)

Se agregó 2ml de una solución de hidróxido de amonio concentrado a 3ml del GphDCM, se agitó suavemente y se observó la coloración en la fase acuosa.

3.3.1.5.1. Reacción de Bornträger indirecta (Antraquinonas)

A 10ml del extracto hidroalcohólico de *G. perennis* (GphT) se le agregó 2ml de HCl₆, unas gotas de solución de FeCl₃ al 10%, se calentó a baño maría por 15 minutos, se enfrió y se extrajo con 2ml de éter de petróleo, separando la fase orgánica. A ésta, se le agregó 1ml de NaOH al 10% acuoso y se observó la coloración en la fase acuosa.

3.3.1.6. Reacciones de caracterización de alcaloides

Se colocaron 3-5ml del extracto metanólico de *G. perennis* al 20% (GphMeOHt) y del extracto hidroalcohólico de *G. perennis* al 20% (GphT), se evaporaron a sequedad, posteriormente se retomaron con H₂SO₄ al 10% y se colocó en dos portaobjetos diferentes 6 gotas separadas de cada uno de los extractos y se les agregó los siguientes reactivos según FA, Ed 6. (1978)

Bouchardat (Solución acuosa de yodo en yoduro de potasio)

Ácido tánico al 1%

Mayer- Valser (Solución acuosa de tetra-yodomercuriato de potasio)

Ácido pícrico al 1%

Dragendorff (Yodo-bismutito de potasio)

3.3.1.7. Reacción para taninos con gelatina al 1%

Se preparó una solución de gelatina al 1% que además contenía NaCl (10 %). Sobre alícuota de 1 ml de esta solución se agregó 1 ml del extracto acuoso de *G. perennis*. (Domínguez, 1973):

3.4. Cromatografía de capa delgada (CCD)

Se realizó cromatografía a los extractos de *G. perennis*, en distintas fases móviles, que se seleccionaron de acuerdo a los grupos fitoquímicos que se esperaba encontrar en ellos. Para ello se llevó a cabo el procedimiento analítico detallado por Wagner, H. & Bladt, S. (1996) en “Plant Drug Analysis”. Los análisis se realizaron para los siguientes componentes activos principales: Flavonoides, Alcaloides, Terpenos, Saponinas, Cumarinas, Antraglicósidos, Arbutina, Aceite esencial y Glucósidos cardiotónicos.

3.4.1. Fase estacionaria

Cromatofolios de Silica gel 60 F 254 Merck® 0.25 mm de espesor. Para cada extracto preparados acorde a los métodos descritos en el apartado 3.2.

3.4.2. Fases móviles:

Fase móvil A: Acetato de etilo-metanol-agua (100: 13.5: 10) para el análisis de compuestos polares: glucósidos de antraquinonas, arbutina, alcaloides, glucósidos cardíacos, flavonoides y saponinas.

Fase móvil B: Tolueno-acetato de etilo (93: 7) para el análisis de compuestos lipofílicos (agliconas) aceites esenciales, terpenos, cumarinas.

Adicionalmente para algunos de los grupos fitoquímicos se usaron sistemas de solventes apropiados para estos:

Fase móvil 1: Acetato de etilo-metanol-agua (81: 11: 8) para Glucósidos cardiotónicos:

Fase móvil 2: Tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70: 20: 10) para Alcaloides.

Fase móvil 3: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100: 11: 11: 26) para Flavonoides.

Fase móvil 4: En el sistema de corrida A, las saponinas conocidas (por ejemplo, escina y el ensayo mezcla de saponina) no migran y permanecen en el inicio, para una diferenciación precisa, la cromatografía se realizó en el sistema de disolventes cloroformo-ácido acético glacial - metanol – agua (64: 32: 12: 8).

Fase móvil 5: Diclorometano-Metanol (95:5) para terpenos.

Fase móvil 6: Tolueno-acetato de etilo (80: 20) para terpenos.

Fase móvil 7: Éter etílico-tolueno (1:1; saturado con ácido acético 10%) para Cumarinas.

Fase móvil 8: (Tolueno-acetato de etilo 70:30)

3.4.3. Sustancias de referencia

Se utilizaron como compuestos de referencia Aloína arbutina, estrofantina, atropina, papaverina, reserpina, rutina, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico vitexina, hesperidina, Kaempferol, isoquercetina, quercetina, ácido cafeico, escina, saponina, escopoletina, ácido ursólico, ácido oleanólico, carvona, citral, timol, digitoxina, estrofantina.

3.4.4. Detección

Los cromatogramas se inspeccionaron primero en el visible y luego bajo luz UV-254 nm y UV-365 nm

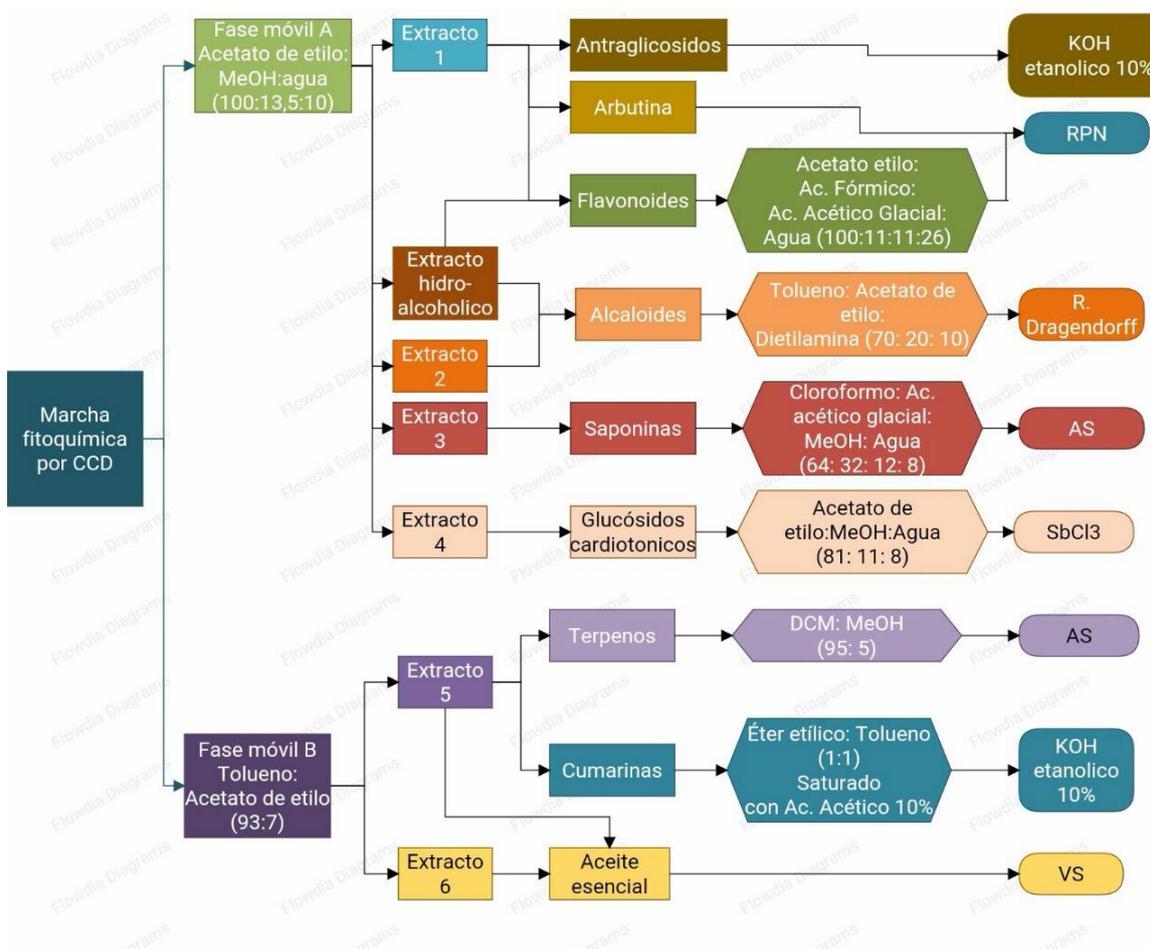


Figura 14. Esquema de análisis guiado por CCD.

3.4.4.1. Reactivos reveladores

Después de la inspección preliminar en visible, luz UV-254 y Luz UV-365 nm, cada cromatograma fue analizado para determinar la presencia de los diferentes grupos fitoquímicos por pulverización con un reactivo apropiado, los cuales se prepararon según “Plant Drug Analysis” Wagner, H. y Bladt, S. (1996). Las siguientes reacciones y reactivos, se usaron para determinar los tipos de compuestos presentes:

3.4.4.1.1. Reactivo KOH etanólico 10%

"La reacción Bornträger": La placa se roció con 10 ml y se evaluó en el vis. o en el UV-365, con o sin calentamiento. Este reactivo se utilizó para la detección de antraquinonas, antronas, cumarinas, furano y piranocumarinas.

3.4.4.1.2. Reactivo cloruro de antimonio-III- (SbCl_3)

Se preparó la solución de cloruro de antimonio-III en cloroformo (o etanol) al 20%. La placa de CCD se roció con 15-20ml del reactivo y luego se calentó durante 5-6 min a 110 ° C. Se evaluó en vis. o UV-365nm.

3.4.4.1.3. Reactivo de Dragendorff (DRG):

Se prepararon las soluciones a y b, como sigue: Solución (a): Se disolvió nitrato de bismuto básico 0,85 g en 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua con calentamiento, se filtró. Solución (b): Se disolvió 8 g de yoduro de potasio en 30 ml de agua.

Se realiza la mezcla de las soluciones a y b en proporción 1: 1; se pulverizó con el reactivo: 1 ml solución mezcla de soluciones se mezcla con 2 ml de ácido acético glacial y 10 ml de agua. Este reactivo se utilizó para la detección de alcaloides, compuestos de nitrógeno heterocíclicos.

Después del tratamiento con el reactivo de Dragendorff, la placa se roció adicionalmente con ácido sulfúrico etanólico al 10%, intensificando de ese modo las zonas de color (H_2SO_4 , naranja brillante) para alcaloides.

3.4.4.1.4. Reactivo de productos naturales (RPN)

Se disolvió 1g del ester del ácido 2- amino etil difenil bórico (AEDBE) en 100 ml de metanol y se roció la placa. Este reactivo se utilizó para producir la detección de los flavonoides, arbutina.

3.4.4.1.5. Reactivo Vainillin-sulfúrico (VS)

Se preparó la solución de vainillina etanólica 1% (solución I) y la solución de ácido sulfúrico etanólico 10% (solución II). La placa se roció con 10 ml de solución I, seguido inmediatamente por 10 ml de solución II. Después de calentar a 110 ° C durante 5 a 10 min bajo observación, la placa se evaluó en vis.

3.4.4.1.6. Reactivo de Anisaldehído - ácido sulfúrico (AS)

Se mezclaron 0,5 ml de anisaldehído con 10 ml de ácido acético glacial, seguido de 85 ml metanol y 5 ml ácido sulfúrico concentrado, en ese orden. La placa de CCD se roció con aproximadamente 10 ml, se calentó a 100°C durante 5 a 10 min, a continuación se evaluó en visible y luz UV-365 nm. Este reactivo se utilizó para la detección de terpenoides y saponinas.

3.5. Cromatografía líquida de alta resolución con detección de absorción ultravioleta (HPLC-UV)

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución se realizaron en un cromatógrafo líquido Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA), equipado con una bomba terciaria de gradiente dual (DGP-3000) y un detector con arreglo de diodos DAD-3000. Se utilizó un inyector manual Rheodyne, modelo 7725i, con loop fijo de 20 μ l (Rheodyne, CA, EEUU). La separación se realizó utilizando una columna C18 (250 x 4,6 mm, Lichrospher 5 μ m, Merck). Se utilizó como fase móvil tetrahidrofurano: metanol: agua (15:5:85 v/v) a la cual se le ajustó el pH a 2,5 con ácido fosfórico, a flujo 1 ml/min. Los datos fueron obtenidos a 330 nm.

Fueron utilizados para realizar el análisis, el extracto metanólico al 20% (GphMeOHt), obtenido como se describió en 2.2.3 y el extracto hidroalcohólico (GphT) los cuales se diluyeron 1:5 con la fase móvil anteriormente descrita. Se preparó un estándar triple con los compuestos de referencia rutina, isoquercetina y ácido cafeico

3.6. Determinación de fenoles totales. Método de Folin – Ciocalteu

El ensayo Folin-Ciocalteu (Fig. 15) se usa como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales; el reactivo de Folin es una mezcla de ácidos fosfowolfrámico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) los cuales en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm (Singleton y Rossi, 1965).

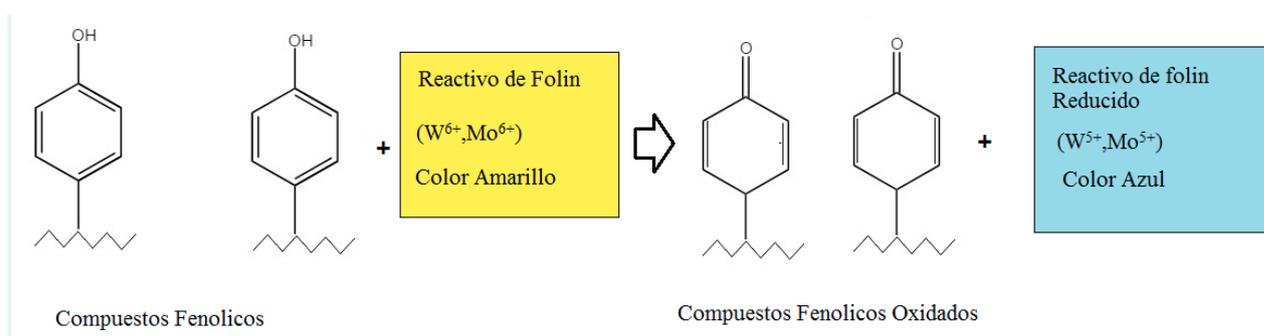


Figura 15. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu. Tomada y adaptada de Girbés & Jiménez (2010)

Por cada 50 μ L de una dilución apropiada de los extractos, se adicionó 800 μ L de agua destilada, 100 μ L de una disolución de carbonato de sodio al 20 %P/V y 50 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu. Esta disolución se dejó reposar por 1 hora y, luego, se leyó la absorbancia a 765 nm. Se construyó una curva de calibración con ácido gálico (Sigma-Aldrich, USA) como referencia. El contenido total de fenoles se expresó como μ g EQ de ácido cafeico/g extracto seco utilizando una curva de calibración validada su linealidad mediante análisis de regresión de la gráfica concentración/respuesta, obtenida de 7 concentraciones diferentes.

3.7. Estudio de la actividad antioxidante *Gomphrena perennis* L

La actividad antioxidante es un parámetro ampliamente utilizado para caracterizar diferentes materiales vegetales, esta se basa en la capacidad de algunas sustancias de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de procesos que causan excesiva oxidación involucrando ERO. Hasta el momento han sido descritos diversos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras biológicas, los cuales están relacionados con la producción de un radical orgánico o de especies reactivas del oxígeno mientras que otros se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos.

Actualmente no existe un ensayo universal de la actividad antioxidante *in vitro*, debido a que la actividad anti-radicalaria depende fundamentalmente de la naturaleza del radical y del método de generación del mismo. Teniendo como punto crítico a la hora de obtener resultados importantes en el desarrollo de cualquier ensayo antioxidante, la elección de un sistema químico para generar especies reactivas. (Aruoma, 2003; Prior y col., 2005).

3.7.1. Capacidad antioxidante total

Para determinar el potencial antioxidante de diferentes materiales biológicos han sido desarrollados diferentes métodos espectrofotométricos, caracterizados por su rápida aplicación, escasa manipulación de material biológico y por no necesitar muchos instrumentos. Las muestras ensayadas se compararon con patrones conocidos por su potencial antioxidante como ácido ascórbico o Trolox. Dependiendo del procedimiento de las reacciones, los ensayos pueden utilizar el retraso en la oxidación (fase lag) como

parámetro de la actividad antioxidante o analizar la capacidad de captación del radical libre o reducción del ión metálico o catión radical hasta alcanzar el estado estacionario (Arnao y col., 1999).

3.7.1.1. Reacción con el radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) de amonio (ABTS^{•+})

El método se basa en la formación de un radical catiónico ABTS^{•+} (cromóforo verde) por la acción oxidativa de peroxidasas u oxidasas sobre ABTS o de agentes oxidantes, como dióxido de manganeso o persulfato de potasio. El radical ABTS^{•+} formado presenta máximos de absorción a 414 nm y en las proximidades del infrarrojo (645, 732 y 815 nm), lo que evita interferencias generadas por cromógenos de la muestra a estudiar. La finalidad del método consiste en observar la decoloración del radical ABTS debido a la interacción con especies antioxidantes.

El radical ABTS^{•+} se produjo utilizando una mezcla de reacción que contenía ABTS (7 mM) y persulfato de potasio (2,45 mM) en tampón fosfato pH 7,0. La mezcla de reacción se preparó 12 h antes de su uso y se mantuvo a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Se ajustó la absorbancia de la disolución de ABTS^{•+} a 0,7 unidades a 732 nm con tampón fosfato pH 7,0 (Pannala y col., 2001).

La reacción se inició por la adición de 10 µL de diluciones apropiadas de cada uno de los extractos metanólico (GphMeOH), acetato de etilo (GphAcEt) y diclorometano (GphDCM) o compuesto de referencia (ácido cafeico) a 990 µL de la disolución de ABTS^{•+}. Tras incubación a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min, se leyó la absorbancia a 732 nm. La actividad antioxidante total se expresó

como equivalentes (EQ) μg de ácido cafeico/g de extracto seco utilizando una curva de calibración validada su linealidad mediante análisis de regresión de la gráfica concentración/respuesta, obtenida de 6 concentraciones diferentes.

3.7.1.2. Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) (Fantinelli y col., 2005).

El fundamento de esta técnica consiste en la visualización de la decoloración del radical estable DPPH•, el cual posee un color violeta intenso y disminuye en presencia de un antioxidante (AO-H) u otro radical (R•). Es posible, por tanto, cuantificar y observar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una disolución metanólica de DPPH• (Brand-Williams y col., 1995).

El análisis de los extractos de diclorometano (GphDCM) y metanol (GphMeOh) se realizaron por cromatografía en capa delgada (CCD) sobre Silica gel 60 F254 (Merck®, Germany) usando como fase móvil diclorometano : metanol (95 : 5) y acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial : agua (100:11:11:26), respectivamente.

Se utilizaron como compuestos de referencia quercetina (Extrasynthese, France), kaempferol (Extrasynthese, France), rutina (Extrasynthese, France), isoquercetina (Extrasynthese, France), ácido clorogénico (Sigma-Aldrich, USA).

Tras el desarrollo cromatográfico, las placas de CCD fueron rociadas con una disolución metanólica de DPPH• (0,2 %P/V) y pasados 30 min se procedió a captar una imagen digital. Los compuestos antioxidantes, con capacidad atrapadora de DPPH• podrán ser apreciados como una banda amarilla sobre un fondo violáceo.

3.8. ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS

3.8.1. Preparaciones Biológicas

Los experimentos fueron realizados según la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) publicada por el United States National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revisada en 1996). Los protocolos que se realizaran cuentan con la aprobación del CICUAL de la Facultad de Ciencias Exactas UNLP (Protocolo No. 015/2015)

3.8.1.1. Intestino aislado de rata

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 200-250 g mantenidas en el bioterio de la cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Exactas de UNLP bajo condiciones controladas de 12 hs luz-12 hs noche, con 24 horas de ayuno y agua *ad libitum*. Los animales anestesiados con uretano (0,6 ml de solución al 25% cada 100 g, 1.5 g uretano/Kg de animal), vía intraperitoneal (Livingstone y Livingstone, 1970) para la eutanasia (CICUAL Protocolo Nro 015/2015) Inmediatamente se aislaron los duodenos e íleons, cortados en trozos de 2 a 3 cm de longitud. Éstos se colocaron en cubas de doble camisa termostalizadas a 37°C, conteniendo 20 ml de solución Tyrode (ver composición en apartado 3.8.2.1. *Soluciones y drogas empleadas*) y burbujeo constante de aire, determinándose un pH 8.2. (Livingston y Livingstone, 1970; Ragone y col., 2007; Consolini y col., 2011; Blanco y col., 2013). Los preparados fueron sujetos longitudinalmente (Fig. 16) manteniendo el tubo intestinal abierto en sus extremos para facilitar la circulación de solución y la oxigenación en su interior.



Figura 16. Foto del montaje del duodeno aislado de rata dentro de una cuba termostaticada de doble camisa, sujeto a un transductor de fuerza y sumergido en solución Tyrode.

3.8.1.2. Corazones aislados de rata

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de ambos sexos (200 a 250 g de peso) alimentadas *ad libitum* se anestesiaron con sobredosis de pentobarbital y se heparinizaron (CICUAL Protocolo Nro 015/2015). El corazón fue rápidamente removido por toracotomía y sumergido en solución Krebs (ver composición en apartado 3.8.3.1. *Soluciones y drogas empleadas*). Inmediatamente se perfundió en forma retrógrada mediante la técnica de Langerdorff con un flujo constante de 6 ml/min/g mediante bomba peristáltica (Gilson Minipuls, France). Se empleó la técnica descrita anteriormente por el grupo de Ponce- Hornos y col. (1995) y que ha sido ampliamente utilizada laboratorio de la Cátedra de Farmacología de la UNLP. (Ponce-Hornos y col., 1995; Consolini y col., 2001; Consolini y col., 2004; Consolini y col., 2007). El montaje del corazón se realizó de la siguiente manera: inicialmente se removieron ambas aurículas y se eliminaron las contracciones espontáneas mediante pequeñas compresiones o cortes en el tabique interventricular. Posteriormente se introdujo un balón de látex dentro del ventrículo izquierdo, cerrándolo por medio de una sutura. Seguidamente, se introdujo el corazón dentro del interior de la cámara del calorímetro de flujo, al igual que el corazón de rata.

Una vez que se colocó el corazón dentro de la cámara, esta se cerró rápidamente y se sumergió el calorímetro en un baño de agua mantenido a temperatura controlada de 37 ± 0.01 °C.

Los corazones de rata fueron estabilizados con estímulo eléctrico de 5 V-5 ms mediante un estimulador eléctrico (Letica 12406), a frecuencia constante de 3 Hz.



Figura 17. Foto del montaje del preparado de corazón aislado.

3.8.1.3. Ratones utilizados para la realización de test para evaluar comportamiento

Se utilizaron ratones Swiss albinos (20-30g) mantenidos bajo condiciones controladas de 12 hs luz-12 hs noche, con 24 horas de ayuno y agua *ad libitum* (Ragone y col., 2010). Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente y mantenidos en casilleros individuales durante el desarrollo del protocolo en condiciones ambientales de luz y sonido controladas.

3.8.1.4. Ratas utilizadas para la evaluación de la presión arterial

Se utilizaron ratas machos normotensas Sprague-Dawley (300-400g), mantenidas bajo las siguientes condiciones: ciclo de luz oscura de 12 h, 20-25°C, alimentadas y con acceso a agua *ad libitum* El día del experimento las ratas fueron anestesiadas 1.5g de

uretano por Kg de animal administrado en forma intrapertoneal. Una vez anestesiadas se colocaron en posición supina, se realizó un traqueotomía y se procedió a la canulación de la arteria carótida interna y yugular interna (ver sección 3.8.5 de Materiales y Métodos) (Consolini y col., 1999).

3.8.1.5. Ratas utilizadas para la evaluación de la actividad diurética:

Se utilizaron ratas hembras entre 200 y 250 g de peso (n=6) a las cuales se les proveyó alimento y agua *ad libitum* hasta 24 horas previas al ensayo. Luego de este tiempo fueron privadas de comida pero se les mantuvo el agua de bebida hasta la administración de la droga.

3.8.2. Estudio de la actividad antiespasmódica

La actividad antiespasmódica se evaluó en estudios *ex vivo* mediante curvas concentración-respuesta (CCR) del agonista carbacol (Cbl) como agonista muscarínico, en ausencia y presencia de diversas concentraciones de tintura de *Gomphrena perennis* (GphT).

Para evaluar los mecanismos de acción de GphT, se efectuaron protocolos de CCR de calcio en medio despolarizante de alta $[K^+]$ (40 mM). Se realizaron las sucesivas CCR de Ca^{2+} en ausencia y presencia de diversas concentraciones de GphT.

3.8.2.1. Soluciones y drogas empleadas

Solución Tyrode (concentraciones en mM): 8.0 NaCl, 2.0 KCl, 2,6 MgCl₂, 1.0 NaHCO₃, 1.3 PO₄H₂Na, 1.0 C₆H₁₂O₆, 1.8 CaCl₂ para intestino (Hamada y col., 1997). El burbujeo se efectuó con aire, la temperatura de 37°C, lo cual determina un pH de 8.2 que es considerado el óptimo para el intestino aislado (Livingston y Livingston, 1970; Hamada y col., 1997).

Tyrode sin Calcio (0-Ca): misma composición que el Tyrode sin agregado de CaCl₂.

Tyrode 0-Ca 40mM K: con agregado de 0.6 ml de solución de KCl 10% en cada cuba de 20 ml de Tyrode 0-Ca.

CCR de Carbacol: se agregaron sucesiva y acumulativamente 0.2 ml de carbacol a concentraciones 1, 2, 7, 20, 70 y 200 µg/ml en 20 ml de Tyrode (dilución 1/100 en cuba).

CCR de Calcio: Se agregaron sucesiva y acumulativamente 0,2 ml de Cloruro de calcio anhidro (Mallinckrodt, USA-Canadá) a concentraciones de 0.882, 1.764, 5.3, 18.5, 53.0, 185.22 y 530 mg/ml en 20 ml de *Tyrode 0-Ca 40mM K* (dilución 1/100 en cuba)

Vehículo etanólico: solución acuosa con etanol 70° sin el agregado de la parte aérea de *G.perennis*. La concentración de etanol 70° utilizada fue equivalente a la concentración utilizada para la preparación de la mayor concentración utilizada de tintura de *G. perennis*.

3.8.2.1. Protocolos farmacológicos y cálculo de parámetros

Se registró la tensión desarrollada por los trozos de íleon y duodeno mediante transductores de fuerza isométricos (WPI Instruments, USA) acoplados a un amplificador de 4 canales (TBM4M, Instruments, USA) para la adquisición en computadora mediante tarjeta A/D Eagle (USA).

Los preparados fueron estabilizados durante al menos 30 minutos, con cambios periódicos del medio.

Se realizaron los siguientes protocolos:

3.8.2.1.1. Curvas concentración - respuesta (CCR) acumulativas con Carbacol (Cbl):

En cada preparado se realizaron dos CCR con el agregado de 0,2 ml de cada concentración sucesiva de la escala de Cbl en ausencia de antagonista hasta obtener el efecto máximo (Emax: considerado 100%) (CCR control) A continuación se realizaron sucesivas CCR en presencia de concentraciones únicas de GphT en orden creciente (0,01 – 0,03 – 0,1 – 0,2 - 2 mg de planta seca/ml de cuba). GphT fue agregada 5 minutos previos a la realización de la CCR. De igual manera se realizó un control con el previo agregado de 0,2 ml de vehículo etanólico previo a realizar las CCR con GphT. Todas las CCR fueron referidas al 100% del efecto máximo obtenido en la segunda CCR control. Al finalizar cada CCR se efectuaron tres lavados consecutivos (reemplazos de Tyrode) y se esperó 10 minutos de estabilización.

3.8.2.1.2. Curvas concentración – respuesta (CCR) acumulativas de calcio (Ca^{+2}) en medio de Tyrode-0- Ca^{2+} -40 mM K^{+}

Se realizaron en los preparados estabilizados en medio Tyrode con Ca^{2+} , luego se reemplazó el medio por Tyrode-0- Ca^{2+} y se efectuaron dos CCR control (sin pre-tratamiento) agregando 0,6 mL de solución de KCl 10% para llevar la concentración de potasio [K^{+}] a 40 mM. Luego se agregaron secuencialmente 0,2 mL de cada concentración sucesiva de la escala de Ca^{2+} hasta obtener el efecto máximo (Emax: considerado 100%). En cada preparado se realizaron dos CCR control, seguidas de sucesivas CCR en presencia de una concentración única de GphT (agregada 5 minutos antes), en orden creciente (0,01 – 0,03 – 0,1 – 0,2 – 2 y 6 mg de planta seca/ml de cuba). Las soluciones de diferentes concentraciones de GphT utilizadas en las CCR fueron preparadas a partir de la tintura madre de *G. perennis* (GphT) al 20% en solución

fisiológica. De igual manera se realizó un control con el previo agregado de 0,2 ml de vehículo etanólico previo a realizar las CCR con GphT. Todas las CCR se analizaron referidas al 100% del efecto máximo (Emax) obtenido en la CCR control-vehículo. Al finalizar cada CCR se efectuaron 3 lavados consecutivos con Tyrode-0 Ca^{2+} y se esperó 10 minutos de estabilización

3.8.2.2. Tratamiento estadístico de los resultados

Los datos obtenidos fueron analizados usando el programa Graph Pad Prisma versión 4.1. Se utilizó el método estadístico ANOVA de dos vías (variables: tratamiento y log [agonista]) para comparar las respectivas CCR, seguido de comparaciones pareadas a posteriori a los respectivas log[agonista] por el test de Bonferroni. Los datos de CI_{50} se expresaron como media \pm ESM a partir de los n datos obtenidos (n= 7). En todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$.

3.8.3. Mediciones mecánico calorimétricas en corazones enteros de rata perfundidos

Mediante el uso de corazones aislados de rata se evaluaron mecánico calorimétricamente los efectos de diferentes concentraciones de GphT frente a la injuria por isquemia reperfusión. La GphT fue perfundida *in situ* al corazón o administrada vía oral en el agua de bebida a las ratas previo al experimento durante 7 días previos al experimento.

3.8.3.1. Soluciones y drogas empleadas

La solución control de estabilización inicial de corazones enteros (Krebs-C) tuvo la siguiente composición (en mM): 1 MgCl_2 , 125 NaCl , 0.5 NaH_2PO_4 , 7 KCl , 25

NaHCO₃ y 2 mol CaCl₂, burbujeado con carbógeno (95% O₂:5% CO₂), para alcanzar un pH de 7.4.

De igual manera que para los protocolos de actividad antiespasmódica, se preparó un control o blanco de etanol 70° al que llamaremos vehículo etanólico.

