



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA

“BÚSQUEDA DE ACTIVIDAD (ANTI-*TRICHOMONAS FOETUS*) EN PLANTAS
AUTÓCTONAS DE LOS ALREDEDORES DE LA CIUDAD DE SANTA ROSA (LP,
ARGENTINA).”

Yesica Marta Berth

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2012

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química orientación en Alimentos, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Laboratorio del Departamento de Química de la Facultad de Agronomía, durante el período comprendido entre el 1 de Julio de 2011 y 25 marzo del 2012, bajo la dirección de la Dr. Ramirez, María Rosana; y bajo la codirección del Dr. Oyhenart, Jorge Anibal.

25 de marzo de 2012

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

- en primer lugar a Bienestar Universitario por el apoyo económico de todos estos años de estudio. A mis padres y abuelos por toda su ayuda y contención, y a mi novio por estar en todo momento;
- a mis profesores de los 5 años de carrera, y especialmente a todos los miembros del Laboratorio de Biocatálisis del Departamento de Química por toda su ayuda y colaboración. Y a Susana Boeris porque fue quien siempre estuvo ante los problemas;
- a mi directora Rosana y a Jorge por todas sus explicaciones y tiempo dedicado. Y a Florencia G. Martínez por sus primeras enseñanzas en el laboratorio;
- al Dr. Walter Muino por realizar la identificación taxonómica del material;
- A la Universidad Nacional de La Pampa;
- al Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación productiva; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

RESUMEN

Las enfermedades parasitarias, como la trichomoniasis, es uno de los principales problemas de sanidad animal de nuestro país, principalmente en la región pampeana. La necesidad de tratar la enfermedad conduce al descubrimiento de fármacos, pero su uso indiscriminado, en especial el metronidazol, llevó al surgimiento de cepas de *Tricomonas foetus* resistentes, siendo necesario la búsqueda de nuevos productos farmacológicos. En este contexto, las plantas pueden dar valiosa contribución. En este trabajo, se determinó la actividad anti-trichomonas *in vitro* de siete extractos crudos de plantas de la región semiárida pampeana, iniciando con el proceso de la recolección, secado, y triturado de los vegetales; posteriormente se prepararon extractos por maceración en diclorometano y metanol, siendo evaluados como tricomonicidas *in vitro*.

De cada extracto se ha realizado la prospección fitoquímica y evaluado la actividad antioxidante. El screening fitoquímico sugirió la presencia de polifenoles, flavonoides, taninos y terpenos en todas las especies estudiadas. Los siete extractos metanolicos presentan actividad antioxidante, solo tres de los extractos diclorometano exhibieron actividad antioxidante. En relación con la actividad trichomonocida solo dos extractos metanolicos, en concentración de 400 µg/mL, inhibieron el crecimiento parasitario *in vitro*.

En este trabajo se describen los primeros estudios de actividad antioxidante y trichomonocida de los extractos de siete especies vegetales nativas de la región semiárida pampeana. Los resultados demuestran que todas las especies evaluadas presentan propiedades antioxidantes, que dos plantas muestran actividad trichomonocida debido probablemente a la presencia de compuestos fenólicos. Resultados que sugieren un alto potencial biológico de los extractos.

SUMMARY

The objectives of this study were to examine the free radical scavenging activity and the trichomonicide effects of seven native plants. Dichloromethane and methanolic extracts of all species were tested against a representative set of *Trichomonas foetus*. None of the plants extracts had trichomonicide activity in vitro. However, the results showed that two methanolic extract, and metronidazol, used as control were the most active.

Free radical scavenging activity was determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. Rutin was used as positive control. Both extracts showed scavenging activity, but the methanolic extract was more active than the dichloromethane extract (50-400 µg/mL). Methanolic and dichloromethane from seven plants were subjected phytochemical studies to assess its profile content. The results showed that the polyphenolic compounds may be responsible of the antioxidant activity observed.

The results of this study show that the flora of La Pampa could offer alternatives to the treatment of trichomonosis. Additionally, these findings demonstrate that the leaves and their constituents of seven native plants have good antioxidant activities and thus have great potential as a source for natural health products. However more pharmacological and chemical studies are necessary to characterize the mechanism(s) responsible for the biological action and also to identify the active principles present in this species.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS DE TRABAJO	6
OBJETIVOS	6
2. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	7
2.1 Reactivos, disolventes y productos.....	7
2.2 Instrumentos, aparatos	7
2.3 Especies vegetales	7
2.3.1 Recolección de especies vegetales	7
2.3.2 Pre-acondicionamiento de las plantas	8
2.3.3 Obtención de los extractos crudos.....	8
2.3.4 Prospección fitoquímica.....	8
2.4 Cultivo y caracterización <i>Trichomonas foetus</i>	9
2.5 Estudios de actividad biológica	10
2.5.1 Evaluación de la actividad trichomonocida.	10
2.5.2 Determinación del poder antioxidante	11
2.5.3 Análisis estadístico.....	11
3. RESULTADOS	12
3.1 Especies vegetales	12
3.1.1 Rendimiento	12
3.1.2 Estudio fitoquímico.....	13
3.2 Cultivo e identificación de las cepas	15
3.3 Estudios de actividad biológica	15
3.3.1 Evaluación de la actividad trichomonocida en extractos naturales.....	15
3.3.2 Evaluación del efecto antioxidante.....	18
4. DISCUSIÓN	21
5. CONCLUSIONES	23
6. REFERENCIAS.....	24

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han representado en todos los tiempos un recurso terapéutico. Desde el momento en que el hombre empezó a sentir sensaciones desagradables y dolorosas, se preocupó de buscar los medios para su alivio y procurarse una salud satisfactoria. En esta búsqueda, y por su proximidad con la naturaleza, encontró en ella la solución a sus problemas. De esta manera, las indicaciones del empleo de las plantas representan un legado de la recomendación empírica tradicional, que desconocía el fundamento de su efecto terapéutico y los conceptos actuales de Farmacología y Farmacocinética (Casais de Corne et al., 1977; Toursarkissian, M., 1980; Newman et al., 2007).

De acuerdo con los registros presentes en las diversas farmacopeas y con las categorías taxonómicas, la mayoría de los fármacos derivados de fuentes naturales, proceden de la división Spermatophytas del reino vegetal. Esta, es la división con mayor diversidad y la que predomina naturalmente en el campo. Entre las espermatophytas, el número de especies, así como las plantas medicinales útiles se distribuye entre dos grupos: las Gimnospermas, que producen esencias y resinas, así como el alcaloide efedrina y el ginkgólido C de *Ginkgo biloba*, cuyas hojas presentan propiedades antioxidantes porque contienen un 24% de flavonoides. Las Angiospermas, donde se encuentran la gran