3.8.3.2. Mediciones mecánico-calorimétricas en corazones enteros perfundidos

En ambas preparaciones de corazón entero el balón intraventricular de volumen regulable fue conectado mediante una cánula llena con agua a un transductor de presión (Statham Pb 23 Db) para el registro continuo de la presión intraventricular durante las contracciones isovolumétricas. El transductor de presión se calibró (en mm Hg) antes de cada experimento. El volumen del balón se aumentó progresivamente en pequeños pasos cada 5 minutos, hasta que en dos sucesivos aumentos no se incrementara la máxima presión desarrollada durante la contracción (P). Este volumen diastólico se mantuvo durante todo el experimento para obtener contracciones isovolumétricas. La señal se amplificó y se registró simultáneamente en polígrafo y computadora con adquisición A/D a frecuencias bajas (1Hz) o altas (100 Hz) según se estuviera respectivamente en un estado estacionario sin contracciones o durante las contracciones. A partir del registro continuo de presión intraventricular (LVP) se calcularon la máxima presión desarrollada en cada contracción (P) y los cambios en la presión diastólica con respecto a la condición preisquémica con solución Krebs-C (Δ LVEDP), ambas en mm de Hg. P también fue expresada como el porcentaje del valor preisquémico durante la estabilización en solución Krebs-C durante la isquemia y la reperfusión. Simultáneamente, se midió el flujo de calor total liberado (Ht, calibrado en mW) por el corazón en el interior de la cámara calorimétrica continuamente durante todo el experimento, tanto en presencia

como en ausencia de perfusión. Dado que los corazones varían su flujo de calor de reposo (H_r) durante el proceso de I/R, no fue posible calcular el calor activo por latido (H_a).

Las señales de flujo de calor (H_t) y presión intraventricular (LVP) fueron amplificadas (mediante un preamplificador artesanal) y registradas en un polígrafo Beckman R511A de 4 canales (USA) y digitalizadas mediante plaqueta A/D y software (National Instruments P-516, USA).

Al finalizar cada experimento se extrajo el corazón del calorímetro, se pesó el mismo en un recipiente tarado para obtener el peso húmedo con el cual se expresó el flujo de calor (en mW/g) y luego fue llevado a estufa para su secado hasta peso constante. Se obtuvo un porcentaje de agua de 84.27 ± 4.75 (n=28) para los corazones de rata.

Para el cálculo de la economía, se reemplazó el clásico cálculo de la “economía de la contracción” por el cálculo de la “economía muscular total”. La primera se define como la relación entre P y la energía de un latido (H_a), la cual se calcula por diferencia entre el H_t y el H_r multiplicada por el tiempo de una contracción. Sin embargo, no fue posible estimar el flujo de calor de reposo (H_r) durante la evolución de la I/R. Por lo tanto, se calculó un índice de “economía muscular total” a partir de la relación P/H_t donde H_t contiene el flujo de energía basal más el componente activo del corazón.

3.8.3.3. Calibración y estabilización del calorímetro

El calorímetro de flujo utilizado ha sido ampliamente descrito en trabajos previos del grupo (Ponce-Hornos y col., 1982; Ponce-Hornos y col., 1995; Consolini y col., 1997; Consolini y col., 2001; Consolini y col., 2007). Está constituido por una gran masa de cobre con una cámara interna delimitada por dos módulos Peltier de cerámica paralelos, con 127 unidades termosensibles cada uno (Melchor Thermoelectrics, USA), que registran las variaciones de temperatura entre el interior de la cámara y el baño

externo de temperatura constante. Mediante este método puede medirse continuamente el flujo de calor liberado (Fig. 18).

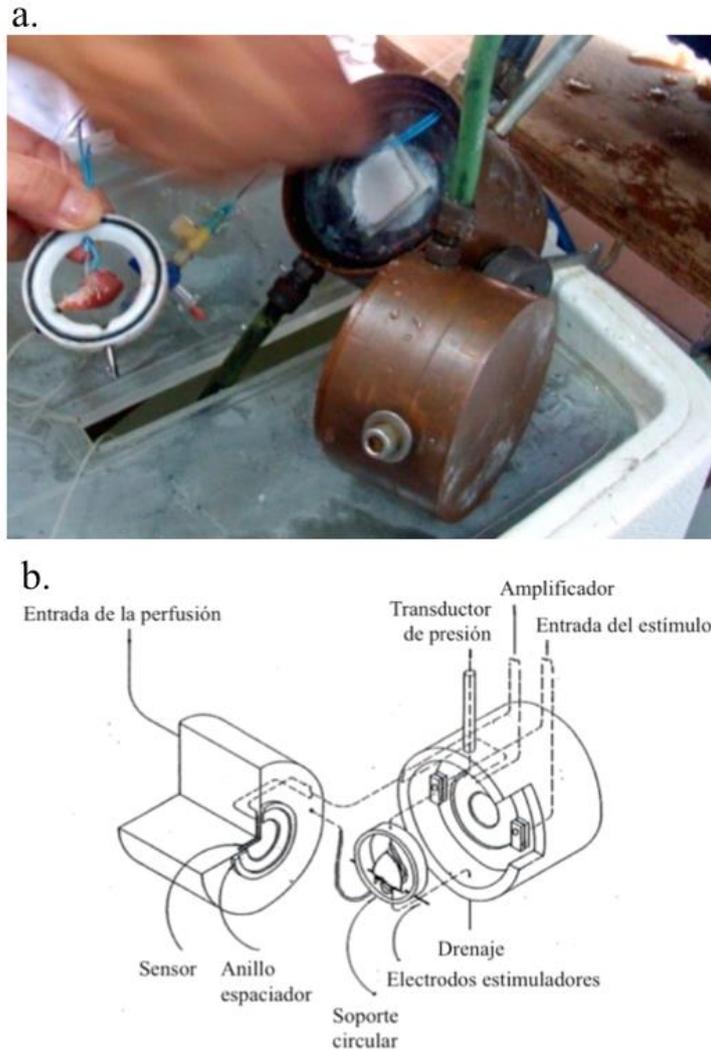


Figura 18. a) Calorímetro y montaje del preparado (parte superior), b) esquema del calorímetro de flujo (parte inferior, utilizado en esta tesis).

Aproximadamente 24 horas antes de cada experimento se enciende el sistema termostático del baño del calorímetro regulado a 30 ± 0.01 °C. Esta regulación se lleva a cabo por la circulación de agua entre tres baños de un volumen mayor a 10 L cada uno: uno contiene el termorregulador al ± 0.01 °C (MGW Lauda, Alemania), el segundo contiene los matraces con las soluciones a perfundir y a su vez impulsa la circulación

mediante bomba (Grundfos) hacia los otros dos baños, y finalmente el tercer baño contiene al calorímetro. Así se logra una temperatura uniforme en todo el sistema. El día del experimento se calibraron los canales destinados a registrar la presión intraventricular y el flujo de calor liberado.

Antes y después de la colocación del músculo en la cámara se registró el flujo de calor debido a la perfusión y los cambios producidos por el corte de la misma, los cuales se utilizarán como líneas de base para el registro producido por el corazón en cada experimento. La calibración del calorímetro se realizó al finalizar cada protocolo experimental, mediante la inyección de una potencia constante de 2 mW (a frecuencia de 2.1 kHz y voltaje subumbral de 1 volt) a través del mismo músculo que actúa como 84 resistencia. Eventualmente se calibró sobre una resistencia eléctrica equivalente (de 1000 ohm) ubicada y estabilizada en el interior del calorímetro. Así se obtuvieron en cada experimento dos factores de calibración (en mW/V), uno en condiciones de presencia y otro de ausencia de perfusión. En promedio, el factor de calibración con perfusión fue el doble del factor sin perfusión, de acuerdo al comportamiento descrito que indica pérdida de calor ejercida por la perfusión (Ponce-Hornos y col., 1982).

3.8.3.4. Protocolos farmacológicos

Se utilizó un modelo de isquemia reperfusión de atontamiento sin infarto (isquemia de no flujo 20 min – reperfusión 45 min) cuyos parámetros mecánico contráctiles han sido previamente validados (Ragone y col., 2015).

3.8.3.4.1. Evaluación de los efectos de la perfusión directa de GphT en corazones aislados de rata

Luego de un período de estabilización con solución Krebs-C durante 20 minutos, los corazones fueron perfundidos con 0,1, 0,3 y 1 % de GphT durante 15 minutos cada una. (Fig. 19)

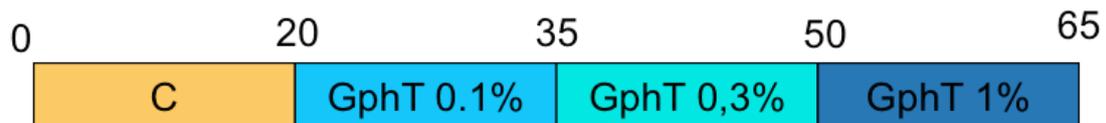


Figura 19. Protocolos experimentales básicos sin período de isquemia realizados en corazones aislados de rata.

3.8.3.4.2. Evaluación de los efectos de la perfusión directa de 0,1% de GphT en corazones aislados de rata expuestos a I/R por atontamiento

Luego de un período de estabilización con solución Krebs-C durante 20 minutos, los corazones fueron perfundidos con 0,1, % de GphT durante 15 minutos y luego fueron expuestos a 20 minutos de isquemia por corte de flujo y 45 minutos de reperfusión con solución Krebs-C. (Fig. 20).

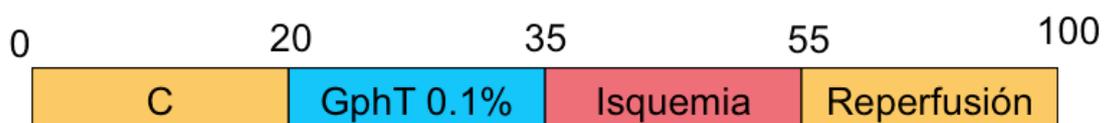


Figura 20. Protocolos experimentales básicos de I/R realizados en corazones aislados de rata.

3.8.3.4.3. Evaluación de los efectos de la administración oral GphT en corazones aislados de rata expuestos a I/R por atontamiento:

A otro grupo de ratas, se le administró GphT a una dosis de 2,35mg de planta seca/ml agua de bebida al día durante 7 días previos al experimento. Los corazones fueron montados en el calorímetro y perfundidos mediante la técnica de Langerdoff como fue descrito previamente. Luego de un período de estabilización con solución Krebs-C

durante 20 minutos, los corazones fueron expuestos a 20 minutos de isquemia por corte de flujo y 45 minutos de reperfusión con solución Krebs-C. (Fig. 21).

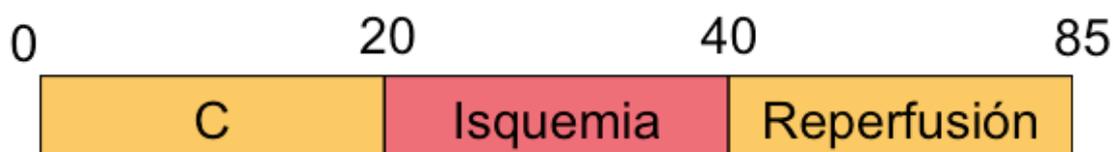


Figura 21. Protocolos experimentales básicos de I/R realizados en corazones aislados de rata.

3.8.4. Medidas de actividad central

3.8.4.1. Mediciones de la movilidad espontánea en ratones:

3.8.4.1.1. Test de campo abierto en ratones

Se evaluó la locomoción espontánea y la actividad exploratoria de los ratones en campo abierto, el cuál consistente en una caja blanca de 30 x 50 cm con paredes de 27 cm de altura dividida en 15 cuadrados de 10 cm² por líneas negras (Fig. 22). La locomoción espontánea se estimó a partir del número de líneas cruzadas por ambas patas delanteras del animal, mientras que la actividad exploratoria se estimó mediante el número de veces que el ratón mantuvo su cuerpo erguido apoyado en sus patas traseras.

Además se midió el número de acicalaciones como estimación de emocionalidad, el número de defecaciones y micciones. Se colocó en una habitación con luz tenue dado que los ratones son animales de hábitos nocturnos. Los mismos se dividieron en 5 grupos, respectivamente para los siguientes tratamientos: solución salina (control negativo), 5 mg/kg diazepam (Roche, Argentina) (control positivo), vehículo etanólico (ver sección 3.8.2.1 en materiales y métodos), GphT 400 y 800 mg/kg. Todos los fármacos se administraron por inyección intraperitoneal. Antes de la inyección cada animal se colocó en la misma esquina del campo abierto permitiendo la libre exploración durante 5min. De

esta manera se comprobó que todos los animales utilizados tenían el mismo comportamiento conductual.

Luego de 30 min desde la administración, cada animal se colocó en la misma esquina del campo abierto, y durante 5 min se registró el número de líneas cruzadas en 5 minutos. Simultáneamente se registró el número de enderezamientos. (Choleris y col., 2001; Ragone y col., 2010) El mismo protocolo se repitió a los 60, 90 y 120 minutos después de la administración. Se realizaron 6 a 9 determinaciones en cada grupo.

3.8.4.1.1.2. Tratamiento estadístico de los resultados:

Los datos obtenidos fueron analizados usando el programa Graph Pad Prisma versión 4.1. Se utilizó el método estadístico ANOVA de dos vías seguido por el test de Bonferroni. En todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$.



Figura 21. Campo abierto usado en la medición de la movilidad espontánea en ratones.

3.8.4.1.2. Test de laberinto en cruz elevado:

El test de laberinto en cruz elevado (LCE) es usado para evaluar ansiedad de los ratones colocados en un recinto que consta de 4 ramas: dos ramas abiertas (30 cm x 6 cm) y dos ramas cerradas (30 cm x 6 cm) cuyas paredes tienen una altura de 20 cm. Cada una de las ramas converge a un área central de 6 cm por 6 cm (Fig. 23). El laberinto entero fue elevado a una altura de 50 cm encima del piso. Los procedimientos experimentales fueron realizados en un ambiente controlado de luz y ruido. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con las siguientes concentraciones de tintura (GphT): 400 y 800 mg/kg o infusión de *G. perennis* 400 mg/kg, un control positivo (diazepam 5 mg /kg) o el vehículo etanólico (ver sección 3.8.2.1) antes de ser colocados sobre el laberinto. Previo al tratamiento, los ratones fueron sometidos al laberinto en cruz durante 5 minutos de forma de evaluar la homogeneidad de los mismos. Los ratones inyectados intraperitonealmente se colocaron en la plataforma central del laberinto y durante 5 minutos se observó su comportamiento. Se midieron los siguientes parámetros: número de entradas a las ramas abiertas, número de entradas a las ramas cerradas, tiempo de permanencia tanto en ramas abiertas como en cerradas. Se registraron las mediciones en cada ratón cada 30 min. Las medidas se expresan como promedio \pm ESM.



Figura 23. Medición de las entradas de los ratones a las ramas abiertas en el laberinto en cruz.

3.8.4.1.2.2. Tratamiento estadístico de los resultados:

Los datos obtenidos fueron analizados usando el programa Graph Pad Prisma versión 4.1. Se utilizó el método estadístico t- test o ANOVA de dos vías seguido por el test de Bonferroni según corresponda. En todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$.

3.8.5. Medición de la presión arterial en ratas normotensas:

La presión arterial (PA) se midió directamente a través de una cánula heparinizada en la arteria carótida interna conectada a un transductor de presión Bentley 800 acoplado a un sistema de adquisición Power Lab conectado a un ordenador y expresado en mm Hg (Fig. 24). Los pulsos de PA se registraron continuamente. Sin tratamiento, la PA permaneció constante durante al menos 3 h. Las soluciones correspondientes fueron infundidos de forma i.v. a través de la vena yugular en volúmenes de 0,1 ml separados por no menos de 15 min. Después de 30 minutos de estabilización, se administraron sucesivamente dosis de 0.5, 2, 5% de GphT. Una vez que se logró estabilizar nuevamente la presión arterial de la rata (aproximadamente 30 min), se administraron 25 $\mu\text{mol/kg}$ de L-NAME (Sigma, EE.UU.) previo al agregado de las mismas dosis de GphT. La presión arterial fue registrado durante un tiempo total de 4 o 5 horas de experimento.



Figura 24. Montaje de la rata canulada para la medida de la presión arterial en ratas.

3.8.5.1. Tratamiento estadístico de los resultados:

Los resultados obtenidos fueron expresados como promedio \pm ESM y fueron analizados usando el programa Graph Pad Prisma versión 4.1. Se utilizó el método estadístico test de Student's pareado en todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$ y test de ANOVA de dos vía con test a posteriori de Bonferroni con nivel de significancia de $p < 0.05$.

3.8.6. Medidas de la actividad diurética:

Los cuatro pares de ratas fueron tratadas simultáneamente por administración intragástrica de vehículo etanólico, amilorida 1 mg/ml (20 mg/kg) o GphT 0.5% y 2 % de GhpT (correspondientes a dosis de 100 y 400 mg de GphT/Kg) respectivamente, en volúmenes de aproximadamente 5 ml por rata. Las medidas fueron repetidas en intervalos de una semana utilizando el mismo grupo de 8 ratas. El tratamiento de cada rata fue randomizado. Cada par de rata tratada fue mantenida respectivamente en su jaula metabólica privada de agua y comida (Fig 25), se midió el volumen urinario de cada grupo cada 30 minutos durante cinco horas y medias totales (Consolini y col., 1999; Cummings y col., 1960; Rebuelta y col., 1985). Al final del experimento se separó una fracción de la orina recogida para realizar la medida del contenido de Na^+ y K^+ por espectrofotometría de llama los cuales fueron expresados como mEq por Kg de animal. A partir de estos datos se calculó la excreción urinaria volumétrica (EUV) como el cociente entre volumen de orina recogida por kg de animal y el volumen administrado por kg de animal (Consolini y col., 1999)



Figura 25. Jaula metabólica utilizada para la medición de la actividad diurética.

3.8.6.1. Tratamiento estadístico de los resultados:

Los resultados obtenidos fueron expresados como promedio \pm ESM y fueron analizados usando el programa Graph Pad Prisma versión 4.1. Se utilizó el método de análisis de variancia (ANOVA) y un test a posteriori de Bonferroni. En todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Ensayos fitoquímicos:

4.1.1. Rendimiento de los extractos de *G. perennis*:

El rendimiento de los extractos hidroalcohólico (GphT), el extracto metanólico total (GphMeOHt) y los obtenidos de la extracción con solventes de polaridad creciente con diclorometano (GphDCM), acetato de etilo (GphAcOEt) y metanol (GphMeOH) fueron calculados en porcentaje (g extracto/100g de material vegetal seco). La preparación de los extractos se describió en el apartado de Materiales y métodos (numeral 3.2)

Tabla 3. Rendimiento de los extractos de G. perennis.

	Extracto hidro-alcohólico (GphT)	Extracto metanólico total (GphMeOHt)	Extracto DCM (GphDCM)	Extracto Acetato de etilo (GphAcEt)	Extracto Metanólico (GphMeOH)
Rendimiento (%)	7.1%	10,1%	1,25%	1,05%	9,59%

4.1.2. Análisis fitoquímico:

Se llevó a cabo un *screening* fitoquímico aplicando la técnica de cromatografía de capa delgada detallada por Wagner y Bladt, (1996) en “Plant Drug Analysis” así como reacciones generales, para la detección preliminar de los diferentes grupos fitoquímicos presentes en los extractos de la parte aérea de *G. perennis* detallado a continuación.

4.1.2.1. Antraquinonas:

4.1.2.1.1. Cromatografía de capa delgada (CCD) para antraquinonas:

Para determinar la presencia de antraquinonas se realizó una CCD de los extractos hidroalcohólico (GphT) y metanólico total (GphMeOHt) de *G. perennis* utilizando como fase móvil A (Acetato de etilo-metanol-agua 100: 13,5: 10), en presencia de solución de referencia de Aloína, como se describió en el numeral 3.4 de materiales y métodos. Se observó al visible después del revelado con hidróxido de potasio (KOH) etanólico al 10%.

La solución de referencia de aloína evidenció una banda de color amarillo en un $R_f \sim 0.45$; mientras que en los extractos no evidenciaron zonas rojas (antraquinonas) ni amarilla (antronas).

Para confirmar la ausencia en el caso de *G. perennis* de los derivados antracénicos se efectuó la reacción de Bornträger con el extracto GphT, que permite la detección de antraquinonas libres (coloración roja). Mientras que para el reconocimiento de los heterósidos se sometió el extracto GphDCM previamente a hidrólisis (Bornträger indirecta).

Tabla 4. Reacción de Bornträger de los extractos hidroalcohólico (GphT) y diclorometano (GphDCM) de *G. perennis*

Extracto	Prueba de Bornträger	Prueba de Bornträger (indirecta)
GphT	No realizado	Negativo
GphDCM	Negativo	No realizado

La CCD y los resultados negativos de las reacciones de Bornträger tanto directa como indirecta confirman la ausencia de antraquinonas en los extractos de *G. perennis*.

4.1.2.2. Arbutina:

4.1.2.2.1. Cromatografía de capa delgada (CCD) para arbutina:

Para determinar la presencia de arbutina se realizó una CCD usando la fase móvil A (Acetato de etilo-metanol-agua 100: 13,5: 10), se utilizó como solución de referencia arbutina en metanol y se observó a luz UV 254 nm.

La solución de referencia de arbutina presentó una banda en un $R_f \sim 0.4$ percibida con luz UV 254 nm que no se evidenció en la CCD descartando presencia de arbutina en los dos extractos.

4.1.2.3. Ácidos hidroxámicos y fenoles:

Al agregar dos gotas de solución acuosa de tricloruro férrico ($FeCl_3$) al 1% al extracto acuoso e hidroalcohólico de *G. perennis* se observó una coloración negra (Fig. 26), indicativo de la presencia de polifenoles con tres oxidrilos (OH^+) adyacentes (Tolivia, 2014).



Figura 26. Reacción del extracto acuoso *G. perennis* con tricloruro férrico al 1%

4.1.2.4. Taninos:

No se encontraron taninos presentes, ya que el agregado del extracto acuoso de *G. perennis* a una solución de gelatina al 1% no llevó a la formación de ningún precipitado abundante. (Lock, 1994)

4.1.2.5. Flavonoides:

La detección de flavonoides se realizó por medio de la reacción de Shinoda, las reacciones de caracterización en papel y la técnica de cromatografía de capa delgada. (descritas en el apartado de materiales y métodos numeral 3.3.1.2 y 3.4 respectivamente)

4.1.2.5.1. Reacción de Shinoda:

La reacción de Shinoda, permite el reconocimiento de flavonoides, al poner en contacto ácido clorhídrico concentrado (HCl_C) con magnesio metálico (Mg) se genera hidrógeno nascente (H_2), el cual es capaz de reducir el flavonoide dando una coloración roja característica en fase amílca por formación de antocianidinas. Si en estas condiciones se observa la aparición de coloración rojiza, violeta o naranja, se considera positivo para compuestos con el núcleo de la γ -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles) (Markham, 1982). El extracto GphT presentó una coloración roja-parda en la parte fase amílca.

4.1.2.5.2. Reacciones de toque sobre papel:

Al poner en contacto los extractos GphT, GphMeOH y GphDCM de *G. perennis* con los siguientes reactivos se obtuvieron los cambios mostrados en la tabla 5.

Tabla 5. Reacción de toque sobre papel para los extractos hidroalcohólico (GphT), metanólico (GphMeOH) y diclorometano (GphDCM) de *G. perennis*

Reacción	GphT	GphMeOHt	GphDCM
FeCl_3	+	+	+
NaOH	+ (Amarilla al visible)	+ (Amarilla al visible)	+ (Amarilla al visible)
AlCl_3	+	+	+
H_3BO_3	+	+	+

El tricloruro de hierro dio color negro indicativo de la presencia de polifenoles con tres oxidrilos (OH) adyacentes. (Tolivia, 2014).

El color amarillo producido por los extractos de *G. perennis* con hidróxido de Sodio (NaOH) es indicativo de la presencia de flavonas, flavanoles e isoflavonas las cuáles forman estructuras resonantes de dicho color. (Lock, 1994)

El ácido bórico (H_3BO_3) por su parte en presencia de flavonas y flavonoles en medio alcalino forma quelatos con dos hidroxilos fenólicos en posición relativa en orto, así como para flavonoides con un grupo carbonilo en 4 y un oxidrilo en posición 5 presentando color amarillo con fluorescencia verde, el cuál se evidenció en los extractos. El Cloruro de aluminio ($AlCl_3$) forma complejos o lacas de intensa fluorescencia a la luz de Wood, con hidroxilos en posición orto hidroxil-cetonas vecinos, los primeros son labiles ante el aregado de HCl, mientras los últimos son estables, se produjo la formación de dichas lacas observando fluorescencia con los extractos. (Domínguez, 1973)

4.1.2.5.3. Cromatografía de capa delgada (CCD) para flavonoides:

Se realizó CCD sobre cromatofolios de gel de sílice 60 F254 de Merck® de los extractos hidroalcohólico (GphT), metanólico total (GphMeOHt) y metanólico obtenido con solventes de polaridad de *G. perennis* (GphMeOH) utilizando la fase móvil (Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua 100: 11: 11: 26) en presencia de soluciones de referencia de rutina, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, isoquercetina y vitexina en metanol. Se observó a luz UV 365 nm, después del revelado con RPN.

Tabla 6. *Cromatografía de capa delgada para flavonoides.*

Extracto	Cromatografía en capa delgada (CCD)	
	Detección	Resultado
GphT	Con el reactivo de productos naturales (RPN) se presenta una intensa fluorescencia UV 365nm, el color dependerá de la estructura:	Naranja fluorescente ($R_f \sim 0.1$ y 0.28) Naranja ($R_f \sim 0.22$) Celeste clara ($R_f \sim 0.15$ Y 0.25) Amarilla ($R_f \sim 0.34$ y 0.42) Amarilla clara ($R_f \sim 0.6, 0.64, 0.75$ Y 0.9)
GphMeOHt	Flavonoles Glicósidos de quercetina y miricetina Kaempferol, isoramnetina y sus Glicósidos	Amarillas naranjas. Amarillo verdoso.
GphMeOH	Flavonas Luteolina y sus Glicósidos Apigenina y sus Glicósidos	Naranja Amarillo verdoso
		Naranja fluorescente ($R_f \sim 0.1$ y 0.28) celeste clara ($R_f \sim 0.15$ Y 0.25) Amarilla ($R_f \sim 0.34$ y 0.42) Amarilla clara ($R_f \sim 0.6, 0.64, 0.75$) Amarillas ($R_f \sim 0,25, 0,37, 0.54$ y $0,62$)

CCD: Revelador: Reactivo de Productos Naturales (RPN), Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100: 11: 11: 26). Sustancias de referencia: rutina ($R_f \sim 0.4$), ácido clorogénico ($R_f \sim 0.45$), ácido isoclorogénico ($R_f \sim 0.8$), isoquercetina (en el rango de $R_f \sim 0.6 - 0.7$) y vitexina ($R_f \sim 0.7$),

De acuerdo a los resultados de las CCD mostrados en la tabla 6 se podría suponer la presencia de Glicósidos de flavonoles,

4.1.2.6. Alcaloides:

La detección de alcaloides se llevo a cabo por medio de las reacciones generales y la técnica de cromatografía en capa delgada (descritas en el numeral 3.3.1.6 y 3.4 del apartado de Materiales y métodos respectivamente)

4.1.2.6.1. Reacciones generales de coloración y precipitación para alcaloides:

En los extractos metanólico total (GphMeOHt) e hidroalcohólico (GphT) se evidenciaron la formación de precipitados con los siguientes reactivos generales de alcaloides:

1. Bouchardat: (+) precipitado floculento marrón, naranja que cambia con el tiempo.
2. Ácido tánico: (+) precipitado naranja oscuro.
3. Mayer: (+) precipitado blanco amarillento.
4. Ácido pícrico: (+) Precipitado amarillo.
5. Dragendorff: (+) precipitado naranja.
6. Blanco



Figura 27. Reacciones de caracterización de alcaloides con Extracto metanólico total (a) e hidroalcohólico (b) de *G. perennis*.

4.1.2.6.2. Cromatografía de capa delgada (CCD) para alcaloides:

Se realizó CCD sobre cromatofolios de gel de sílice 60 F254 de Merck® de los extractos 2 (preparado como se describió anteriormente en el numeral 3.2.4 de materiales y métodos) e hidroalcohólico (GphT) tratado con 1 ml de solución de amoníaco al 10%; utilizando como fase móvil: el sistema de solventes 2 (Tolueno:

Acetato de etilo: dietilamina 70:20:10) en presencia de las soluciones de referencia atropina, reserpina y papaverina disueltas en metanol. Se observó a luz UV 254nm y 365nm así como al visible, después del revelado con Reactivo de Dragendorff y posterior agregado de ácido sulfúrico etanólico al 10%.

En el sistema 2 posterior al revelado, el extracto 2 y GphT presentaron una banda en un $R_f \sim 0.09$ naranja oscura, ubicada por debajo de atropina (banda marrón-violeta $R_f \sim 0.3$), reserpina (banda naranja clara $R_f \sim 0.45$) y papaverina (banda naranja intensa $R_f \sim 0.6$) (Fig. 28)

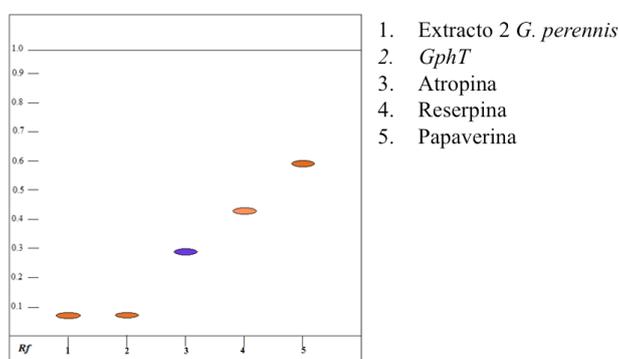


Figura 28. CCD: Revelador: Reactivo de Dragendorff y posterior agregado de ácido sulfúrico etanólico al 10%. Fase móvil: Tolueno: Acetato de etilo: dietilamina (70:20:10). Sustancias de referencia: Atropina ($R_f \sim 0.3$), reserpina ($R_f \sim 0.45$), papaverina ($R_f \sim 0.6$)

Tabla 7: Cromatografía de capa delgada Alcaloides con fase móvil Tolueno: Acetato de etilo: dietilamina (70:20:10).

Extracto	Cromatografía en capa delgada (CCD)	
	Detección	Resultado
GphT	Luz UV 254nm	Tres sustancias ($R_f \sim 0.04, 0.09$ y 0.77)
	Luz UV 365nm: Zonas con fluorescencia azul, verde o violeta.	Azul clara ($R_f \sim 0.09$)
	Revelado Dragendorff: Zona naranja-marrón al visible	Naranja - marrón ($R_f \sim 0.09$)
GphMeOHt	Luz UV 254nm	Seis sustancias ($R_f \sim 0.09, 0.44, 0.55, 0.66,$

		0.84 y 0.93)
	Luz UV 365nm: Zonas con fluorescencia azul, verde o violeta.	Azul clara ($R_f \sim 0.09$)
	Revelado Dragendorff: Zona naranja-marrón al visible	Naranja - marrón ($R_f \sim 0.09$)

La CCD evidenció la posible presencia de alcaloides en los dos extractos; que coinciden con los resultados positivos de las reacciones generales para alcaloides.

4.1.2.7. Esteroides:

En la reacción de Lieberman-Burchard con GphDCM se observó una coloración verde al minuto (Fig. 29a) que se mantuvo después de los 30 minutos (Fig. 29b). Evidenciando la posible presencia de geninas espirotánicas (Azul-verde) (Bruneton, 1995).

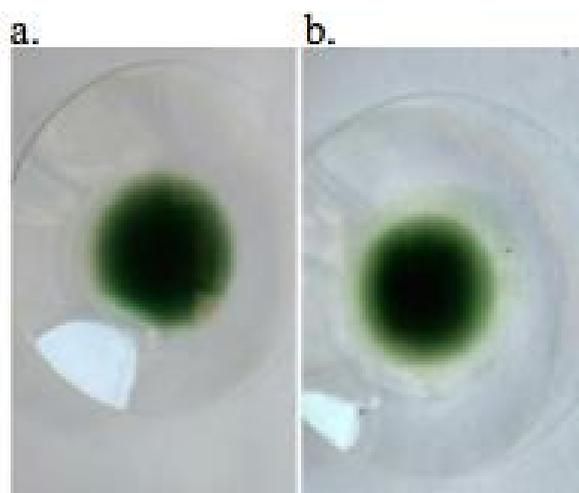


Figura 29. Reacción de Lieberman Burchard con el extracto DCM de *G. perennis*. Coloración después de un minuto (a) y coloración pasados treinta minutos (b).

4.1.2.8. Saponinas:

Para determinar la presencia de saponinas se llevo a cabo las reacciones de caracterización y la técnica de cromatografía en capa delgada (descritas en el numeral 3.3.1.3 y 3.4 del apartado de Materiales y métodos respectivamente)

4.1.2.8.1. Reacciones de caracterización para saponinas:

Tabla 8: Reacciones de caracterización de saponinas en el extracto acuoso de *G. perennis*.

Capacidad afrógena	Se evidenció la formación de espuma persistente después de 30 minutos y estable ante el agregado de HCl diluido.
Poder emulgente	Se formo una emulsión inestable en el tiempo.
Hidróxido de calcio Ca(OH)_2	Formación de precipitado.
Subacetato de plomo $\text{Pb(CH}_3\text{COO)}_2 \cdot \text{Pb(OH)}_2$	
Reacción de Fehling indirecta	Positivo rojo.

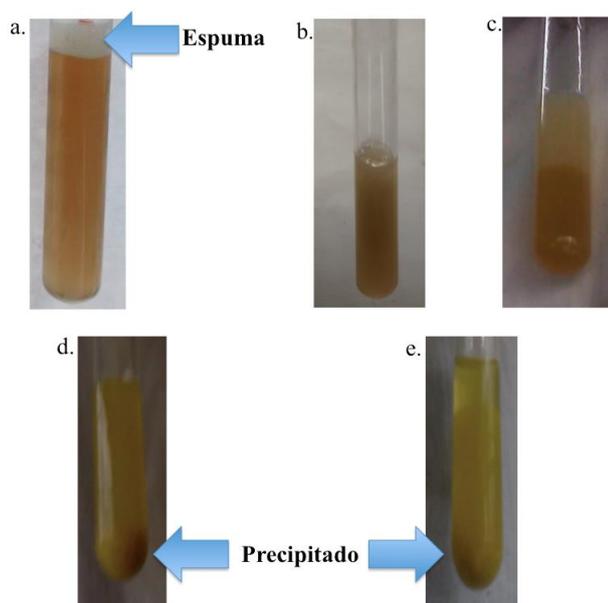


Figura 30. Reacciones de caracterización de saponinas en el extracto acuoso de *G. perennis*: capacidad afrógena (a), Poder emulgente (b y c), Ca(OH)_2 (d), $\text{Pb(CH}_3\text{COO)}_2 \cdot \text{Pb(OH)}_2$ (e)

4.1.2.8.2. Cromatografía de capa delgada (CCD) para saponinas:

Para la caracterización de saponinas se llevó a cabo una CCD sobre cromatofolios de gel de sílice 60 F254 de Merck® del extracto 3 (preparado como se describió anteriormente en el numeral 3.2.5 de materiales y métodos) e hidroalcohólico (GphT) con fase móvil: Cloroformo, Ácido acético glacial, Metanol, Agua (64:32:12:8), utilizando como sustancia de referencia de Escina, se observó al visible después del revelado con AS (Anisaldéhidro Sulfúrico). La disposición de los extractos y sustancias de referencia en la placa cromatográfica se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Esquema de la CCD para saponinas presentes el extracto hidroalcohólico (GphT) y en la fase butanólico del extracto metanólico (Extracto 3) de *G. perennis*.

Solución estándar	Fase butanólica extracto metanólico (Extracto 3)	Extracto hidroalcohólico (GphT)
Saponina: Banda pardo al visible Rf aproximadamente en 0.2.	Banda azul violácea tenue Rf aproximadamente en 0.2.	Banda azul violácea tenue Rf aproximadamente en 0.2.
Escina: Banda azul violácea Rf aproximadamente en 0,35		
	Banda azul violácea tenue Rf aproximadamente en 0,7	Banda azul violácea tenue Rf aproximadamente en 0.7

La CCD evidenció la posible presencia de saponinas en los dos extractos; que coinciden con los resultados positivos de las reacciones de detección para saponinas.

4.1.2.9. Glicósidos cardiotónicos:

El extracto 4 (preparado como se describió anteriormente en el numeral 3.2.6 de materiales y métodos) se sembró junto con la solución de referencia de estrofantina, usando la fase móvil 1 (Acetato de etilo: metanol: agua 81: 11: 8). Sin tratamiento químico en luz UV 254nm se observa fluorescencia muy débil de todos los glicósidos

cardiacos mientras que con luz UV 365nm no se observa en lo absoluto fluorescencia. Después del revelado con tricloruro de antimonio (SbCl_3) y posterior calentamiento a 100°C por 8-10min, se observan cambios en la respuesta de fluorescencia si se deja reposar la placa pulverizada durante un tiempo más largo. En el visible, las zonas aparecen principalmente grises, violeta o marrón. (Wagner y Bladt, 1996) En la tabla 10 se describen los resultados de la CCD para glicósidos cardiacos.

Tabla 10: Cromatografía de capa delgada para cardiotónicos en *G. perennis*.

	Revelado			
	UV 254nm	UV 365nm	SbCl_3	
			UV365nm	Visible
Extracto 4	$R_f \sim 0.29$	No se observa fluorescencia en ninguna de las bandas.	Azul	
	$R_f \sim 0.39$		Amarillo claro	
	$R_f \sim 0.48$		Amarillo	Amarillo-naranja
	$R_f \sim 0.68$		-	Marrón pálido
	$R_f \sim 0.74$		-	Rosa
	$R_f \sim 0.82$		Amarillo	Marrón pálido
	$R_f \sim 0.87$		-	Rosa
Digitoxina	$R_f \sim 0.63$		Azul	Violácea
Estrofantina	$R_f \sim 0.12$		Celeste tenue	Rosa

CCD: Revelador: Tricloruro de antimonio (SbCl_3) y posterior calentamiento a 100°C por 8-10min. Fase móvil: Tolueno: Acetato de etilo: metanol: agua (81: 11: 8).

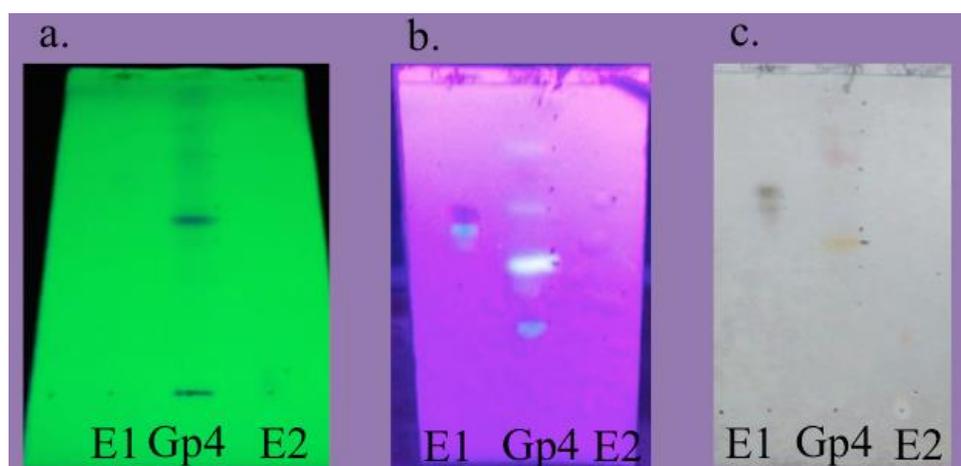


Figura 31. Cromatografía de capa delgada para cardiotónicos del extracto 4 de *G. perennis* (Gp4) usando como sustancias de referencia Digitoxina (E1) y Estrofantina (E2): Revelado al UV 254nm (a), con tricloruro de antimonio (SbCl_3) y posterior calentamiento a 100°C por 8-10min observando al UV 365nm (b) y al visible (c).

Como se muestra en la figura 31 se observaron bandas del mismo color que las sustancias de referencia posterior al revelado con SbCl_3 en luz UV365nm (azul) y al visible (rosa).

4.1.2.10. Terpenos:

El extracto GphDCM (obtenido por extracción con solvente de polaridad creciente como se describió en el numeral 3.2.9 de materiales y métodos) se sembró junto con las soluciones de referencia de ácido ursólico y oleanólico disueltos en DCM, utilizando como las fases móviles 5 (DCM: metanol 95: 5) y 6 (Tolueno: Acetato de etilo 80: 20). Se observó al visible después del revelado con AS.

En la fase móvil 5, el extracto GphDCM evidenció dos bandas azules violáceo en un $R_f \sim 0.16$ y 0.20 respectivamente, seguidas de dos bandas marrones en un $R_f \sim 0.27$ y 0.32 justo por debajo de la banda azul violáceo del ácido oleanolico en un $R_f \sim 0.34$. Después se pudieron observar una banda azul violáceo en un $R_f \sim 0.54$ por debajo de la banda azul violácea de ácido ursólico en un $R_f \sim 0.6$, por encima de esta se observó una banda roja en un $R_f \sim 0.72$.

Mientras que en la fase móvil 6, el extracto GphDCM evidenció dos bandas azules violáceo al visible en un $R_f \sim 0.11$ y 0.22 , justo por debajo del la banda azul violáceo del ácido oleanolico en un $R_f \sim 0.29$ y la banda azul violáceo de ácido ursólico en un $R_f \sim 0.45$. Por encima se observaron en GphDCM tres bandas azules violáceo en $R_f \sim 0.56$, 0.79 y 0.9 .

Si bien se observaron bandas del mismo color que las sustancias de referencia posterior al revelado con AS no se puede confirmar correspondencias con las mismas.

4.1.2.11. Cumarinas:

Se llevó a cabo CCD para los extractos GphDCM (obtenido por extracción con solvente de polaridad creciente como se describió en el numeral 3.2.9 de materiales y métodos) y 5 (preparado como se describió anteriormente en el numeral 3.2.7 de materiales y métodos), usando como sustancia de referencia escopoletina. Se usó la fase móvil 7 (Éter etílico-tolueno 1:1; saturado con ácido acético 10%) y se observó a luz UV 365nm antes y después del revelado con KOH etanólico al 10%.

La solución de referencia de escopoletina evidenció una banda azul que se ubico en un $R_f \sim 0.25$, mientras que en los extractos 5 y GphDCM no evidenciaron zonas de fluorescencia intensa azul o verde-azulado propias de cumarinas simples, ni zonas de fluorescencia amarilla, marrón, azul o verde azulada para furano y piranocumarinas (Wagner y Bladt, 1996). Después del revelado con KOH etanólico al 10% fue intensificada la fluorescencia de la solución de referencia de escopoletina, sin embargo en los extractos no se evidenciaron cambios en las bandas, lo que permite suponer la ausencia de cumarinas en *G. perennis*.

4.1.2.12. Aceites esenciales:

El método de micro destilación al vapor da una indicación preliminar de la composición del aceite esencial. (Wagner y Bladt, 1996), sin embargo para *G. perennis* no fue posible obtener esencia por este método, así que las CCD se llevaron a cabo con el extracto GphDCM (obtenido por extracción con solvente de polaridad creciente como se describió en el numeral 3.2.9 de materiales y métodos) usando como soluciones de referencia de citral, carvona y timol preparadas en tolueno. Como fase móvil se uso el sistema de solventes B (Tolueno-acetato de etilo 93:7), se observó al visible después del revelado con VS (Vainillin-sulfúrico).

GphDCM presentó dos banda violácea en un $R_f \sim 0.20$ y 0.24 , una banda rosa en un $R_f \sim 0.22$ justo por debajo de la banda azul-violeta del citral ($R_f \sim 0.42$) y la banda roja de carvona ($R_f \sim 0.46$). Inmediatamente después se evidenció una banda celeste en un $R_f \sim 0.58$ por debajo de la banda roja-violeta de timol ($R_f \sim 0.6$). La coloración de las bandas observadas en el extracto coinciden con la coloración de terpenos.

4.1.3. Determinación de los perfiles cromatográficos:

Los perfiles cromatográficos en capa delgada se realizaron para el extracto polar metanólico (GphMeOH) y para el extracto no polar (GphDCM) de *G. perennis*, en las fases móviles polares y no polares respectivamente.

4.1.3.1. Perfil cromatográfico del extracto metanólico total *G. perennis* (GphMeOHt)

Las CCD para describir el perfil de GphMeOHt se realizó en la fase móvil 3 (Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua 100: 11: 11: 26) con la cuál se evidenciaban la mayor cantidad de bandas. Se usaron como sustancias de referencia Isoquercetina, Rutina, Ácido cafeico, Ácido clorogénico, Ácido isoclorogénico y Vitexina. Se observó a luz UV 365 nm, después del revelado con RPN.

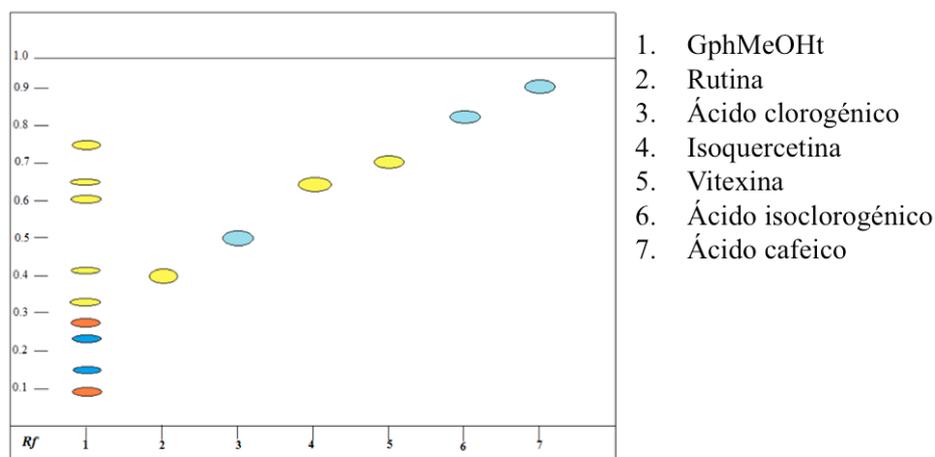


Figura 32. Perfil cromatográfico del extracto de GphMeOHt.

GphMeOHt evidenció dos bandas naranja fluorescente en un $R_f \sim 0.1$ y 0.28 ; así como dos bandas celeste claras en un $R_f \sim 0.15$ y 0.25 ; todas las bandas anteriores por debajo de la banda amarilla fluorescente de rutina ($R_f \sim 0.4$). A continuación se presentaron dos bandas amarillas en un $R_f \sim 0,34$ y $0,42$ respectivamente, por debajo de la banda celeste fluorescente de ácido clorogénico ($R_f \sim 0.45$). Seguidamente se presentaron dos bandas amarilla claras en un $R_f \sim 0,6$ y $0,64$ por debajo de la banda amarilla fluorescente de Isoquercetina (en el rango de $R_f \ 0.6 - 0.7$). y de la banda amarilla de Vitexina ($R_f \sim 0,7$). Por encima de estas últimas y por debajo de la banda celeste fluorescente de ácido isoclorogénico ($R_f \sim 0.8$) y ácido cafeico ($R_f \sim 0,9$) se visualizó una banda amarilla clara en un $R_f \sim 0.75$. (Fig. 32)

El extracto hidroalcohólico (GphT) presentó el mismo perfil que el metanólico (GphMeOH), con algunas bandas de menor intensidad.

4.1.3.2. Perfil cromatográfico del extracto DCM *G. perennis* (GphDCM)

Las CCD para describir el perfil de GphDCM se realizaron en la fase móvil (Tolueno-acetato de etilo 70:30), en presencia de quercetina y carvona como sustancia de referencia. Se observó al visible después del revelado con VS.

En GphDCM se percibieron dos banda amarillas tenue $R_f \sim 0.22$ y 0.29 , una banda rosa en $R_f \sim 0.47$, una banda violácea en un $R_f \sim 0.61$ y una banda amarilla en $R_f \sim 0.64$ una banda violácea en $R_f \sim 0.71$ y dos bandas amarillas en un $R_f \sim 0.75$ y 0.8 justo por encima de la banda amarilla de quercetina ($R_f \sim 0.1$) y por debajo de la banda roja de carvona ($R_f \sim 0.74$). Por encima de la carvona se evidenció una banda amarilla en un $R_f \sim 0.87$. (Fig. 33)

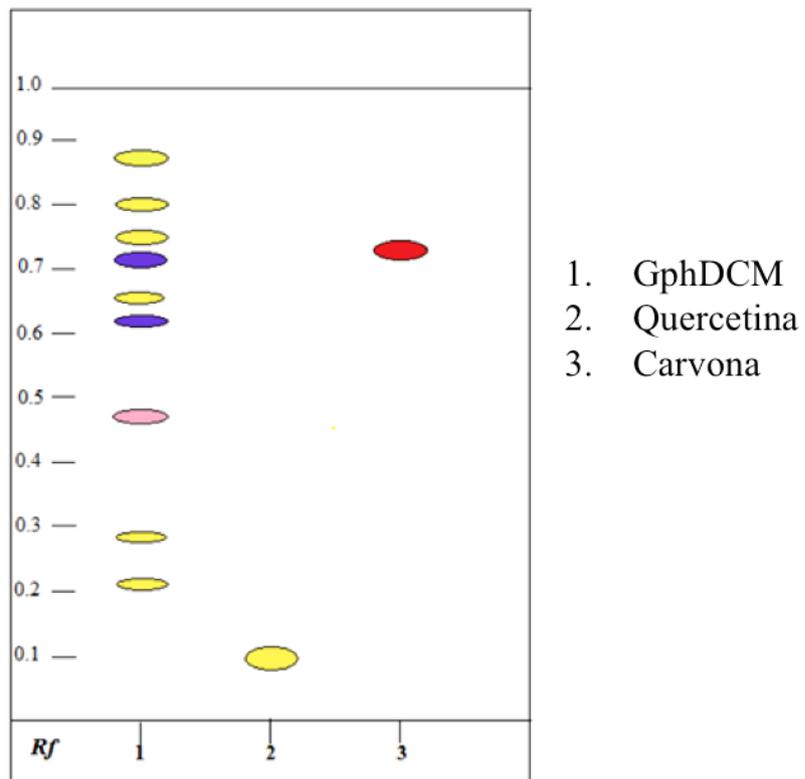


Figura 33. Perfil cromatográfico del extracto de GphDCM.

4.1.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución con detección de absorción ultravioleta (HPLC-UV)

En los extractos analizados por HPLC, realizado en las condiciones descritas en el apartado 3.5 de materiales y métodos, se obtuvo el perfil cromatográfico correspondiente a los mismos. Para los extractos GphT y GphMeOHt se evidencian tres picos en un tiempo de retención (Tr) de 13, 26 y 42 minutos respectivamente (Fig. 34 y 35), los cuales no se correspondieron con las sustancias de referencia del estándar triple ácido cafeico (Tr: 11), rutina (Tr: 17) e isoquercetina (Tr: 23) (Fig. 36).

En el espectro de absorción UV (Fig. 34 y 35) correspondiente a los tres de los picos observados en el cromatograma en HPLC, se evidenciaron dos bandas dentro del rango 240nm-280nm para BII y 330nm-350nm para BI, valores que se aproximan al rango correspondiente para flavonoles: BII (250-280nm) y BI (330-360nm) que indicaría la presencia de 3-OH sustituidos o BII (250-280nm) y BI (350-385nm) 3-OH libres. (Markham, 1982)

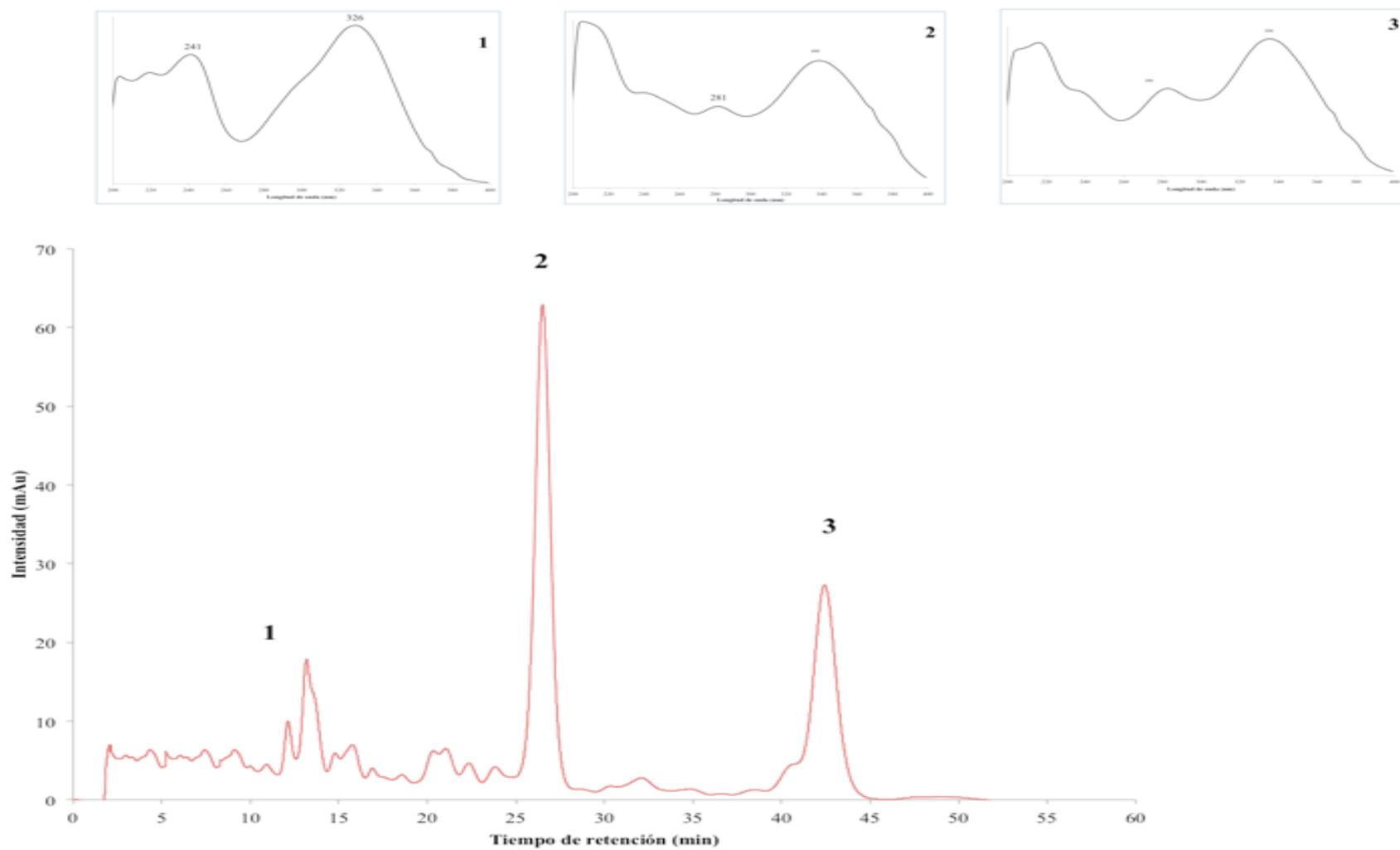


Figura 34. Análisis por HPLC-UV del extracto hidroalcohólico de *G. perennis* (GphT)

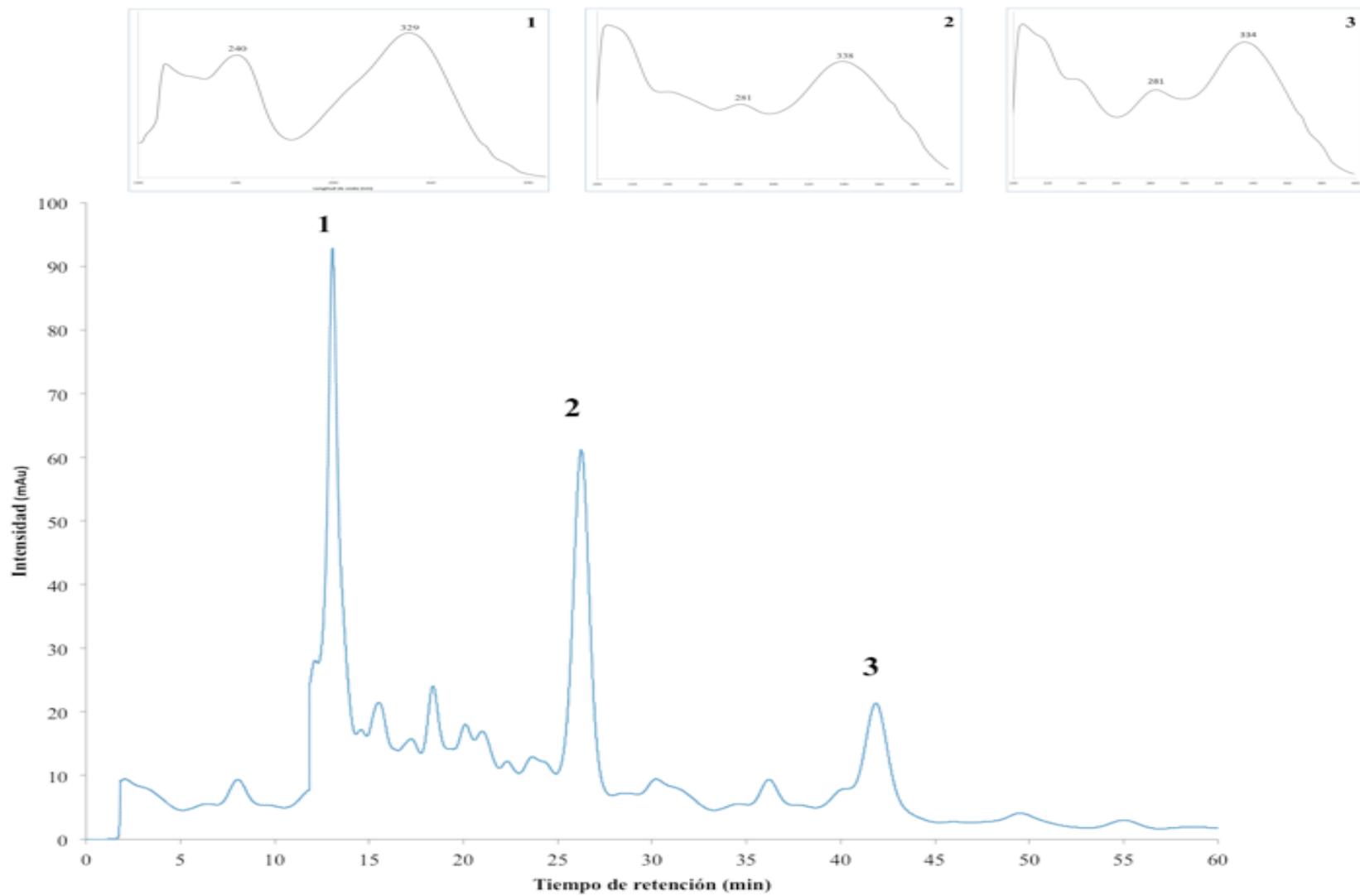


Figura 35. Análisis por HPLC-UV del extracto metanólico de G. perennis (GphMeOHt)

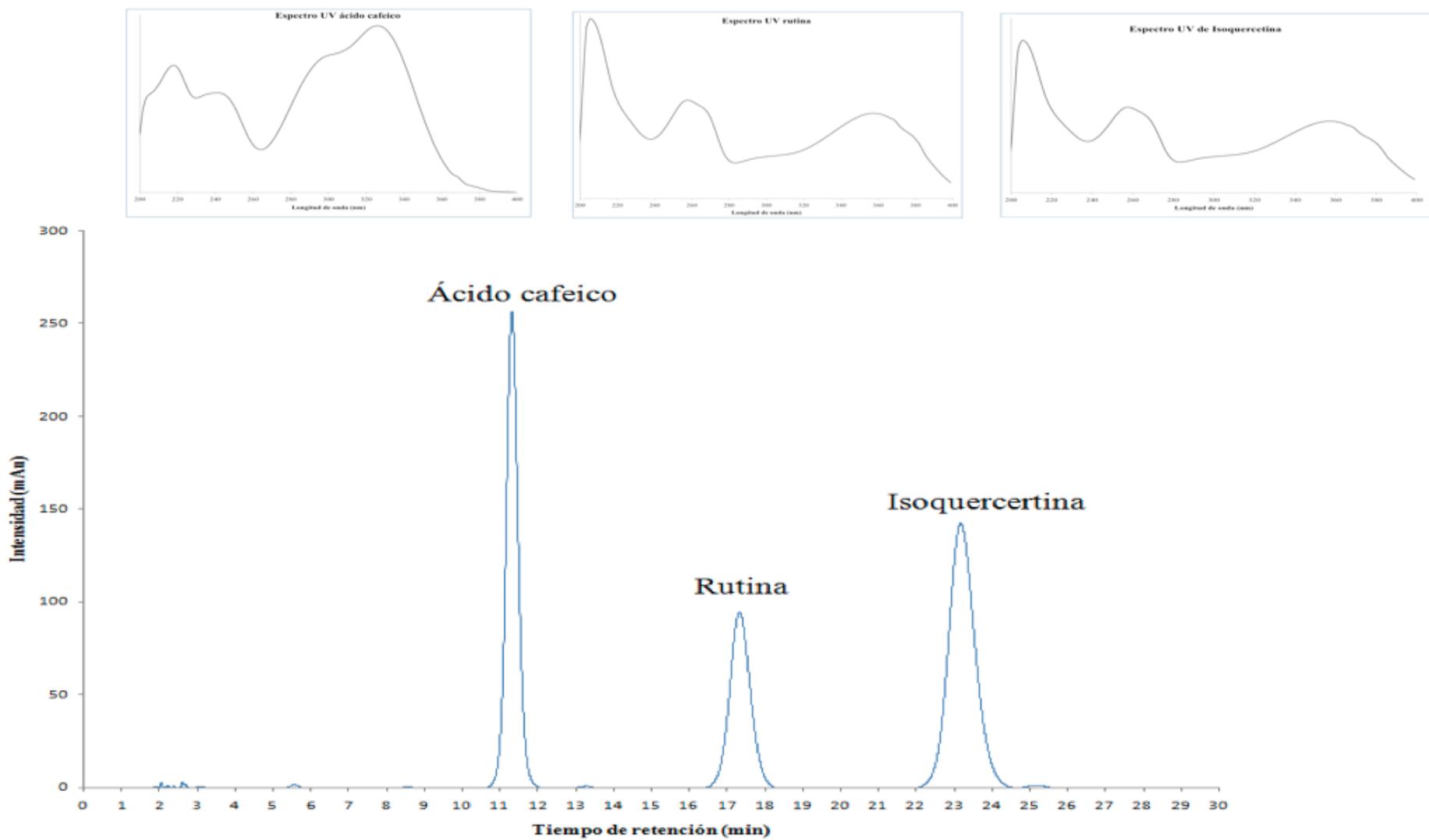


Figura 36. Cromatograma HPLC-UV del estándar triple con ácido cafeico (Tr: 11), rutina (Tr: 17) e isoquercetina (Tr: 23)

4.2. Cuantificación de la actividad antioxidante total

Se midió la actividad antioxidante total de los extractos GphDCM, GphAcEt y GphMeOH de *G. perennis* cuantificando la actividad atrapadora ABTS^{•+} y el poder reductor mediante el método de Folin, expresado como contenido de fenoles totales (Ver secciones 3.6 y 3.7 en Materiales y Métodos)

EL extracto metanólico GphMeOH de *G perennis* mostro mayor actividad atrapadora del radical ABTS^{•+} y reductora de reactivo de Folin en comparación con los extractos de GphDCM y GphAcEt, estos últimos no mostraron diferencias entre si. (Tabla 11)

Tabla 11. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante total los extractos diclorometano, acetato de etilo y metanólico de *G perennis*

	Fenoles totales*	ABTS ^{•+} *
GphDCM	12	50
GphAcEt	15	53
GphMeOH	24	134

*Los resultados son expresados en $\mu\text{g EQ de ácido cafeico / g extracto}$

4.2.1. Análisis por cromatografía en capa fina: revelado con DPPH•

Las Figuras 37 y 38 muestran los resultados de la aplicación de CCD de los extractos de GphDCM y GphMeOH de *G. perennis* respectivamente. Este análisis se realizó con el fin de caracterizar compuestos fenólicos, en especial flavonoles y derivados cafeoilquínicos, que se revelaron por su capacidad de decolorar DPPH•. Se observa que el extracto GphDCM exhibe dos bandas Rf ~0,05 y 0,40. La banda (Rf ~0,40) se encuentra comprendida en el rango de las referencias Kaempferol (Rf ~0,38) y Quercetina.(Rf ~ 0,21), sin embargo no existen correspondencia con estos compuestos.

El extracto metanólico (GphMeOHt) mostro un serie de compuetos con actividad antioxidante en el rango de Rf ~0,27 - 0,9, tampoco se puede confirmar

correspondencias con las referencia ensayadas Rutina (Rf ~0,4), Ácido clorogénico (Rf ~0,45) Isoquercetina (Rf ~0,6)

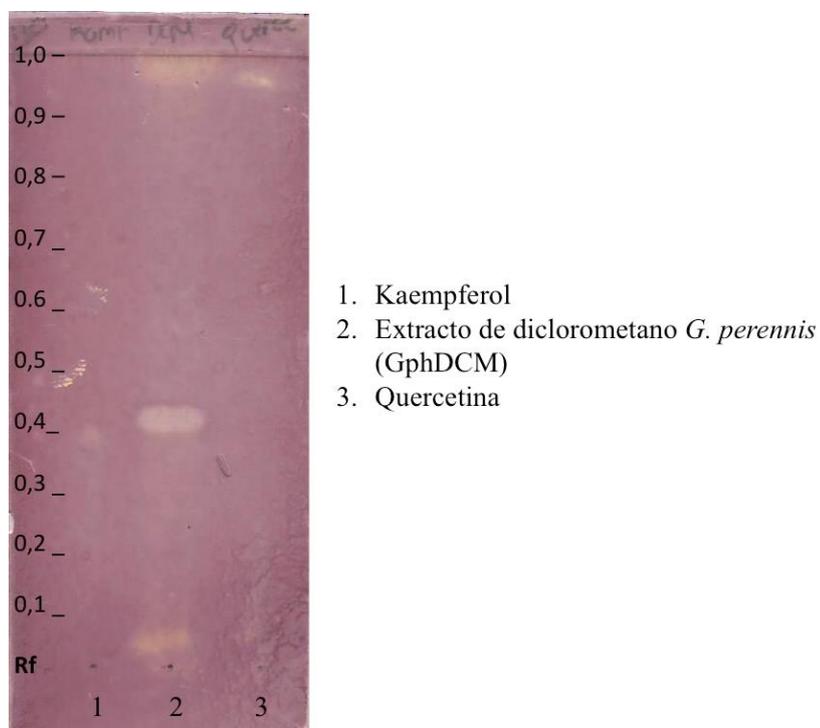


Figura 37. Cromatografía en capa delgada de GphDCM: revelado con radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH')

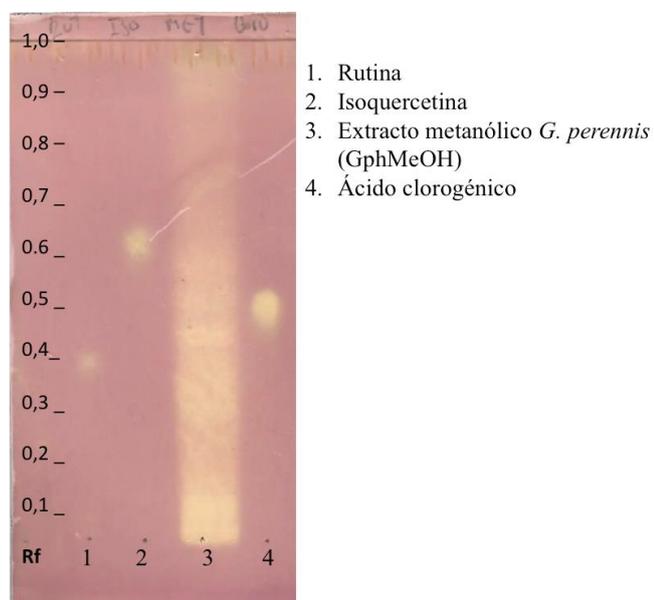


Figura 38. Cromatografía en capa delgada: revelado con radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH')

4.3. Estudios farmacológicos

4.3.1. Estudio de la actividad antiespasmódica de GphT

4.3.1.1. Efectos de GphT sobre las Curvas Concentración Respuesta (CCR) de Carbacol (Cbl)

Para el estudio de los efectos gastrointestinales de la tintura de *G. perennis* (GphT) al 20% se realizaron curvas concentración respuesta (CCR) de carbacol (Cbl). GphT produjo una caída en el efecto máximo de la contracción inducida por Cbl lo que muestra una inhibición no competitiva en la CCR de carbacol (Cbl). Este efecto fue dependiente de la concentración en el rango de 0,1 a 2 mg/ml en cuba de GphT (pCE50: $6,2 \pm 0,1$) (Fig. 39a). La concentración inhibitoria 50 % (CI 50) de GphT fue de $0,07 \pm 0,02$ mg/ml, n = 7 (Fig. 39b). En la figura 39c se muestra un registro la inhibición del efecto de la CCR-Cbl en presencia de GphT 0,2 mg/ml comparado con la CCR control (en ausencia de GphT).

En todos los casos se realizó una CCR de Cbl en presencia de vehículo etanólico (n=7). No se encontró diferencias significativas en el porcentaje de efecto máximo de contracción para las curvas en presencia del vehículo en comparación con las curvas en ausencia del mismo.

Estos resultados obtenidos con la GphT en las CCR de Cbl se compararon con las CCR de acetilcolina (Ach) en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de verapamil (vpl, bloqueante de canales de Ca^{2+}) realizadas previamente por el Mgc. Marcos Blanco en nuestro laboratorio (Fig. 40). Se encontró que el comportamiento de GphT frente al agregado sucesivo y acumulativo de Cbl mostró un patrón similar al obtenido con Vpl en la CCR de Ach.

En base a estos resultados surge la hipótesis de que GphT podría ejercer su efecto antiespasmódico por actuar como inhibidor del influjo de Ca^{2+} en músculo liso gastrointestinal.

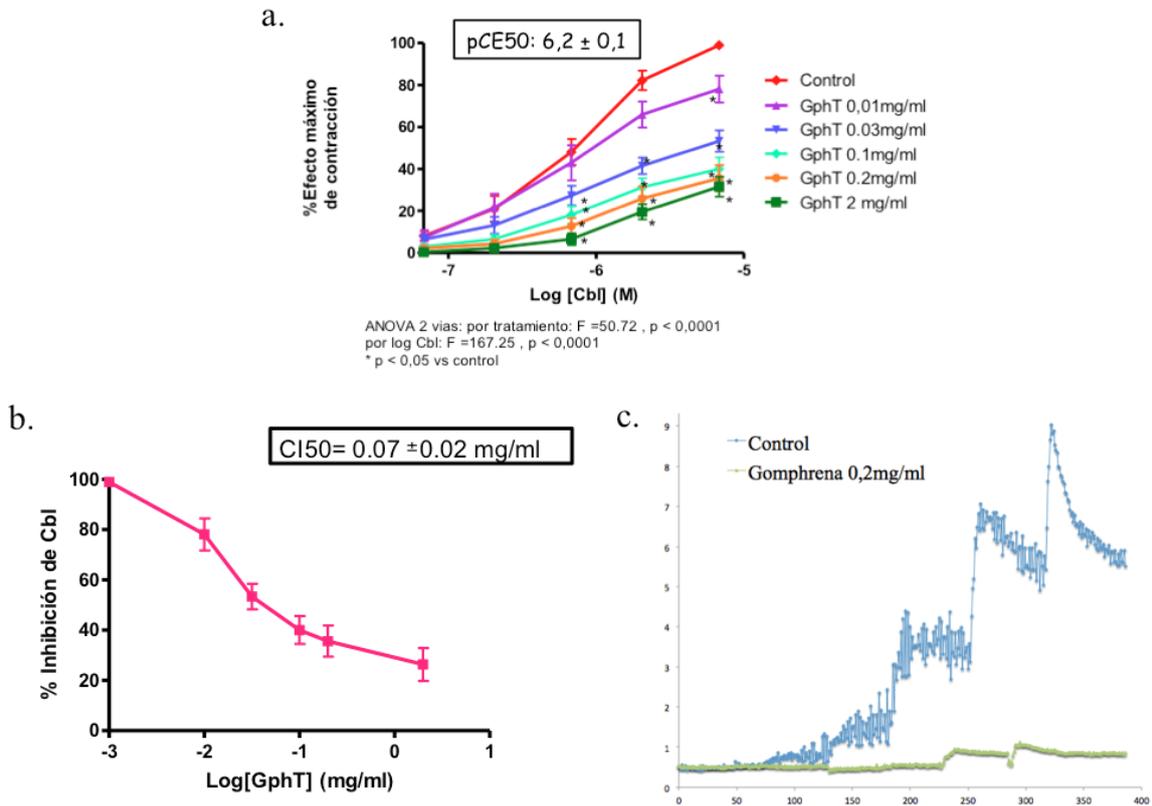


Figura 39. (a) Efectos del extracto de *G perennis* sobre la CCR de carbachol (Cbl) en ausencia y presencia de *GphT* ($n=7$) y (b) cálculo de la concentración inhibitoria 50% de la tintura de *G. perennis* ($CI50= 0,07 \pm 0,02$ mg/ml) frente a Cbl en el intestino de rata aislado.(c) Registro original de CCR de Cbl en ausencia y en presencia de 0,2mg/ml de *GphT*

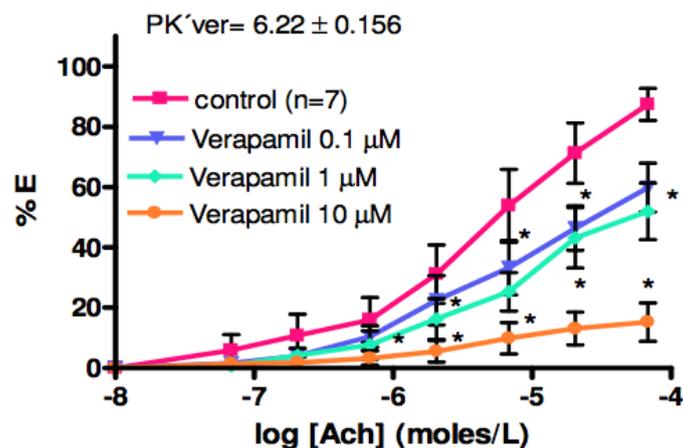


Figura 40. Curvas concentración-respuesta contráctil de acetilcolina (ACh) en ausencia (control) y presencia de verapamil en concentraciones únicas y crecientes (n=7) (Blanco y col., 2013)

4.3.1.2. Efectos de GphT sobre las Curvas Concentración Respuesta (CCR) de Calcio (Ca^{+2})

Para evaluar si los efectos de la tintura de *G. Perennis* (GphT) son debidos a la inhibición de canales de Ca^{+2} se ensayó su efecto sobre las CCR de Ca^{+2} (pCE50: $2,47 \pm 0,06$). La Fig. 41a muestra que *G. Perennis* inhibió no-competitivamente las CCR de Ca^{+2} , con una CI50 de $0,34 \pm 0,13$ mg/ml (n = 7), logrando la máxima inhibición a una concentración de 6 mg de parte aérea/ml en cuba. En la figura 41c se muestra un registro la inhibición del efecto de la CCR- Ca^{+2} en presencia de GphT 0,2 mg/ml comparado con la CCR control (en ausencia de GphT).

En todos los casos se realizó una CCR de Ca^{+2} en presencia de vehículo etanólico (n=7). No se encontró diferencias significativas en el porcentaje de efecto máximo de contracción obtenido para las curvas en presencia del vehículo comparado con las curvas en ausencia del mismo.

Estas curvas también se compararon con las CCR de Ca^{+2} en presencia de diferentes dosis de verapamil (vpl) encontrándose un patrón similar entre ambas curvas. (Fig. 42)

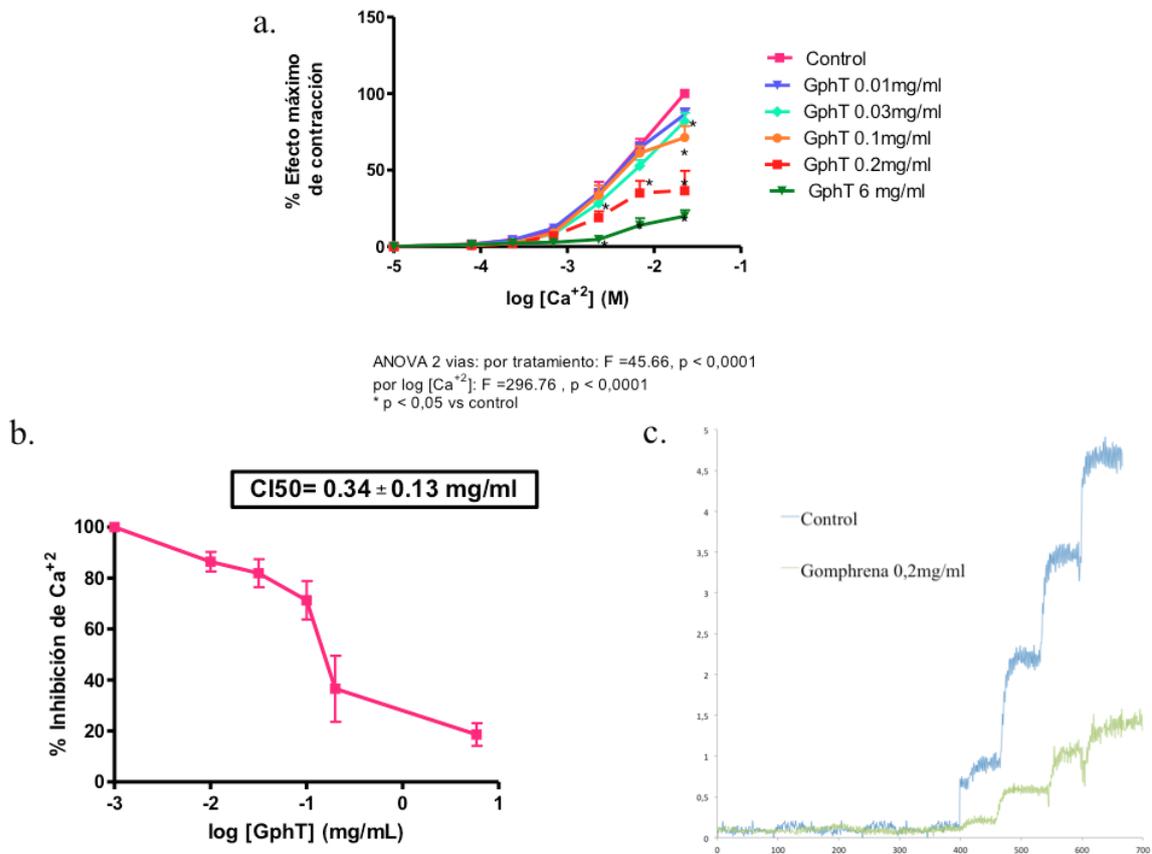


Figura 41. (a) Efectos del extracto de *G. perennis* sobre la CCR de calcio en ausencia y presencia de GphT (n=7). (b) Curva de inhibición y cálculo de la concentración inhibitoria 50% de la tintura de *G. perennis* (CI₅₀): 0,34 ± 0,13 mg/ml) frente a calcio en el intestino de rata aislado. (c) Registro original de CCR de Ca²⁺ en ausencia y en presencia de 0,2mg/ml de GphT

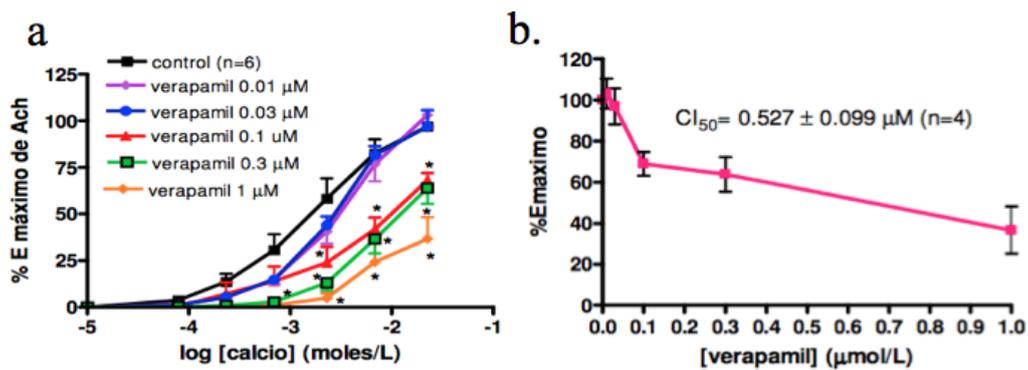


Figura 42. (a) CCR de calcio (Ca²⁺) en ausencia y presencia de verapamil. (b) Curva de inhibición para el cálculo de la CI₅₀ del verapamil (n=4) (Blanco y col., 2013)

4.3.2. Estudio de los efectos de la tintura de *Gomphrena perennis* (GphT) en corazones aislados de rata expuestos a un modelo de isquemia reperusión por atontamiento:

Cuando los corazones de rata perfundidos con una solución control Krebs-C a 37 °C y estimulados a una frecuencia constante de 3 Hz dentro de la cámara calorimétrica fueron sometidos a un período de 20 minutos de corte global de la perfusión (isquemia de no flujo, I) y luego reperfundidos durante 45 minutos con Krebs-C (restauración de flujo= reperusión= R), se manifestó una disfunción caracterizada por contractura diastólica, caída en la recuperación contráctil postisquémica y en la economía muscular total calculada como el cociente P/Ht (Ragone y col., 2015). Este modelo de atontamiento por I/R fue adoptado en esta tesis para el estudio de los efectos de distintas concentraciones de tintura de *G. perennis* (GphT) tanto por perfusión directa del tejido como por administración in vivo en el agua de bebida.

En la figura 43, se muestra un registro típico de la adquisición A/D del período de I/R en un corazón aislado de rata en que se registran continuamente las señales provenientes de la presión intraventricular (P, mmHg) y el flujo de calor liberado (Ht, mV), que fueron convertidos a valores absolutos utilizando los métodos de calibración descritos anteriormente (ver sección 3.8.3.3 en Materiales y Métodos).

Previo a la evaluación de los efectos cardioprotectores de GphT frente a la injuria por I/R, se estudió el efecto cardíaco de la perfusión directa de distintas dosis de la tintura de *G. perennis*.

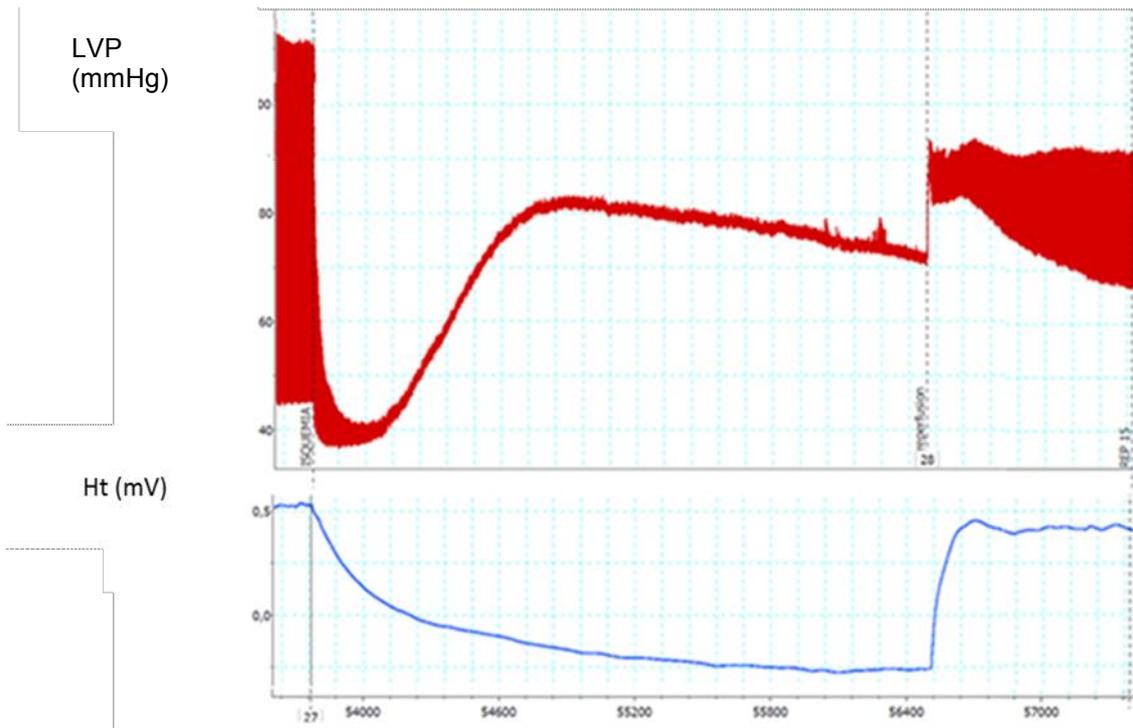


Figura 43. Registro experimental (adquisición digital) de las señales de *P* (LVP, parte superior) y *Ht* (parte inferior) del corazón de rata aislado expuesto a 20 min de isquemia por corte total de flujo y 45 minutos de reperfusion (se muestran sólo los primeros 15 minutos de R)

4.3.2.1. Efectos de la perfusión de tintura de *Gomphrena perennis* L (GphT) en corazones de rata

Para evaluar el efecto de la tintura de *G. perennis* (GphT) en la función contráctil y energética, los corazones perfundidos con solución Krebs-C mediante la técnica de Langerdoff, fueron perfundidos durante 15 minutos con la siguientes soluciones: vehículo etanólico (ver sección 3.8.2.1 en materiales y métodos), GphT 0,1%; 0,3 % y 0,5 % respectivamente.

Previo a los tratamientos, los ventrículos de rata utilizados en todos los protocolos desarrollaron un a máxima presión intraventricular en la contracción (*P*) de $70,7 \pm 20,1$ mm de Hg y un flujo de calor total liberado (*Ht*) de $12,3 \pm 3,2$ (n=6). La perfusión cardíaca directa durante 15 minutos de GphT mostró un leve efecto inotrópico positivo

previo a la isquemia tanto para las dosis de 0,1% como para la de 0,3% de tintura (P= n=6), sin embargo este efecto no resultó significativo estadísticamente. Ni el vehículo ni la perfusión con tintura de GphT 0,5% presentó cambios con respecto al control. En la figura 44 se muestran los valores de P como % del valor con Krebs-C (100%) a los 15 minutos de cada uno de los tratamientos. Ni el vehículo, ni las distintas concentraciones de GphT utilizadas produjeron cambios en el flujo de calor liberado.

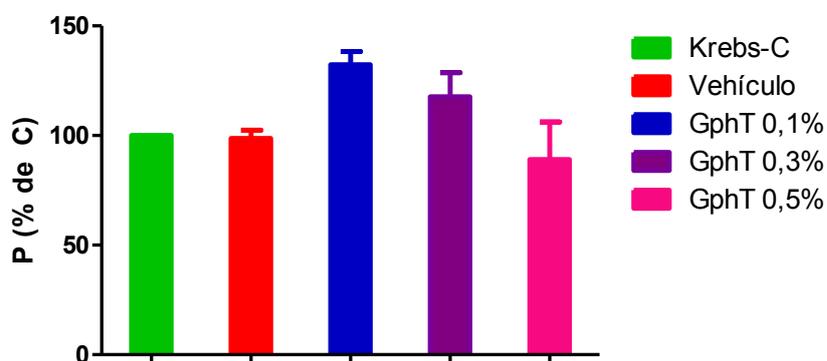


Figura 44: P (como % del control, Krebs-C) producido por la perfusión directa de tintura de *Gomphrena perennis* L. a dosis de 0,1, 0,3 y 0,5%. ANOVA de una vía: P=0.035, F=3.196. Test a posteriori: Dunnetts NS vs Krebs-C, n= 5.

4.3.2.2. Efectos de la perfusión de tintura de *Gomphrena perennis* (GphT) al 0,1% frente a la injuria por isquemia reperusión en corazones aislados de rata:

Un grupo de corazones sin pretratamiento fue expuesto a 20 minutos de isquemia y 45 minutos de reperusión. Durante la isquemia, el Ht se redujo hasta un valor de $2,6 \pm 0,7$ mW/g (desde $22,9 \pm 1,6$ mW/g del valor pre isquémico) mientras que la contractilidad desapareció a los 2 o 3 minutos a partir del corte de flujo. Además la presión diastólica de los corazones (LVEDP) cayó durante todo el período isquémico (Fig 46). Durante la reperusión, se obtuvo una recuperación contráctil de hasta $69,4 \pm 5,7$ % de la P preisquémica (P basal = $95,4 \pm 6,6$ mmHg) a los 45 minutos de R (Fig

45a). Simultáneamente, el Ht fue incrementando hasta un valor del $90,4 \pm 6,8$ % del valor pre-isquémico en R en comparación a su valor pre isquémico de $12,9 \pm 1,6$ mW/g (Fig 45b).

Para evaluar los efectos de la GphT 0,1% en la injuria isquémica en este modelo de I/R por atontamiento, se pretrató un grupo de corazones de rata durante 15 minutos con solución 0,1% de GphT y luego se expusieron a 20 minutos de isquemia global seguidos de 45 minutos de reperfusion como se describió previamente.

El pretratamiento con GphT 0,1% indujo un aumento no significativo de la contractilidad ($82,2 \pm 21,8$ vs $70,7 \pm 20,5$ mmHg en la condición Krebs-C, NS, n=5), sin cambio en el Ht ($11,3 \pm 3,2$ vs $12,3 \pm 3,2$ mW/g en Krebs-C, NS, n=5) (Fig 45 a y b). Durante la isquemia, GphT 0,1% no modificó ni el tono diastólico ni la caída en el Ht con respecto a los corazones sin pretratamiento (Fig 46).

Durante la reperfusion, la recuperacion contráctil post-isquémica de los corazones pretratados con GphT osciló entre un $22,8 \pm 13$ % de la P preisquémica (de $70,7 \pm 20,5$ mmHg, n=6) a los 5 minutos y un $41,8 \pm 11,7$ % de la P a los 45 minutos de R (Fig 45a). La recuperacion contráctil (%) resultó ser significativamente menor que la de los corazones sin pretratamiento con GphT. Además, durante la reperfusion se obtuvo una recuperacion del Ht desde $91,5 \pm 8,0$ % del Ht preisquémico ($12,3 \pm 3,2$ mW/g) a los 5 minutos hasta $95,5 \pm 8,1$ % del Ht a los 45 minutos de reperfusion (Fig 45b). Los cambios en el %Ht de los corazones pretratados con la tintura no fueron significativamente diferentes a aquellos obtenidos en corazones controles sin pretratamiento. De acuerdo con lo anterior, en aquellos corazones pretratados con GphT, la economia muscular total (P/Ht) cayó desde $10,8 \pm 5,0$ mmHg.g/mW en el pretratamiento hasta $3,1 \pm 2,0$ mmHg.g/mW a los 45 minutos de reperfusion ($31,6 \pm 8,0$

% del valor con Krebs-C) (Fig 44c). El tono diastólico fue significativamente mayor con GphT que en los corazones sin pretratamiento con la tintura durante todo el período de reperfusion (Fig 46).

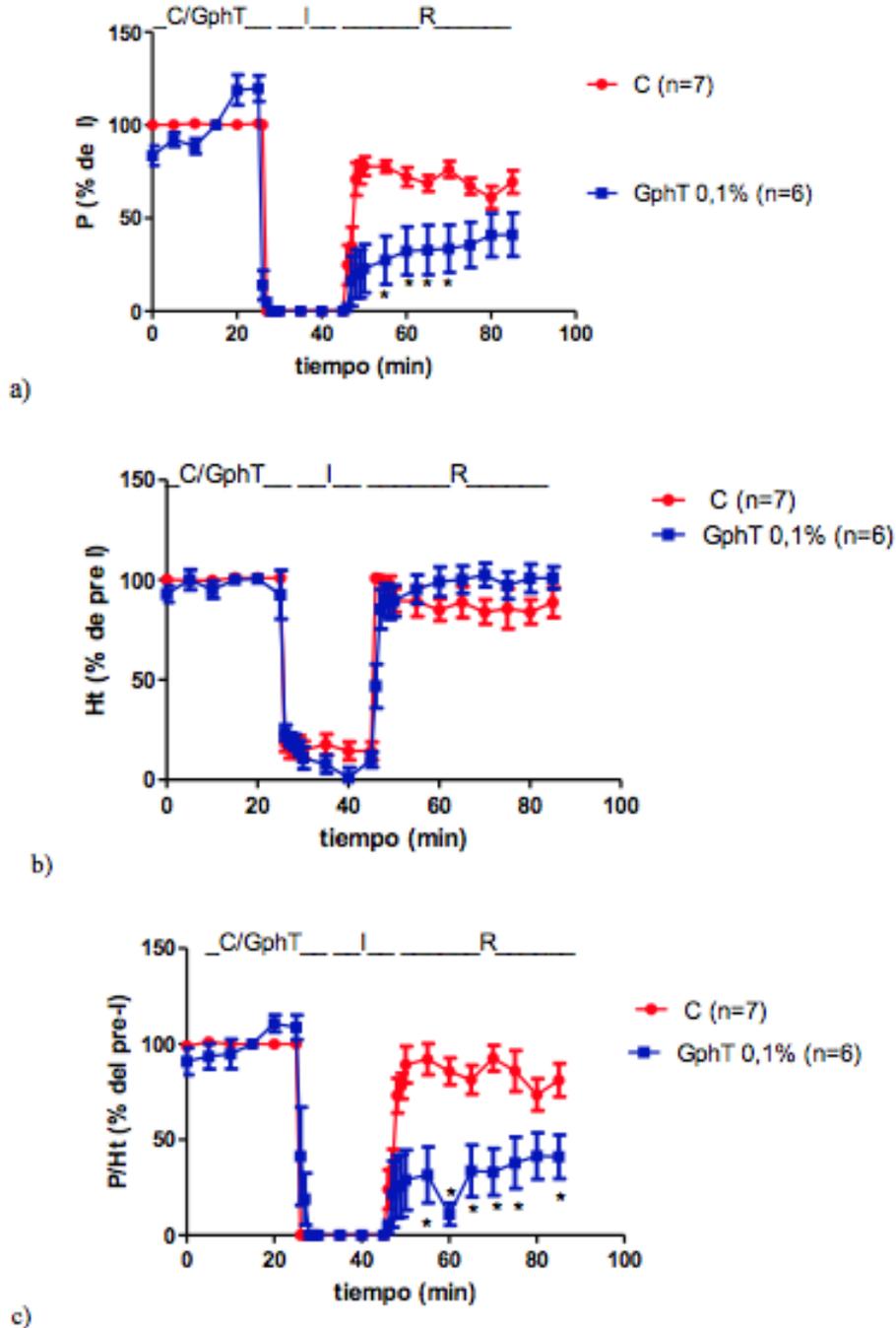


Figura 45: Recuperación porcentual de la presión desarrollada (P, % del valor pre I) (a); del calor liberado (Ht: % del valor pre I) (b) y de la Economía muscular total (P/Ht: % del valor pre I) en corazones de rata en ausencia (n=7) y en presencia de tintura de *Gomphrena perennis* (GphT) al 0,1% (n=6). El test de Bonferroni a posteriori del ANOVA mostrado en la tabla 12 dio *p< 0.05 vs C en (a) y en (c)

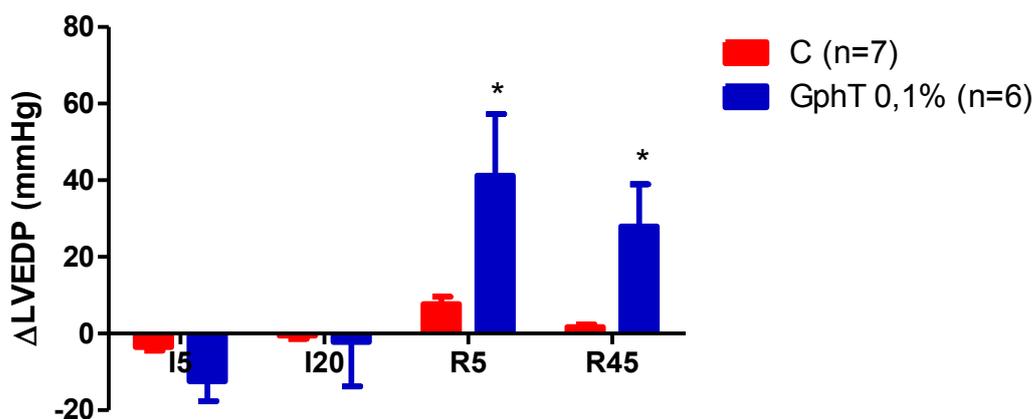


Figura 46: Cambios en la presión diastólica (Δ LVED, en mmHg) con respecto al valor preisquémico (Krebs-C) obtenidos al comienzo y al final de la isquemia (I) y de la reperfusión (R) para corazones de rata con y sin pretratamiento con tintura de *Gomphrena perennis* al 0,1%. * $p < 0,05$ vs cero (test t de Student)

Tabla 12: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías aplicados a los valores de %P, % Ht y % P/Ht en corazones de rata con y sin pretratamiento con tintura de *Gomphrena perennis* al 0,1%. Los test a posteriori para comparaciones pareadas son mostrados en la leyenda de la figura 44.

Variables ANOVA	del	%P	%Ht	%P/Ht
Tratamiento		F=120.53 DFn= 1 P<0,0001	F=0.83 DFn= 1 P=0.3628	F=65.94 DFn= 1 P<0,0001
Tiempo		F=61.55 DFn= 25 P<0,0001	F=87.73 DFn= 25 P<0,0001	F=38.76 DFn= 25 P<0,0001
Interacción		F=7.41 DFn= 25 P<0,0001	F=3.12 DFn= 25 P<0,0001	F=6.13 DFn= 25 P<0,0001
DF residual		286	286	286

4.3.2.3. Efectos de la administración oral de tintura de *Gomphrena perennis* L. (GphT) en corazones de ratas expuestos a un modelo de isquemia reperusión con atontamiento moderado:

Para evaluar los efectos de la administración oral de GphT, se les administró 2,35mg de planta seca/ml agua de bebida al día a un grupo de ratas Wistar (250-300 g de peso; n=4) durante 7 días. Al finalizar el tratamiento las ratas fueron sacrificadas y su corazón canulado mediante la técnica de Langerdoff y expuesto al modelo de I/R por atontamiento moderado (Ver Materiales y Métodos sección 3.8.3.4.3.)

Previo a la isquemia, los corazones de ratas tratadas con GphT no mostraron cambios significativos ni en la contractilidad (P basal= $107,44 \pm 10,3$ mmHg, n=4) ni en el Ht ($12,14 \pm 0,5$ mW/g, n=4) cuando fueron perfundidas con solución Krebs-C con respecto a los corazones control (P basal= $95,4 \pm 6,6$ mmHg; Ht= $12,9 \pm 1,6$ mW/g, n=7)

Durante la isquemia, GphT no modificó ni el tono diastólico ni la caída en el Ht con respecto a los corazones de las ratas sin tratamiento.

Durante la reperusión, la recuperación contráctil post-isquémica de los corazones de ratas tratadas con GphT alcanzó un $90,6 \pm 6,1$ % de la P preisquémica (de $107,4 \pm 10,3$ mmHg, n=4) a los 45 minutos de R, siendo este valor significativamente mayor que el obtenido en las ratas no tratadas ($69,4 \pm 5,7$ % de la P pre isquémica). Además, durante la reperusión se obtuvo una recuperación del Ht desde $94,7 \pm 2,4$ % del Ht preisquémico ($12,1 \pm 0,5$ mW/g) a los 5 minutos hasta $84,4 \pm 5,0$ % del Ht a los 45 minutos de reperusión. Estos valores no resultaron significativamente diferentes a los obtenidos en corazones de rata no tratadas. La economía muscular total (P/Ht) se recuperó al $90,6 \pm 6,1$ % del valor pre isquémico (P/Ht basal= $8,8 \pm 0,6$ mmHg.g/mW) a los 45 minutos de reperusión (NS vs C). Tampoco hubo diferencias en el tono

diastólico durante R entre los corazones de ratas tratadas con GphT oral y las que no fueron tratadas.

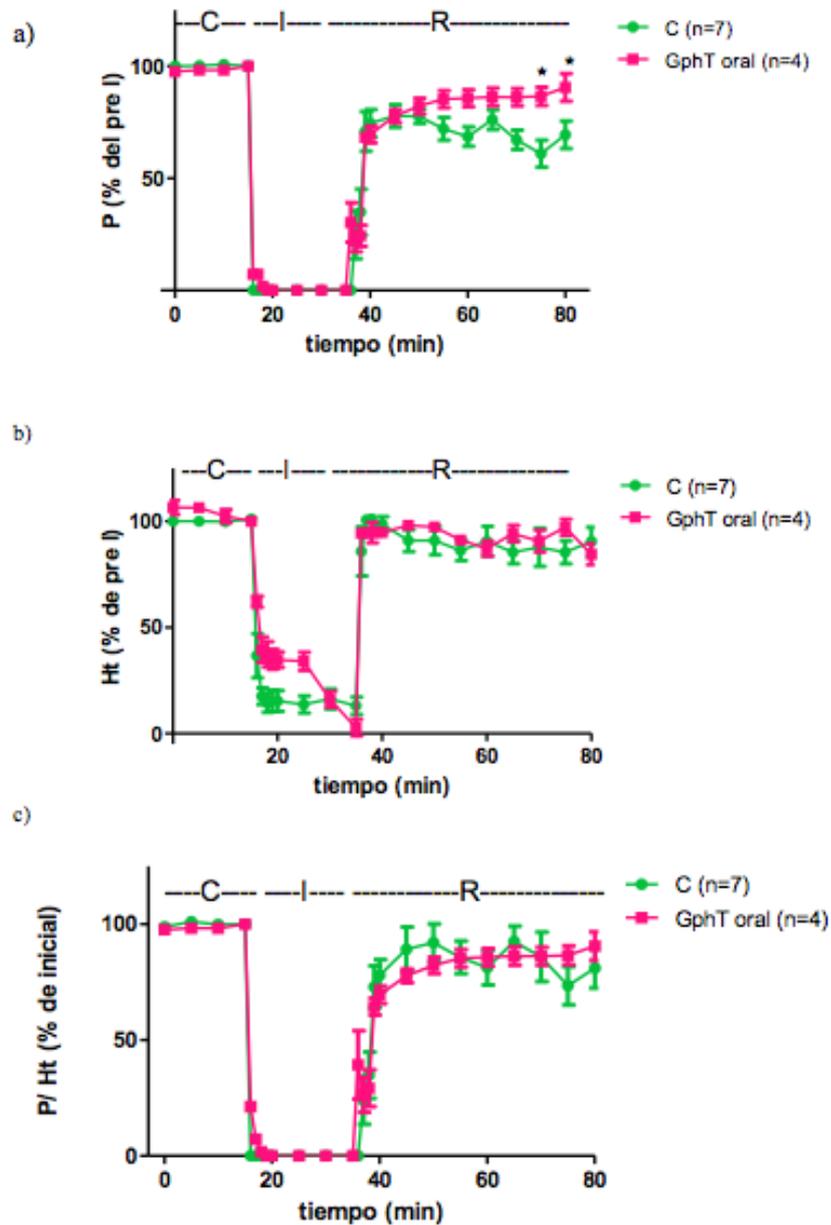


Figura 47: Recuperación porcentual de la presión desarrollada (P, % del valor pre I) (a); del calor liberado (Ht: % del valor pre I) (b) y de la Economía muscular total (P/Ht: % del valor pre I) en corazones de rata tratadas con tintura de *Gomphrena perennis* L (n=4) y sin tratar (C, n=7). El test de Bonferroni a posteriori del ANOVA mostrado en la tabla 13 dio * $p < 0.05$ vs C en (a)

Tabla 13: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías aplicados a los valores de %P, % Ht y % P/Ht en corazones de rata con y sin pretratamiento GphT al 0,1%. Los test a posteriori para comparaciones pareadas son mostrados en la leyenda de la figura 44.

Variables del ANOVA	%P	%Ht	%P/Ht
Tratamiento	F=14.84 DFn= 1 P=0,0002	F=14.32 DFn= 1 P=0.0002	F=0.96 DFn= 1 P=0.3292
Tiempo	F=143.92 DFn= 24 P<0,0001	F=68.11 DFn= 24 P<0,0001	F=88 DFn= 24 P<0,0001
Interacción	F=2.41 DFn= 24 P=0.0004	F=1.6 DFn= 24 P=0,0402	F=1.48 DFn= 24 P=0.0757
DF residual	225	250	286

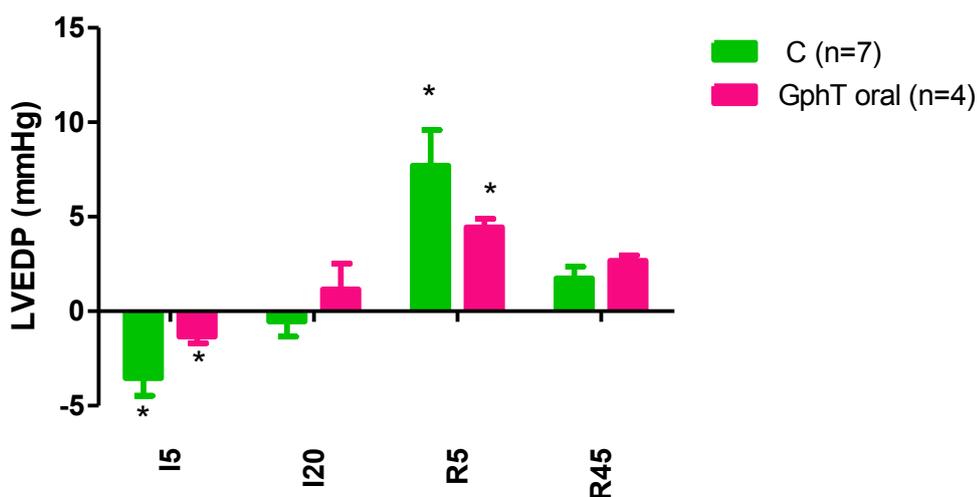


Figura 48: Cambios en la presión diastólica (Δ LVEDP, en mmHg) con respecto al valor preisquémico obtenidos al comienzo y al final de la isquemia (I) y de la reperusión (R) para corazones de rata con y sin tratamiento con tintura de *Gomphrena perennis* L. en el agua de bebida. * $p < 0.05$ vs cero (test t de Student)

4.3.3. Efectos de GphT sobre la presión arterial de ratas:

Para evaluar los efectos de la tintura de *G. perennis* (GphT) sobre la presión arterial en ratas, se administró de forma intravenosa distintas concentraciones de GphT y se registró los cambios en PA mediante una cánula en la arteria carótida interna tal como se describió en el numeral 3.8.5. (Materiales y Métodos)

La presión arterial (PA basal) de las ratas normotensas fue de 70.2 ± 15.2 mm Hg (n=4). La administración intravenosa de GphT indujo hipotensión a las tres dosis ensayadas. A las dosis de 0.5 % y 2 % el efecto hipotensor fue estadísticamente significativo y mostró un efecto dosis dependiente (Δ PA diastólica: -13.6 ± 2.9 y -28.2 ± 11.6 mmHg respectivamente para 0.5% y 2% GphT, n=4, figura 49).

Para evaluar si el efecto hipotensor de la tintura de *G. perennis* (GphT) es debido a la liberación de óxido nítrico, se administró $25 \mu\text{mol/kg}$ L-NAME previo al agregado de las dosis de GphT. L-NAME es un conocido inhibidor de la NO sintasa, enzima que cataliza la formación de óxido nítrico a partir del aminoácido esencial L-arginina (Rees y col., 1990).

Δ PA diastólica fue significativamente revertida con el pre tratamiento con L-NAME (fig. 49). La frecuencia cardíaca no fue modificada por ninguna dosis de GphT ni por la administración de L-NAME

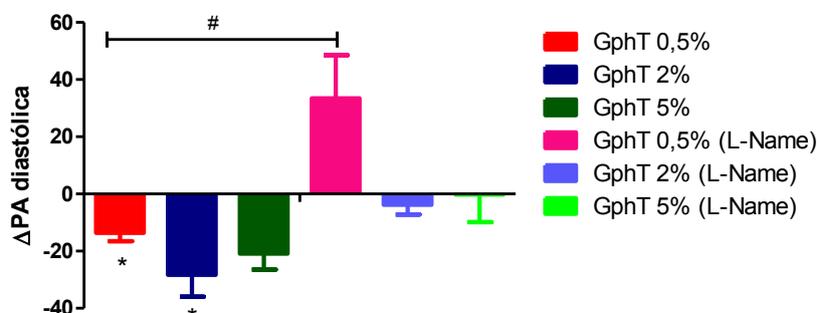


Figura 49. Cambios en la presión arterial (Δ PA diastólica, en mm Hg) producido por la administración i.v. de tintura de *G. perennis* a dosis de 0.5, 2 y 5% en ratas normotensas con y sin pre tratamiento con $30 \mu\text{mol/kg}$ L-NAME. Test t de Student : * $p < 0.05$ vs. Cero. ANOVA: $P=0.0018$; $F=6.293$. Test a posteriori de Bonferroni: * $p < 0.05$ vs GphT 0.5%.

4.3.4. Estudios de los efectos diuréticos de GphT en ratas:

Para evaluar si la tintura de GphT tiene efecto diurético, se les administró GphT al 0,5 y al 2 % a ratas Wistar tal como se describió en la sección 3.8.6 (Ver Materiales y Métodos) y se midió el volumen de orina recogido cada media hora durante 5,5 horas y media. Además, se trató un grupo de ratas con amilorida 1mg/ ml como diurético testigo y otro grupo con vehículo etanólico (solución de etanol 70°). Como se muestra en la figura 50 encontramos que luego de 5,5 horas de monitoreo, el volumen urinario estandarizado por el peso del animal en las ratas tratadas con GphT a ambas dosis no fue diferente al obtenido con las ratas tratadas con vehículo. La amilorida utilizada como droga de referencia en la dosis de 10 mg/kg presentó un aumento significativo del volumen urinario comparado con el grupo control (vehículo) a partir de la primera hora, manteniéndose durante las 5 horas y media posteriores. Estos resultados sugieren que GphT no posee efecto diurético a las dosis administradas. En concordancia con esto, los valores de excreción urinaria volumétrica obtenidos para el grupo de ratas tratado con GphT 0,5%, GphT 2 % y vehículo etanólico no son diferentes a 100, mientras que para amilorida se obtuvo una EUV significativamente mayor al 100%. (Tabla 14)

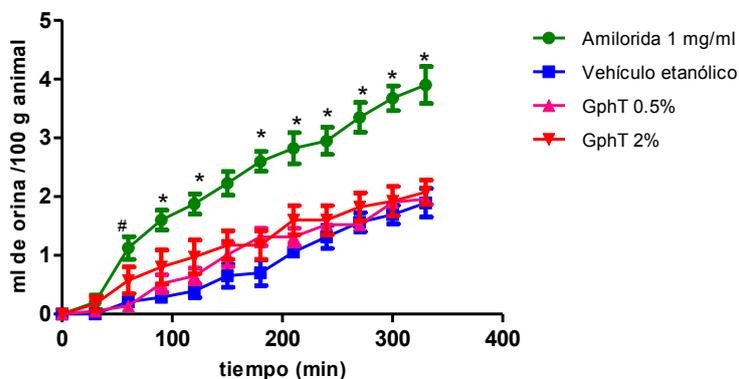


Figura 50: Volumen urinario acumulado en un modelo de simple dosis. Los valores son expresados como la media \pm S.E.M. Test ANOVA de dos vías, Por tratamiento: $F=140,58$; $DFn=3$, $p<0,0001$; Por tiempo: $F=83,35$, $DFn=11$, $P<0,0001$; Ambos $DFd=114$. Bonferroni posttest: # $p<0.05$ vs Vehículo y GphT 2%, * $p<0.05$ vs todos los tratamientos.

Tabla 14: Valores de excreción urinaria volumétrica

EUV Amilorida (n=8)	EUV Vehículo etanólico (n=8)	EUV GphT 0.5% (n=8)	EUV GphT 2% (n=8)
193,86* ±15,49	94,82* ± 12,17	98,06* ± 3,18	103,5*± 9,80

Test t : *p<0.05 vs Amilorida, #p< 0.05 vs 100.

Además de la medición del volumen total de orina por grupo tratado, se midió la concentración urinaria total de iones Na⁺ y K⁺ por fotometría de llama. Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas en los contenidos de iones urinarios de GphT tanto al 0.5 como al 2% con respecto al vehículo (figura 51). Por su parte, amilorida (diurético ahorrador de potasio) indujo un incremento en la excreción de Na⁺ con respecto al vehículo y a ambas dosis de GphT (1.20 ±0.06 vs. 0.71± 0.22 mEq/kg en el vehículo o 0.61± 0.17 mEq/kg en GphT 0,5% o 0.63± 0.12 en GphT 2%, *p<0.05 Test a posteriori Bonferroni de ANOVA de una vía P=0.0246; F=4.497) y una caída en la excreción de K⁺ con respecto a los demás tratamiento, siendo esta última estadísticamente no significativa (0.21 ±0.04 vs. 0.51± 0.15 mEq/kg en el vehículo o 0.62± 0.14 mEq/kg en GphT 0,5% o 0.49± 0.04 en GphT 2%, NS Test a posteriori Bonferroni de ANOVA de una vía)

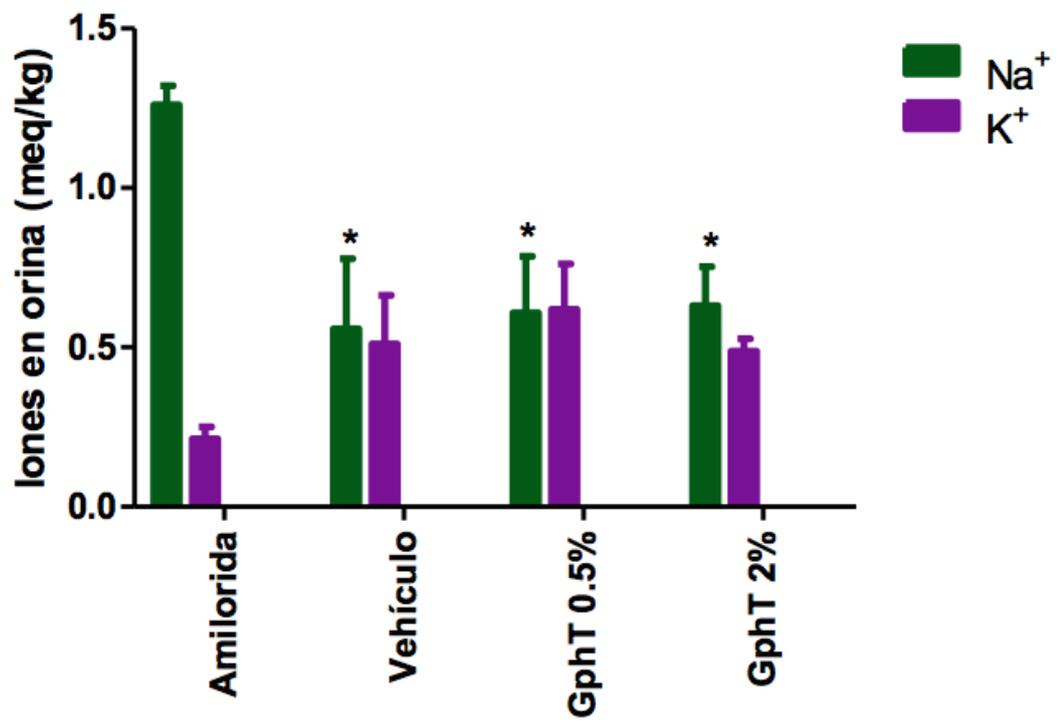


Figura 51: Contenido de iones en orina (mEq/kg) de dos concentraciones de tintura de *Gomphrena perennis* L., amilorida y vehículo etanólico luego de 5.5 h de diuresis en 4 experimentos (n total de animales= 8). * $p < 0.05$ vs amilorida, test a posteriori Bonferroni de ANOVA de una vía.

4.3.5. Estudio de los efectos de GphT sobre la actividad central en ratones:

4.3.5.1. Efectos de GphT en la movilidad espontánea y enderezamientos en ratones:

4.3.5.1.2. Test de campo abierto en ratones:

Para evaluar la locomoción espontánea y la actividad exploratoria de los ratones en el test de campo abierto, se administraron en forma intraperitoneal distintas dosis de GphT (400, o 800 mg/kg) y se registraron las mediciones en cada ratón cada 30 min como se describió en la sección 3.7.4.1.1 (Materiales y métodos)

En el campo abierto, GphT no modificó significativamente el número de líneas cruzadas durante 5 minutos como medida de la locomoción (Fig 52) en el tiempo total del experimento en comparación con valores obtenidos de ambos parámetros para los ratones tratados con vehículo (solución etanólica) o con solución fisiológica (control negativo).

En la medida de movilidad espontánea encontramos que los ratones tratados con diazepam 5 mg/kg disminuyeron el número de líneas cruzadas durante 5 minutos en las mediciones realizadas a los 30 y 60 minutos. Este resultado valida al diazepam como control positivo del test realizado.

Por otra parte, mientras que la GphT a las dosis de 400 mg/kg no produjo cambios estadísticamente significativos en el número de enderezamientos, GphT 800 mg/kg redujo significativamente este parámetro a los 30, 60 y 120 minutos frente a solución fisiológica. Además, el número de enderezamientos del grupo de ratones tratados con solución fisiológica fue significativamente mayor que el encontrado tanto para el grupo de ratones tratados con diazepam 5 mg/kg como para el grupo tratado con

vehículo a los 60 y 120 minutos del experimento. Sin embargo, ni GphT 400 mg/kg ni GphT 800 mg/kg fue significativamente diferente al vehículo en estas condiciones (Figura 53).

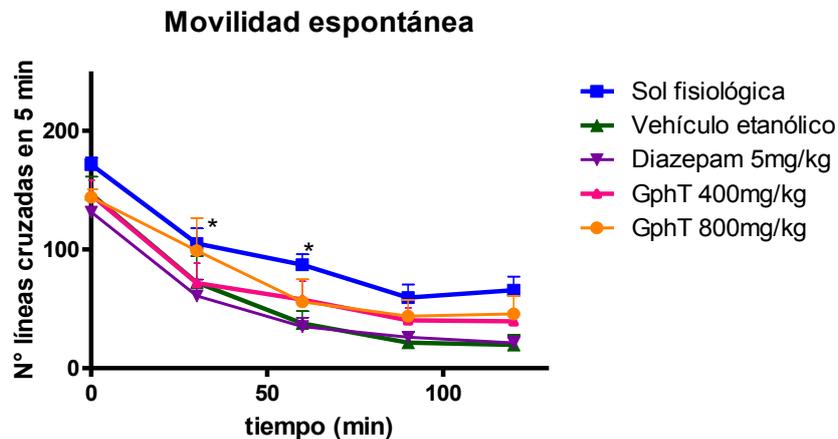


Figura 52. Efecto de GphT sobre la movilidad espontánea de ratones ($n = 6 - 9$). Los valores son expresados como la media \pm S.E.M. Test ANOVA de una vía. Por tratamiento: $F=47,82; P<0.0001$; por tiempo: $F=5.52; P=0.0003$. Test a posteriori: Bonferroni $*p<0.05$ vs diazepam.

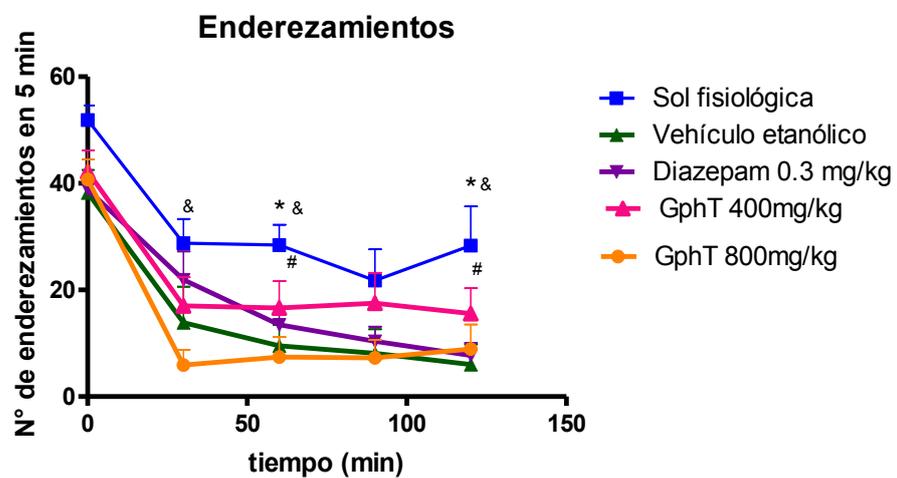


Figura 53. Efecto de GphT sobre la exploración en ratones ($n = 6 - 9$). Los valores son expresados como la media \pm S.E.M. Test ANOVA de una vía. Por tratamiento: $F=10.98; P<0.0001$; por tiempo: $F=36.93; P=0.0003$. Test a posteriori: Bonferroni $*p<0.05$ vs diazepam. # $p<0.05$ vs vehículo etanólico, & $p<0.05$ vs GphT 800 mg/kg.

4.3.5.1.2. Test de laberinto en cruz elevado (LCE):

Con el objetivo de evaluar la actividad ansiolítica de GphT se utilizó el test de LCE. Para ello se administraron en forma intraperitoneal dos dosis diferentes de GphT (400 y 800 mg/kg) y se realizaron las mediciones correspondientes cada 30 min como se describió en el inciso 3.8.4.1.2 de la sección Materiales y métodos de esta tesis.

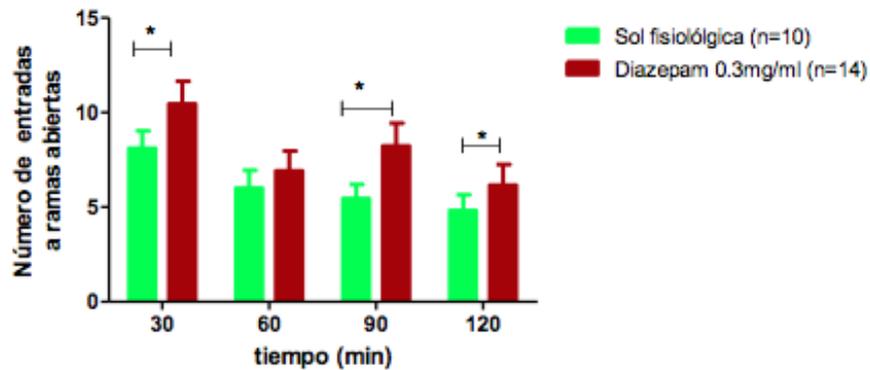
Previo a la realización de la experiencia los ratones fueron sometidos al test durante 5 minutos donde se evaluaron todos los parámetros a medir. En esa experiencia previa se mostró que los ratones no mostraban comportamiento diferente entre ellos, con lo cual fueron sometidos al test en grupos formados aleatoriamente.

En la figura 54 se muestran el número de ramas abiertas y el tiempo de permanencia en ellas para los grupos de ratones tratados con solución fisiológica y con diazepam (0.3 mg/kg, control positivo). Ambos parámetros son significativamente mayores para el grupo de ratones tratados con el ansiolítico (diazepam) lo que valida el test a utilizar.

GphT 400 mg/ml disminuyó significativamente el número de entradas a las ramas abiertas a los 30 minutos del ensayo comparado con el grupo de diazepam 0.3 mg/ml (control positivo) (Fig 55a). Este efecto no fue mantenido en el transcurso de experimento. Además no modificó el tiempo de permanencia en las ramas abiertas en ningún tiempo de medida (Fig 55b).

Por otra parte, GphT 800 mg/ml no modificó con respecto al control positivo el número de entradas a las ramas abiertas (Fig 55a). Sin embargo disminuyó el tiempo de permanencia en las mismas en comparación con el grupo tratado con diazepam, siendo este efecto estadísticamente significativo sólo a los 60 minutos del experimento (Fig 55b).

a)



Test t: * $p < 0.05$ vs sol. fisiológica

b)

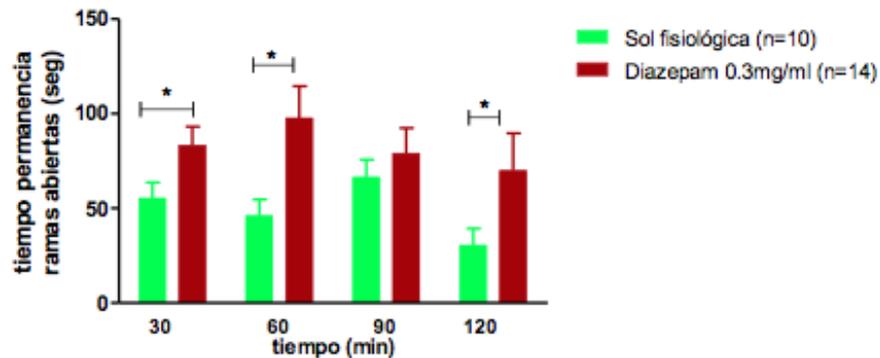
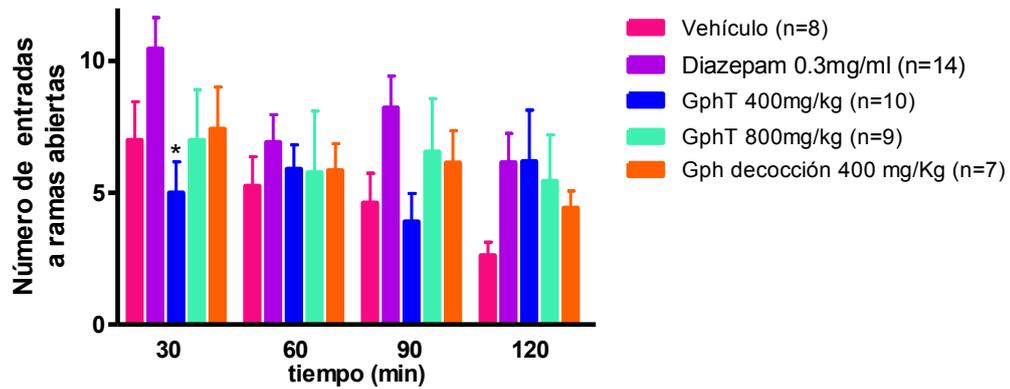


Figura 54: Número de ramas abiertas (a) y tiempo de permanencia en ramas abiertas (b) en función del tiempo de ratones tratados con solución fisiológica ($n=10$) y diazepam 0.3 mg/ml ($n=14$) expuestos al test de laberinto en cruz elevado. (* $p < 0.05$, test t)

Ni GphT 400 mg/ml ni GphT 800 mg/ml mostraron diferencias significativa en ambos parámetros (número de entradas y tiempo de permanencia en las ramas abiertas) cuando las comparamos con el vehículo etanólico, el cuál tiene efecto a nivel del sistema nervioso central específicamente en el comportamiento (Clayman y col, 2017), probamos el efecto de la infusión de *G. perennis* en un grupo de ratones que fueron expuestos al test del laberinto en cruz elevado. Sin embargo, la infusión no mostró

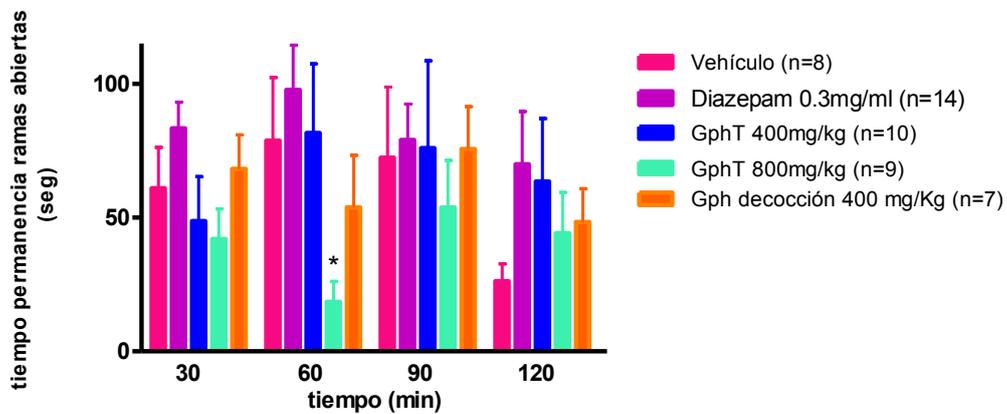
cambios en los parámetros medidos comparados con diazepam a lo largo de todo el experimento (Fig 55a y b)

a)



*p<0.05 vs Diazepam 0.3 mg/ml Test a posteriori de Bonferroni; ANOVA de dos vías: Por tratamiento: F=3.38, DFn=4, P=0.0109; Por tiempo: F=2.39, Dfn=3, P=0.0706 .

b)



*p<0.05 vs Diazepam 0.3 mg/ml Test a posteriori de Bonferroni; ANOVA de dos vías: Por tratamiento: F=0.55, DFn=12, P=0.8779; Por tiempo: F=0.97, Dfn=3, P=0.4094 .

Figura 55: Número de ramas abiertas (a) y tiempo de permanencia en ramas abiertas (b) en función del tiempo de ratones tratados con vehículo etanólico (n=8, diazepam 0.3 mg/ml (n=14), GphT 400mg/kg (n=10, GphT 800 mg/kg (n=9) y Gph decocción 400 mg/ml (n=7) y expuestos al test de laberinto en cruz elevado. (*p<0.05, test t)

5. DISCUSIÓN

En la presente tesis se llevó a cabo un *screening* de las actividades de la tintura de *Gomphrena perennis* L (GphT) en distintos sistemas biológicos mediante el estudio farmacológico en diferentes modelos experimentales. Entre las actividades evaluadas se validaron los usos en medicina popular de *G. perennis* como antiespasmódico intestinal e hipotensor y se evaluaron también los efectos sedantes, ansiolíticos, diuréticos, cardíacos.

Además se realizó el estudio fitoquímico de *G. perennis* como un primer paso para la caracterización de los metabolitos secundarios que podrían ser los responsables de su uso tradicional.

5.1. Estudio fitoquímico:

Salvo la presencia de 20-hidroxicedisona, los protoalcaloides betaína y colina reportados por Buschi y Pomilio, (1983); se desconocen la mayoría de los grupos fitoquímicos presentes en *G. perennis*, razón por la cuál esta tesis aborda el estudio de los mismos, utilizando estándares de referencia y metodología propuestos en “Plant Drug Analysis” (Wagner y Bladt, 1996). La discusión de los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico de *G. perennis* será llevada a cabo presentando las características generales de cada grupo fitoquímico del cual se pudo determinar su presencia en dicha especie.

5.1.1. Flavonoides:

Los flavonoides son uno de los grupos de constituyentes naturales más numerosos y ampliamente distribuidos en los vegetales. Se caracterizan por una configuración común C6-C3-C6, en la que dos anillos bencénicos A y B están unidos por un elemento C₃ diferente según la naturaleza de cada grupo estructural, el primero se

denomina anillo o agrupación benzoilo y es B cinamilo. Tanto en un anillo como otro aparecen grupos OH libres, metilados o unidos a restos de azúcares sencillos o complejos, pero la principal diferencia entre uno y otro flavonoide radica en el estado de oxidación de la unidad C₃, apareciendo grupos con características bien diferenciadas. (Lock, 1994) Los flavonoides se hallan presentes en todas las partes de las plantas, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, chalconas y auronas. (Luckner, 1990)

Se caracterizan de forma general por su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región UV y visible del espectro, debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados. Una clasificación preliminar del tipo de flavonoides en un extracto de la planta puede hacerse basándose en el estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de coloración. A continuación se realiza un examen cromatográfico de dicho extracto. (Lock, 1994)

La revisión bibliográfica de *G. perennis* no aportó datos sobre la presencia de flavonoides en esta especie, pero sí en el género *Gomphrena* revelando predominancia de flavonoles y flavonas en este grupo fitoquímico. (Bouillant y col., 1978; Chong y col., 1981; Buschi y Pomilio, 1982, 1983)

La reacción de Shinoda positiva en GpHT, es indicativo de la posible presencia de flavonoides (excepto del tipo isoflavonas, chalconas y auronas). Los resultados positivos de las reacciones de toque sobre papel con: Hidróxido de Sodio (NaOH) indicó la posible presencia de flavonas y/o flavanoles debido a la coloración presentada por formación de estructuras resonantes de color amarillo en los extractos de *G. perennis*. El Ácido Bórico (H₃BO₃) en presencia de flavonas y flavonoles en medio alcalino forma quelatos con dos hidroxilos fenólicos en posición relativa en orto, así

como para flavonoides con un grupo carbonilo en 4 y un oxidrilo en posición 5, presentando color amarillo con fluorescencia verde, el cuál se evidenció en los extractos. El Cloruro de Aluminio (AlCl_3) forma complejos o lacas de intensa fluorescencia a la luz de Wood, con hidroxilos en posición orto hidroxil-cetonas vecinos, los primeros son lábiles ante el agregado de solución HCl al 20% mientras los últimos son estables, en los extractos de *G. perennis* se produjo la formación de dichas lacas obsevando fluorescencia verde-amarillenta. (Lock, 1994; Domínguez, 1973)

La presencia de numerosas bandas amarillas en los extractos metanólico e hidróalcoholico de *G. perennis* determinadas por CCD en diferentes Rf descrita en la tabla 6 llevaría suponer la presencia de Glicósidos de flavonoles en *G. perennis* coincidiendo con los resultados de las reacciones de caracterización de flavonoides anteriormente descriptas.

Uno de los métodos más usuales para análisis preliminar de la estructura de un flavonoide, es la absorción UV-Vis, el cual es usado para identificar el tipo de flavonoide como el modelo de oxigenación, puede ser mejor definido con el uso de reactivos que provocan desplazamiento de las bandas de absorción proporcionando información adicional útil para la identificación del flavonoide (Lock, 1994) este último procedimiento no fue realizado para esta tesis.

Los espectros de los flavonoides son determinados generalmente en soluciones alcohólicas, presentando alta intensidad de absorción en tres bandas del espectro comprendidas entre 200-400nm. La intensidad de cada una de ellas varía con las contribuciones relativas a la resonancia total de la molécula de las formas benzoilo, cinamoilo y anillo de pirona, a los efectos de identificación resultan significativas especialmente las modificaciones que puedan producirse en las dos primeras. El

espectro típicamente consiste en dos máximos de absorción en los rangos 240-280nm (Banda II, BII) y 350-550nm (Banda I, BI). En el espectro de absorción UV de los extractos GphT y GphMeOH de *G. perennis* (Ver figura 34 y 35) correspondiente a los tres de los picos observados en el cromatograma en HPLC, se evidenciaron dos bandas dentro del rango 240nm-280nm para BII y 330nm-350nm para BI, valores que se aproximan al rango correspondiente para flavonoles: BII (250-280nm) y BI (330-360nm) que indicaría la presencia de 3-OH sustituidos o BII (250-280nm) y BI (350-385nm) para 3-OH libres. (Markham, 1982)

De todo lo anterior se podría suponer la presencia de flavonoides del tipo de glicósidos de flavonoles en *G. perennis*, los cuales han sido aislados de otras especies del mismo género como *Gomphrena martiana*, *Gomphrena globosa* y *Gomphrena boliviana* (Ver tabla 1)

5.1.2. Alcaloides:

Los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas con carácter básico y mayoritariamente de origen vegetal. Tienen una estructura compleja y son capaces de precipitar con ciertos reactivos característicos. En las reacciones generales los alcaloides forman sales dobles con los compuestos de mercurio, oro, platino, bismuto, etc. Estas sales dobles suelen obtenerse como precipitados y muchas son características desde el punto de vista cristalográfico. Se considera la posible presencia de alcaloides si se obtienen resultados positivos de por lo menos cuatro de los reactivos utilizados. Sin embargo, cabe aclarar que los precipitados también pueden ser causados por proteínas, betaínas, cumarinas, hidroxiflavonas, y algunos lignanos. (Kuklinski, 2000)

La formación de precipitados con todos los reactivos utilizados para la detección de alcaloides, así como la CCD descrita en la tabla 7 evidenciaría la presencia de

alcaloides en los extractos GphT y GphMeOHt de *G. perennis*. La presencia de los protoalcaloides como betaína y colina en *G. perennis*, (tabla 1) fue reportada por Buschi y Pomilio (1983) lo cuál esta en concordancia con los resultados obtenidos.

5.1.3. Saponinas:

Las saponinas son heterósidos que se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contiene. Las saponinas pueden ser (Kuklinski, 2000):

- Triterpénicas: procedentes de la ruta del ácido mevalónico las cuales a su vez se subdividen en saponinas triterpénicas pentacíclicas (Derivadas del oleano o del ursano) y saponinas triterpénicas tetracíclicas que conservan la estructura básica del dammarano con tres ciclos de 6 miembros y un ciclo de 5 miembros.
- Esteróidicas: También sintetizadas por la ruta del ácido mevalónico y en general menos frecuentes que las saponinas triterpénicas pentacíclicas.

Los resultados positivos de las reacciones generales para saponinas y de la CCD evidencian la posible presencia de saponinas en *G. perennis*, que aunque no habían sido reportadas para esta especie, si han sido aislados compuestos de este tipo (tabla 1) en otras especies como *Gomphrena crocephala* (Young y col., 1997)

5.1.4. Triterpenos y esteroides:

Los triterpenos y esteroides son compuestos de C₃₀ procedentes de la ciclación del escualeno, los triterpenos poseen una estructura siempre policíclica, normalmente tetra o pentacíclica. No existe una diferencia fundamental entre los triterpenos y los esteroides, considerándose estos últimos triterpenos tetracíclicos que han perdido, como mínimo tres metilos. (Bruneton, 1995).

El desarrollo de una coloración verde permanente en la reacción de Lieberman-Burchard nos llevaría a confirmar la presencia de compuestos con núcleo esteroide detectadas en *G. perennis*, (Domínguez, 1973) numerosos esteroides han sido aislados previamente del genero *Gomphrena* (tabla 1), siendo el eicosanoide 20-hidroxiecdisona uno de los esteroides presentes en *G. perennis*. (Savchenko y col., 1998; Sarker y col., 1996; Young y col., 1992; Barneji y col., 1971; Buschi y pomilio, 1983)

El perfil del extracto no polar (GphDCM) mostró bandas que al ser reveladas con VS tomaron coloración azul violacéa característica de triterpenos, con lo cual coincidiría como en otras especies como *Gomphrena meyeniana* de la cuál se han aislado estroides y triterpenos. (Buschi y pomilio, 1981, 1982a, 1983)

5.1.5. Glicósidos cardiotónicos:

Los Glicósidos cardiotónicos son compuestos formados por una parte glucocídica constituida por una o varias unidades de azúcar y un aglicón con un núcleo esteroídico (C27, tetracíclico) unido a un anillo lactónico insaturado. Se clasifican en cardenólidos y bufadienólidos. (Kuklinski, 2000)

En la CCD se observaron bandas del mismo color que los cardiotónicos usados como sustancias de referencia posterior al revelado con el reactivo de tricloruro de antimonio ($SbCl_3$) por encima y por debajo de estas últimas (R_f descritos en la tabla 10), sin embargo, ya que el revelado con dicho reactivo también detecta sapogeninas (Lock, 1994), cuya presencia se confirmo para *G. perennis*, no se puede confirmar la presencia de glicósidos cardiotónicos.

5.1.6. Grupos fitoquímicos ausentes en *G. perennis*

En los estudios preliminares de *G. perennis* se comprobó la ausencia de los siguientes grupos fitoquímicos: taninos, cumarinas y esencias. Para el caso de las esencias, la presencia de numerosos tricomas simple uniseriados-pluricelulares y no glandulares, así como la ausencia de glándulas y células oleíferas en la descripción microscópica de *G. perennis* (Carbone, 2015), llevaría a suponer la ausencia de este tipo de compuestos en esta especie explicando las dificultades presentadas en esta tesis para su obtención.

5.1.7. Perfiles cromatográficos:

El primer paso a seguir en el conocimiento fitoquímico de una especie es definir cuales grupos de sustancias pueden estar presentes, para de esta manera lograr la identificación de la planta y de aquellas sustancias capaces de ejercer las actividades farmacológicas. No siempre se conoce la constitución química de la planta por lo cual es indispensable realizar el perfil cromatográfico del o de los extractos en condiciones definidas de análisis lo que lleva a formar un diseño característico debido a la migración diferencial de sus constituyentes llamado huella digital “*finger print*” de la planta. (Sharapin, 2000).

La técnica de HPLC es una herramienta versátil y de gran utilidad para la investigación analítica de los constituyentes extractos vegetales (Hostettman y col., 1997), en la presente tesis se usó la técnica de HPLC con el fin de obtener un perfil cromatográfico de los extractos polares de *G. perennis*, así como confirmar la presencia de algunos grupos fitoquímicos, específicamente flavonoides, cuya presencia se suponía por reacciones de caracterización y CCD discutidos anteriormente en la sección 5.1.1.1.

Los cromatogramas HPLC, del extracto metanólico total (GphMeOHt) e hidroalcohólico (GphT) evidenciaron tres picos predominantes con $T_r = 13, 26$ y 42 minutos respectivamente, similares para los dos extractos (Fig. 34 y 35). Como ya se menciona anteriormente en la sección 5.1.1.1 de la presente discusión, los espectros de absorción UV dichos picos evidenciaron bandas dentro del rango $240\text{nm}-280\text{nm}$ para BII y $330\text{nm}-350\text{nm}$ para BI, que permitiría suponer que las tres sustancias evidenciadas en el cromatograma de HPLC son similares para ambos extractos, lo que estaría de acuerdo con los perfiles cromatográficos obtenidos por CCD los cuáles fueron similares para GphT y GphMeOH variando en la intensidad las bandas al observar a luz UV 365 nm , después del revelado con RPN.

Sin embargo, para definir la identidad de las sustancias evidenciadas en cada uno de los picos en el cromatograma de HPLC, su proporción y su completa similitud en los dos extractos se tendrían que utilizar otros métodos diferentes como análisis en cromatografía de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masa (HPLC-ESI-MS) o a resonancia magnética nuclear (RMN).

La determinación de los perfiles cromatográficos por CCD para los extractos polar (GphMeOH) y no polar (GphDCM), así como la determinación del perfil de los extractos GphT y GphMeOH por HPLC permiten una caracterización inicial de los grupos de sustancias presentes en *G. perennis*, que puedan llegar a justificar su uso tradicional.

5.2. Estudio de la actividad antioxidante total de *Gomphrena perennis* L.

Debido a que existen reportes bibliográficos de la actividad antioxidante para especies del género *Gomphrena* (Hamiduzzaman y Azam, 2012; Andrade y col., 2012) se evaluó la actividad en los extractos de diclorometano (GphDCM), acetato de etilo (GphAcEt) y metanólico (GphMeOH) de *G. perennis*, mediante la cuantificación de la actividad atrapadora ABTS^{•+} y el poder reductor. Los resultados evidenciaron actividad antioxidante *in vitro* en los extractos de *G. perennis*, como atrapadores del radical ABTS^{•+} y reductores del reactivo de Folin, siendo mayor la actividad en GphMeOH respecto a la de GphAcEt y GphDCM, los cuales no mostraron diferencias entre sí (Tabla 11). De igual forma, se observa que los valores de actividad atrapadora de radical ABTS^{•+} se corresponde proporcionalmente con su contenido en fenoles totales, lo que estaría de acuerdo con la correlación reportada por otros autores entre la actividad antioxidante de un extracto vegetal y su contenido en fenoles totales (Babbar y col., 2011 y Floegel y col., 2011).

Con el fin de caracterizar compuestos fenólicos, en especial flavonoles, se analizaron por CCD los extractos GphMeOH y GphDCM. La CCD permitió la observación en GphMeOH y GphDCM de bandas comprendidas en el rango de las sustancias de referencia, con capacidad de decolorar DPPH[•], sin embargo no se puede confirmar correspondencia con ninguna de estas.

La actividad antioxidante de los metabolitos presentes en los extractos de *G. perennis* no sería atribuible a las sustancias de referencia como rutina, isoquercetina, quercetina, kaempferol, ácido cafeico, ácido clorogénico o ácido isoclorogénico, reconocidos por su actividad antioxidante y presentes en muchas especies vegetales (Prior y col., 2005; Rice-Evans y col., 1997; Pietta, 2000; Cos y col., 2000; Pannala y

col., 2001; Brewer, 2011) dado que no se evidenció correspondencia con estas por las técnicas de CCD y HPLC (ver sección 4.2 en resultados). Con lo cuál la actividad antioxidante se debería a otras sustancias diferentes a las ya mencionadas, que no se han logrado identificar en esta tesis.

5.3. Actividades biológicas

5.3.1. Estudio del efecto antiespasmódico de la tintura de *Gomphrena perennis* L.

Muchas especies de plantas en Argentina son usadas desde hace años para el tratamiento de desórdenes digestivos ocasionados por la ingesta excesiva de alimentos. Existen documentos que datan del siglo XVIII donde se hace alusión a diferentes especies vegetales para el uso en trastornos gastrointestinales tales como el comúnmente denominado “empacho”, donde el uso de la medicina popular es frecuente. Entre estas especies encontramos *Alternanthera pungens* (Kunth) que pertenece a la familia *Amaranthaceae* como *G. perennis* (Campos-Navarro y Scarpa, 2013). De allí y de los antecedentes etnobotánicos reportados por Orfila y D’Alfonso (1999) para *G. perennis* surge el interés de evaluar los efectos gastrointestinales de la GhpT. Este estudio se realizó tal como se describió anteriormente mediante el uso de curvas concentración respuesta en duodeno e ileon aislado de rata.

En estos experimentos encontramos que la tintura de *G. perennis* (GphT) demostró tener actividad antiespasmódica intestinal.

Otros autores encontraron también un efecto antiespasmódico en los extractos etanólicos de *Alternanthera sessilis*, un especie originaria de Pakistán perteneciente también a la familia de las *Amaranthaceae*. *Alternanthera sessilis* mostró efecto espasmolítico concentración dependiente en yeyuno aislado de conejo. Además produjo la relajación de las contracciones tónicas inducidas por alto K^+ (80mM) (Sagib y Janbaz, 2016).

En los experimentos realizados en esta tesis se muestra que la GphT actúa como antagonista no competitivo de la contracción colinérgica dado que disminuyó el efecto

máximo de la contracción inducida por carbacol en modo dependiente de la concentración. El carbacol es un fármaco con acción muscarínica, por lo que el efecto no competitivo encontrado sugiere que las propiedades antiespasmódicas de la tintura no son debidas a una acción antimuscarínicas.

Para dilucidar el mecanismo causante del bloqueo no competitivo de la tintura en las CCR de carbacol, se evaluó la capacidad de afectar el influjo de calcio en el músculo liso intestinal. GphT mostró también actividad antagonista competitiva frente al influjo de Ca^{2+} en dicho músculo liso gastrointestinal.

Blanco y col. (2013) evaluaron el efecto del verapamil, un conocido bloqueante de los canales de Ca^{2+} , encontrando un comportamiento como antagonista no-competitivo de la Ach (Figura 40) con un $\text{pD}'2$ de verapamil frente a acetilcolina de $6,22 \pm 0,16$. Por otra parte encontraron que verapamil se comportó como un antagonista no-competitivo de las CCR de Ca^{2+} en medio despolarizante de alta $[\text{K}^+]$ a pesar de ser un conocido bloqueante de los canales de Ca^{2+} . (Figura 42). Los autores sugieren que este comportamiento puede asociarse a su modo de interacción con los canales, que ocurre desde el interior de la célula en un sitio diferente al de unión del Ca^{2+} (Blanco y col., 2013)

Cuando se compararon el patrón de las CCR de Cbl y Ca^{+2} obtenido en presencia de GphT con el obtenido en presencia de verapamil (Blanco y col., 2013) se encontró una importante similitud entre ambas respuestas. Este efecto es típico de la presencia de flavonoides, los cuales fueron detectados en *G. perennis* esta planta y se conoce su capacidad de bloquear canales de Ca^{+2} . (Vasconcelos y col., 2015; Zhang y col., 2017) Los resultados de GphT están de acuerdo con los encontrados por otros autores en el extracto etanólico de *Alternanthera sessilis* donde mostraron que éstos extractos reflejan

la presencia de componentes que bloquean los canales de Ca^{+2} siendo los mismos responsables de su acción antiespasmódica. (Sagib y Janbaz, 2016).

5.3.2. Estudio de los efectos sobre la conducta de la tintura y decocción de *Gomphrena perennis* L.

Varios extractos de plantas usados comúnmente como antiespasmódicos tienen además propiedades sedantes, siendo este efecto benéfico en el tratamiento de los desórdenes gastrointestinales. Dado que otros autores han reportado efectos tranquilizantes de las partes aéreas de *Gomphrena perennis* L. (Basualdo y col. 2004), evaluamos preclínicamente las propiedades sobre la conducta de la tintura de *G. perennis* (GphT).

Los test empleados para evaluar las actividades antes mencionadas han sido previamente validados y utilizados en el laboratorio de la Cátedra de Farmacología de la UNLP donde se realizó esta tesis (Consolini y col, 2006; Ragone y col, 2007).

Los resultados obtenidos en el test de campo abierto muestran que la GphT no modificó la movilidad espontánea a las dosis ensayadas en comparación con aquellos ratones tratados con solución fisiológica (control negativo). El vehículo etanólico tampoco modificó la movilidad espontánea con respecto a la solución fisiológica, mientras que diazepam la redujo. Estos resultados sugieren que *G. perennis* no modifica la locomoción en ratones a las dosis ensayadas. Por otra parte, el vehículo indujo una caída estadísticamente significativa en el número de exploraciones con respecto al grupo de ratones tratados con solución fisiológica a los 60 y 120 min. Sin embargo estos resultados no fueron significativamente diferentes a los encontrados con GphT. Estos resultados sugieren que *G. perennis* no modifica la locomoción en ratones a las dosis ensayadas.

De igual manera, GphT 400 mg/Kg tampoco mostró cambios significativos en el número de enderezamientos. Por el contrario, GphT 800 mg/Kg disminuyó significativamente éste parámetro a los 30, 60 y 120 minutos frente a solución fisiológica. Si bien, el vehículo mostró el mismo comportamiento a los 60 y a los 120 minutos, el efecto es diferente a los 30 minutos del experimento donde GphT 800 mg/kg muestra un valor significativamente menor a la solución fisiológica y no así el vehículo. Dado que las sustancias con acción ansiolítica tienden a reducir el número de exploraciones (Willner P, 1991), estos datos sugieren que GphT 800 mg/kg podría tener un efecto ansiolítico siendo este efecto máximo a los 30 minutos de la administración intraperitoneal.

A partir de estos resultados, se ensayaron ambas dosis de GphT en el test del laberinto en cruz elevado (LCE) para evaluar el efecto ansiolítico de las mismas. En este test encontramos que GphT 400 mg/Kg mostró efecto ansiogénico a los 30 minutos disminuyendo el número de entradas a las ramas abiertas mientras que GphT 800 mg/Kg mostró igual efecto disminuyendo el tiempo de permanencia a los 60 minutos del test versus diazepam. Este comportamiento muestra un leve efecto ansiogénico para GphT a ambas dosis de GphT que no fue evidenciado en el campo abierto.

Sin embargo, es posible que este efecto ansiogénico evidenciado en el LCE sólo en un tiempo y para un solo parámetro en cada dosis esté influenciado por la menor sensibilidad de este test para evaluar agentes ansiolíticos con mecanismos de acción diferentes a la modulación alostérica GABA_A descrita por otros autores (Cardenas y Navarro, 2002). En este aspecto es sabido que el etanol no sólo posee acción sobre los receptores GABA_A sino también sobre los receptores NMDA y receptores dopaminérgicos a nivel del sistema nervioso central (Bassareo y col., 2017; Xu y Kang,

2017). Además, otros autores han encontrado efectos ansiogénicos cuando evaluaron la administración crónica e intermitente de alcohol en ratas adultas que fueron sometidos al test de laberinto en cruz elevado (Van Skike y col., 2015), con lo cual la administración de *G. perennis* en un vehículo etanólico (como tintura) podría enmascarar o distorsionar los efectos conductuales específicos de esta especie vegetal.

En base a esto, resultó de interés evaluar los efectos de la *G. perennis* en un vehículo acuoso. En estos experimentos se encontró que el cocimiento de *G. perennis* no mostró efectos ansiolíticos en el laberinto en cruz elevado (LCE) a la concentración evaluada.

5.3.3. Estudio de los efectos cardíacos de la tintura de *Gomphrena perennis* L. (GphT)

Existen en bibliografía varios estudios preclínicos y clínicos que reportan las acciones benéficas de extractos de plantas medicinales o productos biológicos obtenidos de ellas en el tratamiento tanto de arritmias como de otras patologías cardíacas. En ellos se ha encontrado que drogas de origen natural o los componentes purificados a partir de ellas no sólo han sido eficientes en el tratamiento de las patologías antes mencionadas sino también que su toxicidad y efectos adversos son muy bajos (Brenyo y Aktas, 2014; Wang y col., 2016; Chuang y col., 2016). Como ejemplo de esto podemos citar plantas como el *Crataegus* o el *Ginkgo biloba*. En el primer caso, se ha demostrado que extractos de flores y frutos de *Crataegus* pueden ser utilizados para el tratamiento de arritmias, hipertensión, angina de pecho o falla cardíaca (Schüssler y col, 1995), mientras que por su parte los gíngólidos extraídos del *Ginkgo biloba* previenen las

arritmias por isquemia por acortar la duración del potencial de acción cardíaco e inhibir las corrientes de Ca^{+2} (Zaho y col., 2013).

Dado que las patologías cardíacas son una de las mayores causas de muertes en el mundo actual y los fármacos utilizados en clínica para el tratamiento de estas afecciones poseen alta incidencia de efectos adversos, es de interés el estudio de los efectos cardioprotectores de plantas con potenciales acciones terapéuticas. Por otro lado, acciones cardíacas directas de extractos de plantas utilizadas con otro fin pueden oficiar de posibles efectos adversos o contraindicaciones para el uso de las mismas. (Alonso y Desmarchelier, 2005)

En esta tesis se describió los efectos directos de la tintura de *G. perennis* (GphT) en un modelo de atontamiento cardíaco moderado en corazones aislados de ratas. El estudio se realizó desde un enfoque mecánico energético donde se midió durante el período de isquemia y reperfusión (I/R) tanto la contractilidad miocárdica como el comportamiento energético de los corazones.

En trabajos previos realizados en el laboratorio de la Cátedra de Farmacología de la UNLP, se ha encontrado que en corazones de rata expuestos a un período de isquemia por corte de flujo, muestran una reducción en economía muscular durante la reperfusión debido a una caída en la contractilidad asociada a un aumento en la liberación de calor y a un aumento en el tono diastólico (Consolini y col., 2007). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta tesis se analizó el efecto de la perfusión directa de GphT. Las concentraciones utilizadas fueron elegidas en base a los resultados obtenidos en los ensayos “ex vivo” realizados en intestino de rata, en los cuales se demostró el efecto antiespasmódico de esta tintura.

Los resultados muestran que la perfusión directa de distintas dosis de GphT poseen un leve efecto inotrópico positivo, el cual resultó no ser estadísticamente significativo comparado con el control (Krebs-C) o con el vehículo (Krebs- etanol). Es conocido que los glicósidos cardiotónicos producen efecto inotrópico positivo en el corazón, si bien hay indicios de ellos en esta planta aún no se ha confirmado su presencia. Por otra parte, el leve efecto cardiotónico podría ser debido al menos en parte a la presencia de flavonoides en la tintura de *G. perennis* (GphT), estos últimos encontrados en esta tesis. Varios autores han mostrado que los flavonoides disminuyen el riesgo de enfermedad cardíaca por mejorar la función cardíaca y la circulación del músculo cardíaco. En ellos se encontró que el flavonoide quercetina en mayor medida y genisteína y lutelina en menor proporción han sido los responsables de esta actividad cardiotónica (Hertog y col., 1995; Yochum y col., 1999). Sin embargo, no hay evidencia concluyente acerca de los efectos de estos flavonoides en la cardioprotección frente a la injuria por isquemia reperfusión cardíaca.

En un estudio mecánico calorimétrico de corazones de rata perfundidos con 20 $\mu\text{mol/L}$ de genisteína y expuestos a un modelo de isquemia reperfusión por atontamiento leve a 37 °C se encontró que el pretratamiento con este fitoestrógeno no mostró cambios en la recuperación contráctil pos isquémica mientras que sí incrementó la velocidad de relajación de los corazones (Colareda y col., 2016). Sin embargo, en los experimentos con GphT, cuando los corazones de rata fueron pretratados por perfusión directa con GphT 0.1%, expuestos a 20 minutos de isquemia y 45 minutos de reperfusión, disminuyeron drásticamente su recuperación contráctil postisquémica con un mayor gasto energético, evaluado como economía muscular total. Estos resultados muestran que la GphT tiene efectos deletéreos en corazones expuestos a I/R.

Dado que el uso etnofarmacológico de la GphT es por administración oral, un grupo de ratas fueron tratadas con 2,35mg de planta seca/ml de agua de bebida por 7 días consecutivos previos al sacrificio. Una vez extraído, el corazón fue sometido al mismo modelo de isquemia reperusión por atontamiento leve. La dosis de GphT utilizada fue elegida a partir de los datos obtenidos en los experimentos de medición de presión arterial en los cuales la administración intravenosa de 0,5% de GphT resultó tener propiedades hipotensoras e hipotetizando una biodisponibilidad del 100% de la vía oral.

En estos experimentos se encontró que el tratamiento con GphT en el agua de bebida mejoró la recuperación contráctil postisquémica sin cambios en la economía muscular, mostrando un efecto levemente cardioprotector en los minutos finales de la reperusión (40 y 45 min). Resultados similares se obtuvieron en el laboratorio de la Cátedra de Farmacología cuando se administró infusión de *Melissa officinalis* en el agua de bebida a ratas cuyos corazones fueron expuestos al mismo modelo de I/R (Lazarte y col., 2016).

Dado que existen muchos estudios que evidencian el efecto cardioprotector de los flavonoides frente a la injuria miocárdica por isquemia reperusión (Chen y col., 2013; Wang y col., 2013; Dong y col., 2014. Ozbek y col., 2015; Agrawal y col., 2014) y que en la presente tesis se encontraron flavonoides en los extractos de *G. perennis*, éste grupo de compuestos podría ser el responsable al menos en parte de la acción cardioprotectora de la tintura (GphT) en el modelo de I/R cuando es administrada en el agua de bebida.

Además de los flavonoides, existen otros grupos fitoquímicos como las saponinas de los cuales se ha mostrado actividad cardioprotectora en la isquemia

reperfusión cardíaca. En esta línea se ha demostrado que saponinas extraídas de *Panax japonic* protegen al miocardio de la injuria por isquemia cuando se administra en forma oral a ratas en el agua de bebida durante 7 días. Este efecto benéfico fue asociado a la capacidad antioxidante de las mismas (He y col., 2011). En el mismo sentido saponinas extraídas de *Aralia taibaiensis* han mostrado ser cardioprotectora tanto en cardiomiocitos aislados como en corazones enteros de rata expuestos a I/R cuando se administró de forma oral. Los autores sugieren que la protección ejercida por estas saponinas está mediada por activación de la vía de la proteína quinasa activada por AMP (Yan y col., 2015). Dado que en *G. perennis* se encontraron saponinas, la protección frente a I/R encontrada cuando la tintura fue administrada de forma oral podría deberse en parte a la acción de este grupo fitoquímico en concordancia con lo encontrado en bibliografía para otras especies vegetales. (Young y col., 1997)

Es conocido que las saponinas tienen un amplio espectro de actividad biológica, entre las cuales se destaca su potencial hemolítico. Si bien esta propiedad ha sido fundamental en el desarrollo de diferentes potenciales terapéuticos, también es la causante del amedrentamiento del uso de muchos productos naturales que contienen saponinas. (Wang y col., 2007). La diferencia entre el efecto protector cuando GphT fue administrado en forma oral en contrapunto con el efecto deletéreo encontrado cuando la tintura fue perfundida in situ al tejido miocárdico, también podría ser explicado por la presencia de saponinas en el extracto de esta especie vegetal. En este aspecto, es conocido que cuando las saponinas son administradas por vía oral, la toxicidad de las mismas disminuye al ser biotransformadas por el hígado en formas menos tóxicas favoreciendo la desintoxicación (Forturbel, 2003).

5.3.4. Estudio del efecto hipotensor de la tintura de *Gomphrena perennis* L. (GphT)

Tal como se discutió en el apartado anterior, los desórdenes cardiovasculares son muy frecuentes en la población actual, es por ello que el uso de la fitomedicina ha cobrado mucha relevancia en los últimos años por ser efectiva y presentar baja incidencia de efectos adversos. Además, datos bibliográficos de especies del mismo género como *Gomphrena globosa*, mostraron que el extracto etanólico de las hojas de dicha especie preparado por maceración, promueve la actividad hipotensora. (Arcanjo y col., 2011)

Con el objetivo de evaluar los efectos sobre la presión arterial de la tintura de *G. perennis*, (GphT) se administraron distintas dosis de tintura por vía intravenosa a ratas normotensas y se midió la presión arterial. GphT mostró actividad hipotensora dosis dependiente. Dado que la presión arterial está determinada en gran medida por la resistencia periférica total y que el efecto hipotensor mostrado por GphT fue revertido rápidamente en el tiempo, se hipotetizó que dicho efecto podría estar mediado por la liberación de óxido nítrico (NO) en los vasos. Para evaluar esta hipótesis se realizó un tratamiento con 25 μ M de L-NAME (un bloqueante competitivo de la NO- sintasa) previo al agregado de las distintas dosis de tintura. En esta condición, L-NAME revirtió los efectos hipotensores de GphT en ratas normotensas. Este resultado sugiere que el efecto hipotensor de la tintura de *G. perennis* está mediado por la producción de NO en los vasos, el cual produce vasodilatación por activación de la guanilato ciclasa, que activa vías relajantes dependientes de GMPc (Fig. 56)

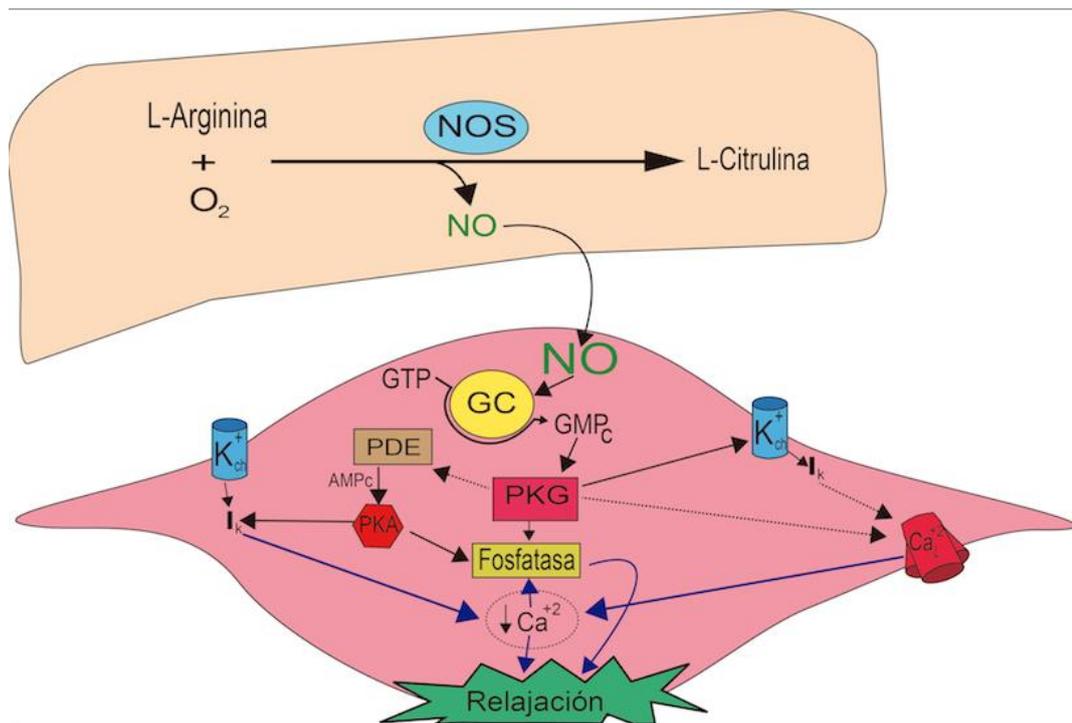


Figura 56: Esquema gráfico de la relajación del músculo liso vascular mediada por óxido nítrico.

La presencia de polifenoles en los extractos de *G. perennis*, los cuales se caracterizan por poseer efectos antioxidantes que contribuyen al mantenimiento de los niveles de óxido nítrico (Kim, 2003) podrían ser los responsables de los efectos hipotensores de la GphT en ratas normotensas. De igual manera los flavonoides (agrupados dentro del grupo de los polifenoles) encontrados en GphT podrían contribuir a la vasodilatación por disminuir el influjo de calcio.

Es importante destacar que aunque la excreción renal sea un determinante importante de la presión arterial, esta actividad no puede ser responsable del efecto del hipotensor encontrado por la administración intravenosa de GphT sobre ratas normotensas anestesiadas, dado que en este modelo de animal no tiene diuresis simultánea.

5.3.5. Estudio de los efectos diuréticos de la tintura de *Gomphrena perennis*

L. (GphT)

Puesto que varias especies de *Gomphrena* son usadas tradicionalmente por sus efectos diuréticos (Vieira y col., 1994) fue de interés estudiar este efecto en la tintura de *G. perennis* (GphT).

Como se describió en el apartado anterior, se evidenció la presencia de polifenoles en los extractos de *G. perennis* y ya que estos contribuyen a mantener los niveles de NO, compuesto juega un rol importante en la regulación del tono vascular de las arteriolas renales aferentes promoviendo su vasodilatación e incrementando así la filtración glomerular (Chappell, 2012), es posible que los polifenoles presentes en GphT contribuyan a promover la diuresis. Por otra parte, es conocido el efecto vasodilatador de los flavonoides debido a su capacidad de inhibir los canales de Ca^{2+} , lo que favorecería también la diuresis (Vasconcelos y col., 2015). Sin embargo, GphT no mostró actividad diurética en las dosis ensayadas en los experimentos. Tampoco se evidenció cambios en las concentraciones de iones Na^+ y K^+ excretados con respecto al vehículo etanólico.

Ante este resultado cabe preguntarse si las dosis empleadas de GphT fueron suficientes como para evidenciar un posible efecto diurético. La administración oral de 0.5% y 2 % de GphT a una dosis de 100 y 400 mg de GphT/Kg de rata correspondiente a 1,4 y 5,63g de planta seca por Kg de rata respectivamente y considerando la extrapolación humano rata como una 1/10 entre especies (Kau y col 1984), la dosis administrada es claramente superior a las dosis normalmente utilizadas en el consumo humano de una especie vegetal ya sea como tintura o como infusión (rango entre 3 a 10 gramos de planta seca diario (Debenedetii y col., 2000). Por lo tanto, consideramos que

a las dosis utilizadas para consumo humano la tintura de GphT no posee efecto diurético.

6. CONCLUSIONES

Esta tesis intenta validar científicamente los efectos etnofarmacológicos de los extractos de *Gomphrena perennis* L (*G. perennis*) y estudiar otras propiedades farmacológicas que pudieran ser útiles terapéuticamente o como efecto adverso, así como contribuir al conocimiento de los grupos fitoquímicos presentes en esta especie que pudieran llegar a explicar las actividades farmacológicas. Mediante las técnicas CCD, HPLC, reacciones generales de caracterización y el estudio farmacológico en distintos sistemas biológicos, hemos demostrado que:

- Se detectó la presencia en *G. perennis* de flavonoles y saponinas no citados en la bibliografía hasta el momento para esta especie.
- Se confirmó la presencia del núcleo esteroidal y de alcaloides reportados previamente por Buschi y Pomilio, (1983).
- No fue detectada la presencia de los siguientes grupos fitoquímicos: taninos, cumarinas y esencias para *G. perennis*.
- Los extractos metanólico (GphMeOH), diclorometano (GphDCM) y acetato de etilo (GphAcEt) de *G. perennis* presentan actividad antioxidante, siendo esta mayor en GphMeOH en comparación con GphDCM y GphAcEt, los cuáles no mostraron diferencias entre si.
- La actividad antioxidante presente en los extractos metanólico (GphMeOH) y diclorometano (GphDCM) de *G. perennis* sería atribuida a otras sustancias diferentes a los reconocidos compuestos fenólicos antioxidantes usados como sustancias de referencia.
- La tintura de *G. perennis* (GphT) tiene actividad antiespasmódica actuando como antagonista no competitivo de la contracción colinérgica y del influjo de Ca^{2+} en el músculo liso gastrointestinal. Este patrón es similar al de verapamil, y

es típico de la presencia de flavonoides, los cuales fueron detectados en esta planta.

- GphT no produjo cambios en la locomoción ni en la exploración a dosis de 400 mg/kg, mientras que disminuyó la exploración a 800 mg/kg. Por otra parte ambas dosis mostraron un leve efecto ansiogénico en el LCE. La decocción de *G. perennis* no mostró efectos en la conducta de los ratones tratados y evaluados mediante el test de LCE.
- La administración intravenosa de GphT produjo hipotensión en ratas normotensas, siendo la liberación de óxido nítrico en los vasos el responsable, al menos en parte, de éste efecto ocasionado por GphT.
- La perfusión directa de GphT produce un leve aumento de la fuerza de contracción del corazón pero es deletérea cuando estos corazones son sometidos a un proceso de isquemia reperfusión de atontamiento moderado. Sin embargo la administración de tintura de GphT en el agua de bebida 7 días previos al sacrificio protegen al corazón frente a la injuria por I/R en un modelo de atontamiento.
- GphT no posee efectos diuréticos a las dosis administradas.

7. PUBLICACIONES Y A FUTURO....

Congresos:

Los resultados parciales de los estudios llevados a cabo para esta tesis fueron presentados en la 4ta Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa):

- “Spasmolytic effect on gastrointestinal smooth muscle of rats and on mice behavior of leaves from *Gomphrena perennis* L”

Bonilla, Adriana M.; Matera Soledad I.; Consolini Alicia E.

Rosario, Argentina. 2016

Los siguientes trabajos se encuentran aprobados para su presentación en el XXVI Congreso SILAE y el El IX COCOCRO:

- “Morpho-anatomical, phytochemical and chromatographic characterization of *Gomphrena perennis* var. *perennis* L. "paper flower" (Amaranthaceae)”.

Bonilla A.M., del Valle M.E., Carbone, A, Playuk, J., Ruiz E., Rosella M.A

Cartagena, Colombia. 25 al 29 Septiembre 2017

- “Cardiovascular and cardioprotective effects of *Gomphrena perennis* L. (Amaranthaceae) tincture in rats”

Bonilla Bonilla, A.M.; Bayley, M.; Ragone, M.I.; Consolini, A.E.

Cartagena, Colombia. 25 al 29 Septiembre 2017

A futuro....

En virtud de los resultados obtenidos en el *screening* fitoquímico y farmacológico de *Gomphrena perennis* L se propone la continuación de los estudios de esta especie que permitan ampliar aun más el conocimiento de la Flora nativa de Argentina. Para ello se desea en futuro ahondar en:

- El fraccionamiento bioguiado del extracto hidroalcohólico que permita la identificación de los flavonoides, saponinas y demás metabolitos que pudieran ser responsables de las actividades biológicas probadas en esta tesis.
- El estudio de otras dosis y formas de preparación, así como en el mecanismo de acción de los efectos encontrados.
- Los mecanismos responsables de la hipotensión producida por la tintura de *G. perennis*, mediante protocolos de curvas dosis respuesta de aorta aislada de rata.
- Los efectos cardíacos de la administración *G. perennis* en el agua de bebida en un modelo de isquemia reperfusión severa sin infarto (isquemia 30 min-reperfusión 45 min).
- Ya que en bibliografía se ha reportado el efecto inhibitorio moderado del extracto metanólico y su fracción butanólica de *G. perennis* sobre la actividad de la 5-lipoxigenasa (Matsunaga y col., 2000) se sugiere el estudio de actividad antiinflamatoria *in vivo* utilizando el test de edema plantar en rata inducido por carragenina.

8. BIBLIOGRAFÍA:

Alonso J.R., Desmarchelier C. (2005). Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Editorial LOLA, Buenos Aires.

Alonso, S.I., Guma, I.R., Nuciari, M.C., Van Olphen, A. (2009). Flora de un área de la Sierra La Barrosa (Balcarce) y fenología de especies con potencial ornamental. Rev. FCA UNCuyo XLI (2) : 23-44.

Agrawal, Y. O., Sharma, P. K., Shrivastava, B., Ojha, S., Upadhyay, H. M., Arya, D. S., & Goyal, S. N. (2014). Hesperidin produces cardioprotective activity via PPAR- γ pathway in ischemic heart disease model in diabetic rats. PLoS One, 9(11), e111212.

Agudelo H., C.A. & FRANCO -ROSSELLI P. (1991). Sinópsis de Amaranthaceae de Colombia. Caldasia 16(79): 439-448.

Agudelo H., C. A. (2008) Amaranthaceae. Flora de Colombia No. 23. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D. C. Colombia. 138p.

Andrade, P.B., Silva, L.R., Valentão, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., Gil-Izquierdo y Pinho, B.R. (2012). Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. Food Chem 135(2): 756-763.

Abalaka, M.E. y Damisa, D. (2013) Antifungal activity of *Gomphrena celosioides* (soft kaki weed) on selected fungal isolates. J of Current research in science; 1(2): 66-70.

APG (Angiosperm Phylogeny Group) (2003). An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG II. Bot. J. Linn. Soc. 141: 399-436.

Arcanjo, D.D.R., Albuquerque, A.C.M., Neto, B.M., Santana, L.C.L.R., Silva, N.C.B., Moita, M.M., Medeiros, M.G.F., Soares, M.J.S. y Cito, A.M.G.L. (2011). Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic, antimicrobial and cardiovascular effects of *Gomphrena globosa* L. (Amaranthaceae). Journal of Medicinal Plants Research; 5(10): 2006-2010.

Arenas, P. (1987). Medicine and magic among the Maka Indians of the Paraguayan Chaco. Journal of Ethnopharmacology, 21: 279-295.

Arnao M, Cano A, Acosta M. (1999). Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. Free Rad Res. 31: S89-S96.

Aruoma, O.I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. Food Chem Toxicol. 32 (7): 671-683.

Aruoma OI. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of

bioactive components in plant foods. *Mutat Res.* 523-524: 9-20

Azzi A, Davies KJ, Kelly F. (2004). Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Lett.* 558: 3-6.

Babbar N, Oberoi H.S., Uppal D.S., Patil R.T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*; Vol 44: 391–396.

Baines C.P. (2009). The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic. Res. Cardiol.* 104:181-188.

Baines, C.P., Song, C.X., Zheng, Y.T., Wang, G.W., Zhang, J., Wang, O.L., Guo, Y., Bolli, R., Cardwell, E.M., Ping, P. (2003). Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ. Res.* 92:873-80.

Barneji, A., Chintalwar, G.J., Joshi, N.K., Chadha, M.S. (1971). Isolation of ecdysterone from Indian plants. *Phytochemistry.* 10: 2225.

Bassareo, V., Cucca, F., Frau, R. y Di Chiara, G. (2017). Changes in Dopamine Transmission in the Nucleus Accumbens Shell and Core during Ethanol and Sucrose Self-Administration. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 11.

Basualdo, I., Soria, N., Ortíz, M., Degen, R., (2004). Plantas medicinales comercializadas en los mercados de Asunción y Gran Asunción. Parte I. *Revista rojasiana* 6(1): 95-112.

Bayer CropScience. (2013). *Manual de Reconocimiento y manejo de Malezas.* 98 p.

Bentham G. y Hooker J.D. (1880). *Genera Plantarum (Bentham & Hooker f.)* 3(2): 20-43.

Bers D.M. (2001). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.* Dordrecht, Neth.: Kluwer Acad. 2.

Beyra, A., León, M.C., Iglesias, E., Ferrándiz, D., Herrera, R., Volpato, G., Godínez, D., Guimaraes, M., y Álvarez, R. (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61(2): 185-204.

Biswas, M., Dey, S. y Sen, R. (2013). Betalains from *Amaranthus tricolor* L. *J of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1(5): 88-96.

Blanco, M. A., Colareda, G. A., van Baren, C., Bandoni, A. L., Ringuélet, J. y Consolini, A. E. (2013). Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of

Lippia alba. *Journal of ethnopharmacology*, 149(3), 803-809.

Blunden G., Yang M., Janicsak G., Mathe I., Cabarot-cuervo C. (1999). Betaine distribution in the Amaranthaceae. *Biochem Syst Ecol*; 27: 87-92.

Borsch, T. (1995). Three New Combinations in Pfaffia (Amaranthaceae) from the New World Tropics. *Novon* 5: 230-233.

Botha, S. Gerritsma-Vander Vijver, L.M. (1986) Pharmacochemical study of *Gomphrena Celosioides* (Amaranthaceae). *SA Tydskr Naturwetenskap Tegnol* 5: 40-45

Bouillant M.L, Redolfi P., Cantisani A., Chopin J. (1978) Gomphrenol, a new methylenedioxyflavonol from the leaves of *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). *Phytochemistry* 17: 2138-2140

Brand-Williams W., Cuvelier M.E. y Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss u Technol*. 28: 25-30.

Brenyo, A. y Aktas, M. K. (2014). Review of complementary and alternative medical treatment of arrhythmias. *The American journal of cardiology*, 113(5), 897-903.

Brewer, M.S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 10: 221-247.

Bruneton, J. (1995). *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*.

Buschi CA., Pomilio A.B. and Gros E.G. (1979) A new flavone from *Gomphrena martiana*. *Phytochemistry* 18 : 1249-1250.

Buschi C.A., Pomilio A.B. and Gros E.G. (1980) New methylated flavones from *Gomphrena martiana*. *Phytochemistry* 19 : 903-904.

Buschi C.A., Pomilio A.B. and Gros E.G. (1981) 5,6,7- Trisubstituted flavones from *Gomphrena martiana*. *Phytochemistry* 20 :1178-1 179.

Buschi CA. (1982) Estudio Químico de *Gomphrena martiana* Moquin (Familia: Amarantaceas). Doctoral Dissertation (Thesis No. 1705) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 263.

Buschi CA. and Pomilio A.B. (1982a) Terpenoids, flavonoids and protoalkaloids from *Gomphrena boliviana*. *Anales de la Asociación Química Argentina* 70, :855-861.

Buschi C.A. and Pomilio A.B. (1982b) Isorhamnetin 3-O- robinobioside from *Gomphrena martiana*. *Journal of Natural Products* 45 : 557-559.

Buschi CA. and Pomilio A.B. (1983) Comparative studies on *Gomphrena* species. *Anales de la Asociación Química Argentina* 71 : 319-325.

Cai Y., Sun M., Corke H. (2001). Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the *Amaranthaceae*. *J Agric Food Chem*; 49: 1971-1978.

Calderón, C.P. (1998). Evaluación farmacológica y toxicológica de especies vegetales de nuestro medio. (Tesis de maestría inédita). Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. Argentina.

Camejo-Rodrigues, J., Ascensão, I., Bonet, M.A., Vallès, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 89 : 199–209.

Campos, A. C., Fogaca, M. V., Aguiar, D. C., & Guimaraes, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35, S101–S111. doi:10.1590/1516-4446-2013-1139.

Capasso, F., Gaginella, T., Grandolini, G., Izzo, A. (2003). *Phytotherapy. A quick reference to herbal medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Carbone. A., (2015), Caracterización morfo-anatómica de dos poblaciones de *Gomphrena perennis* L. y su posible relación con la sensibilidad al herbicida glifosato. (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Cardenas, J. y Navarro J.F. (2002). Animal models of unconditioned anxiety. *Psiquiat Biol.* 9, 18-32.

Carocho, M. y Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 51: 15-25.

Carrizo, J. y Isasmendi, S. (1998). Flora del Valle de Lerma AMARANTHACEAE Juss. Herbario MCNS Facultad De Ciencias Naturales Universidad Nacional de Salta Buenos Aires 177 - 4400 Salta - República Argentina ISSN 0327 - 506X. 5 (4)

Chappell, M.C., (2012). Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. *Compr. Physiol.* 2, 2733–2752.

- Chen, J. Y., Hu, R. Y., & Chou, H. C. (2013). Quercetin-induced cardioprotection against doxorubicin cytotoxicity. *Journal of biomedical science*, 20(1), 95.
- Chong, L.H.K., Ching, T., Chu, I. (1981). Expectorant principle from *Gomphrena globosa* structural determination of a new flavone glycoside. *Yao Hsueh Tung Pao*. Z16: 55.
- Chuang, S. F., Liao, C. C., Yeh, C. C., Lin, J. G., Lane, H. L., Tsai, C. Chen, T. L., Chen, T. y Shih, C. C. (2016). Reduced risk of stroke in patients with cardiac arrhythmia receiving traditional Chinese medicine: A nationwide matched retrospective cohort study. *Complementary therapies in medicine*, 25, 34-38.
- Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 235-260.
- Clayman, C. L., Malloy, E. J., Kearns, D. N., & Connaughton, V. P. (2017). Differential Behavioral Effects Of Ethanol Pre-exposure In Male And Female Zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*.
- Clements, C.A.B. y Andersón, L. (1961). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 136. 309
- Colareda, G. A., Ragone, M. I., & Consolini, A. E. (2016). Sex differences in the mechano-energetic effects of genistein on stunned rat and guinea pig hearts. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(1), 102-115.
- Consolini, A. E., Baldini, O. A., & Amat, A. G. (1999). Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of Ethnopharmacology*, 66(1), 33-39.
- Consolini, A. E., Márquez, M. T., & Ponce-Hornos, J. E. (2001). A comparison of no-flow and low-flow ischemia in the rat heart: an energetic study. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 79 (7), 551-558.
- Consolini, A. E., Quiroga, P., Yuln, G. y Volonté, M. G. (2004). Participation of Na/Ca-exchanger and sarcoplasmic reticulum in the high [K⁺] o-protection against ischaemia-reperfusion dysfunction in rat hearts. *Acta Physiologica*, 182(2), 121-132.
- Consolini, A. E., Ragone, M. I., Migliori, G. N., Conforti, P. y Volonté, M. G. (2006). Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart.(ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *Journal of ethnopharmacology*, 106(1), 90-96
- Consolini, A.E., Ragone, M.I., Conforti, P., Volonté, M.G. (2007). Mitochondrial role in ischemia-reperfusion of rat hearts exposed to high-K⁺ cardioplegia and clonazepam: energetic and contractile

consequences. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 85:483-496.

Consolini, A. E., Berardi, A., Rosella, M. A., & Volonté, M. (2011). Antispasmodic effects of *Aloysia polystachya* and *A. gratissima* tinctures and extracts are due to non-competitive inhibition of intestinal contractility induced by acetylcholine and calcium. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(5), 889-900.

Corke, H., Cai, Y. y Sun, M. (2005). Characterization of betalains from plants in the Amaranthaceae. *J. of Chromatographic Science* 43: 454-460.

Cos, P., Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, J., Vanden Bergh, D.. (2000). Structure-activity relationship of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. Attar-Rahman (Ed.), Elsevier, Amsterdam. 2: 307-341.

Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. New York, Columbia University Press.

Cronquist, A. y Thorne, R.F. (1994). Nomenclatural and taxonomic history, 5-21. In: H-D BEHNKE & TJ MABRY (eds.). *Caryophyllales – evolution and systematics*. New York, Springer-Verlag.

Cummings, J.P., Haynes, J.D., Lipchuck, L.M., Ronsberg, M.A., (1960). A sequential probability ratio method for detecting compounds with diuretic activity in rats. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics* 128, 414–418.

Debenedetti, S. L., Miño, J., Rojo, A. y Acevedo, M. C. D. (2000). Ensayo del efecto diurético de los extractos acuosos de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gill. Ex Hicken, *Bauhinia candicans* Benth. y *Smilax campestris* Griseb. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 19.

De Carvalho H.A, Vasconcelos B.P., Leite T, Araújo B., Correia A. (2014). Main ion channels and receptors associated with visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Annals of Gastroenterology* 27: 200-206.

De Paula Vasconcelos, P. C., Spessotto, D. R., Marinho, J. V., Salvador, M. J., Junior, A. G., y Kassuya, C. A. L. (2017). Mechanisms underlying the diuretic effect of *Gomphrena celosioides* Mart.(Amaranthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 202, 85-91.

Di Lisa F., Canton M., Menabò R., Kaludercic N., Bernardi P. (2007). Mitochondria y cardioprotection. *Heart Fail. Rev.* 12:249-60.

Dominguez XA. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa S. A., México, D. F.

- Dong, Q., Chen, L., Lu, Q., Sharma, S., Li, L., Morimoto, S., & Wang, G. (2014). Quercetin attenuates doxorubicin cardiotoxicity by modulating Bmi-1 expression. *British journal of pharmacology*, 171(19), 4440-4454.
- Dosumu, O.O., Onocha, P.A., Ajaiyeoba, E.A. y Ekundayo, O. (2005) Phytochemical Screening and Biological Activities of *Gomphrena celosioides* (C. Mart) Extracts. *Nigerian Society for Experimental Biology*; 5(2): 61-67.
- Dosumu, A.A., Idowu, P.A., Onocha, P.A. y Ekundayo, O. (2010). Isolation Of 3-(4-Hydroxyphenyl) Methylpropenoate and Bioactivity Evaluation of *Gomphrena celosioides* Extracts. *EXCLI Journal*; 9: 173-180.
- Dosumu, O.O., Onocha, P., Ekundayo, O. y Ali, M., (2014). Isolation of Aurantiamides from *Gomphrena celosioides* C. Mart. *Iran. J. Pharm. Res.* 13 : 143-147.
- Emendorfer, F., Bellato, F., Noldin, V.F., Niero, R., Cechinel-Filho, V., Cardozo, A.M. (2005). Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8, 63-68.
- Fabiato, A. (1981). Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an intact isolated cardiac cell and during calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from the adult rat or rabbit ventricle. *J. Gen. Physiol.* 78:457-497.
- Fabiato A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245:C1-14.
- Fantinelli J.C., Schinella G., Cingolani H.E., Mosca S.M. (2005). Effects of different fractions of a red wine non-alcoholic extract on ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 76: 2721-2733.
- Ferdinandy, P., Schulz, R., Baxter, G.F. (2007). Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning and postconditioning. *Pharmacological Reviews.* 59:418-458.
- Ferreira, E.O. y Dias, D.A. (2004). Phytochemical investigation of *Gomphrena claussenii* Moq. *Biochem Syst Ecol*; 32: 823-827
- Finkel, T. y Holbrook N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 3-6.
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 194: 7-15.
- Forturbel, R. (2003). Problemática de la producción y comercialización de *Chenopodium quinoa* W.

(Chenopodiaceae), debido a la presencia de saponinas. *Ciencia Abierta*, 21, 1-10.

Floegel A., Kim D-O., Chung S-J., Koo S.I., Chun O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*; 24: 1043–1048.

Gibbs, R.D. (1974) *Chemotaxonomy of flowering plants*. McGill-Queen's University Press, Montreal (2)

Girbés, T., Jiménez, P. (2010). *Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición*. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

Goodman y Gilman. (2014) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. XII Edición. Buenos Aires: Interamericana.

Goleniowski, M.E., Bongiovanni, G.A., Palacio, L., Nuñez, C.O. y Cantero, J.J. (2006). Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Aregentina. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 324-341.

Gorzalczany, S., Rjo, A., Rondina, R.V.D., De-Benedetti, S. y Acevedo. C. (1999) *Acta Farm. Bonaerense* 18: 221-9

Guinnin, F.F., Sacramento, T.I., Sezan, A., Ategbo, J.-M. (2015). Etude Ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel des hépatites virales B et C dans quelques départements du Bénin. *Int J Biol Chem Sci* 9, 1354–1366.

Gutteridge, J.M.C. y Halliwell B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* 393: 561-564.

Halestrap, A.P., Clarke, S.J., Javadov, S.A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61:372-85.

Halestrap A.P., Clarke S.J., Khaliulin I. (2007). The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta.* 1767:1007-1031.

Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun.* 9: 1-32.

Halliwell, B., y Gutteridge, J.M.C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med.* 18: 125-126.

Hamada K., Sasaki Y., Taniguchi N., Fukui H., Miyatsuka Y., Kimura Y., Ukai Y., Yoshikuni Y., Kimura K. (1997). Anticholinergic and Calcium Antagonistic Activities of NS-21 Contribute to the Inhibition of Rat Urinary Bladder Contractions. *General Pharmacology* 5, 771-778.

Hamiduzzaman, M. y Azam, A.T.M.Z. (2012). Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Gomphrena globosa* (L.). Bangladesh Pharmaceutical Journal 15(2): 183-185.

Hamiduzzaman M. (2013). Evaluation of central and peripheral analgesic activity of whole plant *Gomphrena globosa* (L) (Family: Amaranthaceae). International research Journal of Pharmacy 4(6): 54-57.

Handro, W. (1964). Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das Amarantáceas dos cerrados. Anais da Academia Brasileira de Ciência, 36 (4) : 479-499.

He, H., Xu, J., Xu, Y., Zhang, C., Wang, H., He, Y., Wang, T. y Yuan, D. (2012). Cardioprotective effects of saponins from *Panax japonicus* on acute myocardial ischemia against oxidative stress-triggered damage and cardiac cell death in rats. Journal of ethnopharmacology, 140(1), 73-82.

Hegnauer, R. (1964) Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 3. Dicotyledoneae: Acanthaceae-Cyrtaceae. Birkhäuser, Basel

Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., ... y Pekkarinen, M. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. Archives of internal medicine, 155(4), 381-386.

Heuer S, Wray V, Metzger JW, Strack D (1992) Betacyanins from flowers of *Gomphrena globosa*. Phytochemistry 31: 1801-1807

Holmgren, P. K., Holmgren N. H. y Barnett. L. C. (1990). Index Herbariorum. The herbaria of the world. 8th edn. P 1: New York Botanical Gardens: Bronx, New York.

Hostettmann, K., Wolfender, J. L. y Rodriguez, S. (1997). Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. Planta medica, 63(01), 2-10.

Judd, W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J. (2002). Plant Systematics –A Phylogenetic Approach, Second edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.

Kau, S. T., Keddie, J. R., & Andrews, D. (1984). A method for screening diuretic agents in the rat. Journal of pharmacological methods, 11(1), 67-75.

Khlebnikov, A.I, Schepetkin, I.A., Domina, N.G., Kirpotina, L.N., Quinn, M.T. (2007). Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. Bioorg Med Chem. 15: 1749-1770.

Kim, D. O., Jeong, S. W. y Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from

various cultivars of plums. Food chemistry, 81(3), 321-326.

Kloner, R.A., Jennings, R.B. (2001). Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning and their clinical implications: part1. Circulation. 104:2981-2989.

Kramer, K. y Remie, R. (2005). La medición de la presión arterial en pequeños animales de laboratorio. Methods Mol Med. 108: 51-62

Lans, C. (2006). Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. ISSN: 1746-4269 2 : 45

Latha, S.T., Rajendran, N.N. y Babu, G. (2013). Anticancer screening of *Gomphrena globosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. J of Chemical and Pharmaceutical Research. 5(2): 283-289.

Lazarte L., Clavellino L., Bayley M., Mele G., Ragone M.I. y Consolini A.E. (2016). Efecto de la infusión de *Melissa Officinalis* en corazones de ratas hipertiroideas en la disfunción por isquemia-reperfusión (I/R) Ricifa, Rosario.

Leavis, P.C. y Kraft, E.L. (1978). Calcium binding to cardiac troponin C. Ach. Biochem. Biophys. 411-415, 1978.

Livingstone E., Livingstone S. (1970). Pharmacological experiments on isolated preparations. Department of Pharmacology, University of Edinburgh, Edinburgh, 2d edition.

Lock O. (1994). Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2. ed. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima. Perú.

López-Alarcón, C. y Denicola, A. (2013) Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. Anal Chim Acta. 2013; 763: 1-10.

Luckner, M. (1990). Secondary products derived from L-phenylalanine and L-tyrosine (phenyl propanoids). In: Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals. Springer-Verlag, Berlin, Germany: 412.

Martin-tanguy, J.; Cabanne, F.; Perdrizet, E.; Martin, C. (19078). The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. Phytochemistry 17 (11) :1927-1928.

Mahmoud, T.S. (2010). Estudo Fitoquímico e Atividades Biológicas de *Gomphrena elegans* MART. (Amaranthaceae). (tese de doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara. Brasil.

- Markham, K. R. (1982). *Techniques of flavonoid identification* (Vol. 31). London: Academic press.
- Marzocca, A., Mársico, O. y Del Puerto, O. (1976). *Manual de malezas*. Editorial Hemisferio Sur. 564 pp.
- Marzocca, A. (1984). *Manual de malezas*. Ed. Hemisferio Sur. 865.
- Matsunaga K, Takahashi A, Ohizumi Y (2000). Inhibitory action of Paraguayan medicinal plants on 5-lipoxygenase. *Nat Med* 54: 151–154.
- Mears, J.A. (1967). Revision of *Guilleminea* (Brayulinea) including *Gossypianthus* (Amaranthaceae). *Sida* 3(3): 137-152.
- Minale, L., Piattelli, M., de Stefano, S. (1967) Pigments of Centrospermae - VII. Betacyanins from *Gomphrena globosa* L. *Phytochemistry* 6: 703-709
- Mitchell, B.M., Chitaley, K.C., Webb, R.C. (2003). Vascular smooth muscle contraction and relaxation. In: *Hypertension Primer: The Essentials of High Blood Pressure*, edited by Izzo JL and Black HR. Dallas, TX: Am. Heart Assoc., 97-99.
- Moquin-tandon, A. (1849). *Amarantaceae*. *Prodr. (DC.)* 13(2): 231-424.
- Morgan KG. (1990). The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca indicator Aequorin. *Cardiovasc Drugs Ther* 4: 1355-1362.
- Moura, R.M.X., Pereira, P.S., Januário, A.H., França, S.C. y Dias, D.A. (2004). Antimicrobial Screening and Quantitative Determination of Benzoic Acid Derivative of *Gomphrena celosioides* by TLC-Densitometry. *Chem. Pharm. Bull.* 52, 1342-1344.
- Müller K. y Borsch T. (2005). Phylogenetics of Amaranthaceae based on matK/trnK sequence data - Evidence from Parsimony, Likelihood, and Bayesian analyses. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 92: 66-102.
- Nakai, S. (1984). Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemistry*; 23: 1703-1705.
- Nanadagopalan, V., Johnson Gritto, M., Doss, A. (2015). An ethnobotanical survey of medicinal plants used by local traditional healers of thiruvengimalai, tiruchirapalli district, tamil nadu, southern india. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology* ISSN: 2248 – 9185. 5 (3): 156- 159
- Nisensohn, L., Tuesca, D., Angelotti, P. y Bonifazi, S. (2007). *Portulaca gilliesii* (Hook) y *Gomphrena perennis* (L). Especies con tolerancia al herbicida glifosato. *Agromensajes* 21. FCA. UNR.

- Nishimoto, N.; Nakai, S.; Takagi, N.; Hayashi, S.; Takemoto, T.; Odashima, S.; Wada, Y. (1984). Pfsffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemistry*, 23 (1) : 139-142.
- Nishimoto, N.; Shiobara, Y.; Fujino, M.; Inoue, S-S.; Takemoto, T.; Oliveira, F. de; Akisue, G.; Akisue, M. K.; Hashimoto, G.; Tanaka, O.; Kasai, R.; Matsuura, H. (1987). Ecdysteroids from *Pfaffia iserinoides* and reassignment of some ¹³C NMR chemical shifts. *Phytochemistry*, 26 (9): 2505-2507.
- Ohl, F. (2005). Animal models of anxiety. *Handbook of Experimental Pharmacol.* 169, pp 35-69.
- Oladele, G.M., Abatan, M.O., Olukunle, J.O. y Okediran, B.S. (2009). Anti-inflammatory and analgesic effects of Aqueous leaf extracts of *Gomphrena celosioides* and *Momordica charantia*. *J. of Natural Sciences, Engineering and Technology*; 8(2):1-8
- Oliveira, F. (1986). *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze – O ginseng-brasileiro. *Rev Bras Farmacogn*; 1: 86-92.
- Oluwabunmi, I. J. y Abiola, T. (2015). Gastroprotective effect of methanolic extract of *Gomphrena celosioides* on indomethacin induced gastric ulcer in Wistar albino rats. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 5(1), 41.
- Orfila, E. y D'Alfonso, C., (1999). Catálogo preliminar de la flora medicinal serrana de Azul (Provincia de Buenos Aires, REP. ARG.) Cátedra de Botánica Agrícola II. Facultad de Agronomía – UNCPBA, en Dominguezia, 15 (1): 27-38. Buenos Aires, Argentina.
- Ozbek, N., Bali, E. B. y Karasu, C. (2015). Quercetin and hydroxytyrosol attenuates xanthine/xanthine oxidase-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by regulation of oxidative stress and stress-sensitive signaling pathways. *Gen Physiol Biophys*, 34, 407-414.
- Pannala, A.S., Chan, T.S., O'Biren, J., Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Comm.* 282: 1161-1168.
- Piattelli, M., Minale, L. (1964). Pigments of Centrospermae–II (Distribution of Betacyanins). *Phytochemistry* 3: 547- 557.
- Pietta PG. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 63: 1035-1042.
- Prior, R.L., Wu X, Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005; 43: 4290-4302.
- Pirondo, A., Coulleri, J.P., Keller, H.A. y Ferrucci, M.S. (2011). Influencia de factores externos sobre la comercialización de plantas medicinales en un medio urbano: el caso de vendedores criollos e indígenas

en Corrientes, Argentina. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas ISSN 0717 7917.10 (6): 553 – 569.

Playuk, J.A. (2016). Estudio morfo-anatómico de *Gomphrena perennis* L. var. *perennis*: maleza tolerante al herbicida glifosfato. (Trabajo final de grado). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Pomilio, A.B., Buschi, C.A., Sola, G.A.R. y Rumi, L.S. (1991). Antitumor screening of *Gomphrena* species. *Fitoterapia* 62: 511-514.

Pomilio, A.B., Buschi, C.A., Tomes, C.N. y Viale, A.A. (1992). Antimicrobial constituent of *Gomphrena martiana* and *Gomphrena boliviana*. *J. Ethnopharmacology* 36(2): 155-161.

Pomilio, A.B., Sola, G.A., Mayer, A.M., Rumi, L.S. (1994). Antitumor and cytotoxic screen of 5,6,7-trisubstituted flavones from *Gomphrena martiana*. *J Ethnopharmacol*; 44: 25-33.

Ponce-Hornos, J.E., Ricchiuti, N.V., Langer, G.A. (1982). Online calorimetry in arterially perfused rabbit interventricular septum. *Am. J. Physiol.* 243:H289-H295.

Ponce-Hornos, J. E., Bonazzola, P., Marengo, F. D., Consolini, A. E., & Márquez, M. T. (1995). Tension-dependent and tension-independent energy components of heart contraction. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 429(6), 841-851.

Prachi, Chauhan, N., Kumar, D. y Kasana, M.S. (2009). Medicinal plants of Muzaffarnagar district used in treatment of urinary tract and kidney stones. *Indian Journal of Traditional Knowledge*; 8 (2): 191-195.

Ragone, M. I., Sella, M., Conforti, P., Volonté, M. G. y Consolini, A. E. (2007). The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), 258-266.

Ragone, M. I., Sella, M., Pastore, A. y Consolini, A. E. (2010). Sedative and cardiovascular effects of *Aloysia citriodora* Palau, on mice and rats. *Latin Am J Pharm*, 29, 79-86.

Ragone, M. I., Bonazzola, P., Colareda, G. A., & Consolini, A. E. (2015). Cardioprotective effect of hyperthyroidism on the stunned rat heart during ischaemia–reperfusion: energetics and role of mitochondria. *Experimental physiology*, 100(6), 680-697

Rahman, M. A., Begum, K., Rashid, M. E. y Rashid, M. H. (2012). Medicinal plant diversity in the flora of Bangladesh and their conservation: 2. a report on ten angiosperm families. *Plant Archives ISSN 0972-5210. 12 (2): 1023-1035*

- Rang H., Dale M., Ritter J., Flower R. (2008). *Farmacología*. 6: 54-65. ISBN: 978-0-443-06911-6.
- Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 24: 981-990.
- Rees, D. D., Palmer, R. M. J., Schulz, R., Hodson, H. F., y Moncada, S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *British journal of pharmacology*, 101(3), 746-752
- Rebuelta, M., Vivas, J.M., Baraibar, C., Lazaro-Carrasco, M.J., (1985). Estudio del efecto diurético de diferentes preparados de *Betula celtiberica* Rothm et Vasc. *Anales de la Academia de Farmacia* 51, 103–112
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997). Antioxidant proprieties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. 2: 152-159.
- Ríos-Cañavate, J.L. y Schinella, G.R. (2014). Los antioxidantes en la encrucijada: mitos y realidades. *Revista de Fitoterapia*. 14 (2): 115-126.
- Robertson, K.R. (1981). The genera of Amaranthaceae in the Southeastern United States. *J. Arnold Arb*. 62(3): 210
- Romero-Trujillo, J.O., Frank-Márquez, N., Cervantes-Bustamante, R., Cadena-León, J.F., Montijo-Barrios, E., Zárate-Mondragón, F., Monserrat Cázares-Méndez, J., Ramírez-Mayans, J. (2012). Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. *Acta Pediátrica de México*; 33(4): 207-214
- Roriz, C.L., Barros, L., Carvalho, A.M. y Ferreira, I.C.F.R. (2014). HPLC-Profiles of Tocopherols, Sugars, and Organic Acids in Three Medicinal Plants Consumed as Infusions. *International Journal of Food Science*.
- Ruiz, R.E.L., de Fusco, M., Rapisarda, A.M.P., Sosa, A. y Ruiz, S.O. (1991). Estudio fitoquímico de la “yerba de pollo” (*Alternanthera pungens*, H.B.K., Amaranthaceae). *Acta Farm. Bonaerense*, 10 (1) : 25-27
- Ruiz, R.E.L., de, Fusco, M. y Ruiz, S.O. (1993). Constituents of *Alternanthera pungens*. *Fitoterapia*, LXIV (1) : 95
- Ruiz, R.E.L., de, Fusco, M., Sosa, A., y Ruiz, S.O. (1996). Aislamiento de antraquinonas y pigmentos flavonoides en frutos de “yerba del pollo” (*Alternanthera pungens*, H.B.K., Amaranthaceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 15 (1) : 63-66.

- Ruiz R.E.L., de Fusco M., Sosa A. y Ruiz S.O. (2001). Aislamiento de Flavonoides y Antraquinonas de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gillies ex Hicken (*Amaranthaceae*). Acta Farm. Bonaerense 20 (1) : 9-12.
- Salvador, M.J., Andrezza, N.L., Pascoal, A.C.R.F., Pereira, P.S., França, S.C., Zucchi, O.L.A.D. y Dias D.A. (2012). Bioactive Chemical Constituents and Biotechnological Production of Secondary Metabolites in Amaranthaceae Plants, Gomphreneae Tribe. Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites. 124-158.
- Sánchez-Del Pino, I., H. Flores Olvera y J. Váldez. (1999). La familia Amaranthaceae en la Flora Halófila y Gipsófila de México. Anales del instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica 70 (1): 29-135.
- Sangare, M.M., Bayala, B., Atebo, J.M., Loko, F y Dramane, K.L. (2012). Effets de l'extrait aqueux de *Gomphrena celosioides* (amaranthaceae) sur les enzymes hépatiques. Afrique science; ISSN 1813-548X, 8 (3) : 107 : 115.
- Sagib, F. y Janbaz, K. H. (2016). Rationalizing ethnopharmacological uses of *Alternanthera sessilis*: A folk medicinal plant of Pakistan to manage diarrhea, asthma and hypertension. Journal of ethnopharmacology, 182, 110-121.
- Sant'Ana B.M.S., De Siqueira N.C.S., Brasil E., Silva G.A.A. (1977) Phenolic and steroid compounds of *Gomphrena holosericea*. Rev Cent Cienc Biomed Univ Fed St; 5: 55.
- Sarker S.D., Girault J.P., Lafont R., Dian L.N. (1996). Ecdysteroids from *Gomphrena haageana* (Amaranthaceae). Biochem Sys Ecol 1; 24: 177-178.
- Savchenko T., Whiting P., Sarker S.D., Dinan L. (1998). Ecdysteroids from *Gomphrena haageana* (Amaranthaceae). Biochem Syst Ecol; 24: 177-178.
- Schinella, G. R. (2014). Actividad antioxidante y efecto cardioprotector de *Ilex brasiliensis*: un estudio comparativo con *Ilex paraguariensis* (yerba mate). (Tesis de maestría inédita). Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Schinz, H. (1934). Amaranthaceae. En: H.G.A. Engler & K.A.E. Prantl (eds.). Nat. Pflanzenfam 2. 16c: 7-85.
- Schüssler, M., Hölzl, J., Rump, A. F. E. y Fricke, U. (1995). Functional and antiischaemic effects of monoacetyl-vitexinrhamnoside in different in vitro models. General Pharmacology: The Vascular System, 26(7), 1565-1570.

Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (Vol. 78). Convenio Andrés Bello.

Sharma, N. y Vijayrergia, R. (2011). Study of primary metabolites and antimicrobial activity of *Gomphrena celosioides* Mart. Intern J of Pharma and Bioscience; 2(4): 581-586.

Shiobara, Y.; Inoue, S. S.; Kato, K.; Nishiguchi, Y.; Oishi, Y.; Nishimoto, N.; Oliveira, F. de; Akisue, G.; Akisue, M. K.; Hashimoto, G. A. (1993) Nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. Phytochemistry, 32 (6) : 1527-1530.

Shuba, L.M. y McDonald, T.F. (1995). Excitation-contraction coupling: relationship of calcium currents to contraction. En Physiology and Pathophysiology of the heart, editor: N. Sperelakis. 3ra Edición. Kluwer Academic Publishers. Capítulo 13: 269-287.

Singleton VL, Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 16: 144-158

Siqueira, J.C., Grandi, T.S.M. (1986). O genero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) nos cerrados e campos rupestres de Minas Gerais. Acta Biologica Leopoldensia; 8, 213-230.

Siqueira, J.C. (1989). Amaranthaceae. In: JA Rizzo (Coord.), Flora do Estado de Goiás. Coleção Rizzo. 12, 1-44. Goiânia, Abeu/UFG.

Siqueira, J.C. (1992). O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) no Brasil. Pesquisas-Botânica 43, 5-197.

Siqueira, J.C. (1994/1995). Fitogeografia das Amaranthaceae Brasileiras. Pesquisas-Botânica. 45, 5-21.

Soraru S.B., Bandoni A.L., (1978). Plantas de la medicina popular Argentina. Bs. As. Ed. Albatros 1, 76-78

Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]." will do. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acceso: Enero 2017.

Takemoto, T.; Nishimoto, N.; Nakai, S.; Takagi, N.; Hayashi, S.; Odashima, S.; Ada, S. (1983). Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze. Tetrahedron Letters, 24 (10): 1057-1060.

Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Rivera-del Valle, N. y Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. Antioxid Redox Signal. 10, 1343-1374.

Tarnam, Y. A., Ilyas, M. M. y Begum, T. N. (2014). Biological Potential and Phytopharmacological Screening of Gomphrena Species. *International Journal of Pharma Research and Review*, 3(1), 58-66.

Tolivia, A. A. (2014). Prospección biotecnológica de cultivos de *Euglena gracilis* (*Euglenozoa*) (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).

Tomesi, C.N., Viale, A.A., Buschi, C.A., Rofi, R.D., Schteingart, C.D., Inigo, R.P.A., Zallocchi, F.M. y Pomilio, A.B. (1986). Antimicrobial screening of some Argentine higher plants. Part II. *Fitoterapia* 57, 46-50.

Toursarkissian, M. (1980). *Plantas Medicinales Argentinas*, Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires. 2.

Townsend CC. (1993). Amaranthaceae. 70-91. In: K KUBITZIKI (ed.) *Families and genera of vascular plants*. Berlin, Springer-Verlag.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 16 May 2017 <http://www.tropicos.org/Name/42000073>

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 16 May 2017 <http://www.tropicos.org/Name/1100934>

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 16 May 2017 <http://www.tropicos.org/Name/40016045>

Tsuji, T., Yada, Y., Yamaguchi, K., Yamazaki, K., Kasai, R., Otani, K. (1998). Anti-helicobacter pylori saponin from *Gomphrena globosa*. *Jpn Kobai Tokkyo Koho JP*; 10, 488.

Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MKT, Mazura M, Tesler J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39, 44-84.

Van Skike, C. E., Diaz-Granados, J. L., & Matthews, D. B. (2015). Chronic intermittent ethanol exposure produces persistent anxiety in adolescent and adult rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(2), 262-271.

Van Vliet, B.N., Chafe, L.L., Antic, V., Schnyder-Candrian, S., Montani, J.P. (2000). Los métodos directos e indirectos utilizados para estudiar la presión arterial. *Métodos J Toxicol Pharmacol*. 44: 361-73

Vasconcelos, L. H., Correia, A. C. D. C., de Souza, I. L., da CC Silva, M., Paredes-Gamero, E. J., Bárbara, V. D. O., Cavalcante, F. D. A. y da Silva, B. A. (2015). Flavonoid galein 3, 6-dimethyl ether attenuates guinea pig ileum contraction through K⁺ channel activation and decrease in cytosolic calcium concentration. *European journal of pharmacology*, 767, 52-60.

Vieira, C.C.J., Mercier, H., Chu, E.P., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. y Bajaj, Y.P.S., (1994). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Berlin, 257-270

Wagner, H. y Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Wang, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Zhu, S., Li, Y., Li, M. y Yu, B. (2007). Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(7), 2528-2532.

Wang, Y., Zhang, Z. Z., Wu, Y., Ke, J. J., He, X. H. y Wang, y. L. (2013). Quercetin postconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through the PI3K/Akt pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(10), 861-867.

Wang, Z. Q., Jiang, X. J., Zhang, G. Y., Chen, M., Tong, C. F. y Zhang, D. (2016). Effects of ginseng-spikenard heart-nourishing capsule on inactivation of C-type Kv1. 4 potassium channel. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 29(5).

Wikinski S., (2014). Capítulo 7: Psicofarmacología: Farmacodinamia y modelos experimentales. En el libro: "Farmacodinamia General e Interacciones Medicamentosas. Mecanismos de acción de fármacos y metodologías de estudio experimental". Edulp.

Willner, P. (Ed.). (1991). *Behavioural models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge University Press.

Xu, S., & Kang, U. G. (2017). Characteristics of ethanol-induced behavioral sensitization in rats: Molecular mediators and cross-sensitization between ethanol and cocaine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*.

Yan, J., Duan, J., Wu, X., Guo, C., Yin, Y., Zhu, Y., Hu, T., Wei, g., Wen, A. y Xi, M. (2015). Total saponins from *Aralia taibaiensis* protect against myocardial ischemia/reperfusion injury through AMPK pathway. *International journal of molecular medicine*, 36(6), 1538-1546.

Yochum, L., Kushi, L. H., Meyer, K., y Folsom, A. R. (1999). Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, 149(10), 943-949.

Young M.C.M., Vieira C.C.J., Chu E.P., Haraguchi M., Figueiredo-Ribeiro R.C.I. (1992) Ecdysterone and saponins from tuberous roots of *Gomphrena officinalis* Mart. (Amaranthaceae). *Rev Latinoamer Quim*; 23, 41-44.

Young MCM, Potomati A, Chu EP, Haraguchi M, Yamamoto M, Kawano T. (1997). ¹³CNMR analysis of monodesmosidic saponins from *Gomphrena macrocephala*. *Phytochemistry*; 46, 1267-1270.

Zhang X., Li, H., Zhang, H., Liu, Y., Huo, L., Jia, Z., Xue, Y., Sun, X. y Zhang, W. (2017). Inhibition of transmembrane member 16A calcium-activated chloride channels by natural flavonoids contributes to flavonoid anticancer effects. *Br J. Pharmacol*; 174 (14): 2334-2345

Zhao, X., Yao, H., Yin, H. L., Zhu, Q. L., Sun, J. L., Ma, W., Shi, Y. Q., Liang, Z. G. y Li, B. X. (2013). Ginkgo biloba extract and ginkgolide antiarrhythmic potential by targeting hERG and ICa-L channel. *Journal of pharmacological sciences*, 123(4), 318-327.

Zimmer, A.R., Bruxel, F., Bassani, V.L., Gosmann, G. (2006). HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. *J. Pharm Biom Analysis*; 40, 450-453.

Zot, A.S. y Potter, J.D. (1990). Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 16:535-550, 1987. Citado por: Thompson R.B., Warber K.D., Potter J.D. Calcium at the myofilaments. En: *Calcium and the heart*. Langer GA, ed. Raven Press. New York.

Zubizarreta, L. y Díaz Panizza, L. (2014). *Guía de reconocimiento de malezas*. Syngenta; Vicente López. ISBN 978-987-45623-0-2. 1, 330 p.

Zuloaga, F.O., Morrone O., Belgrano M., (eds), (2008). *Catálogo de las plantas vasculares del cono sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)* C Marticorena & E Marchesi (assoc. eds), *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 107, 3: 3486 pp.

Zuloaga, F.O. (2012). *Flora Vascular de la República Argentina*. Córdoba, Argentina. Graficamente Ediciones. ISSN:978-987-1601-20-2 600 p.

Presentes

Acta N° 55

13/9/2017

Dra. S. Gorzalczany
Dra. C. van Buren
Dr. N. Caffini
Hg. A.M. Bouilla

En el día de la fecha se reúne el jurado designado por el Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP (expediente N° 0700-004214/15-000), constituido por los Dres. Nestor O. Caffini, Susana Gorzalczany y Catalina M. Van Buren para evaluar el Trabajo de Tesis de Maestría "Estudio de las propiedades farmacológicas y análisis fitoquímico de los extractos de *Gomphrena perennis* L. (Amaranthaceae)", dirigido por la Prof. Dra. María Lúis Bagnone y la codirección de Hsc. Fam. María Elena del Valle.

El objetivo del presente trabajo de tesis intenta validar los efectos etnofarmacológicos de extractos de *G. perennis* y estudiar posibles prop. farmacológicas, así como, contribuir al conocimiento fitoquímico de la especie. Como consecuencia del estudio, se detectó la presencia de flavonoles y saponinas no citados en la bibliografía para esta especie y se confirmó de alcaloides y nucleos esteroides. NO se detectaron la presencia de taninos, cumarinas ni aceites esenciales. El estudio farmacológico demostró que los extractos ensayados mostraron actividad antioxidante, anti espasmodico, en este último caso solo en la hembra. Mientras que se observó efecto hipotensor y una actividad ansiolítica, pero no efectos diuréticos.

La exposición de la Lic. Bouilla Bouilla fue concisa y ordenada, demostrando un amplio conocimiento del tema y respondiendo en solvencia los preguntas formuladas por el jurado.

Por todo lo expuesto, el jurado considera que el trabajo está aprobado con la calificación de 10 (sobre saliente).


Nestor Caffini


Gorzalczany S.


Van Buren, C.M.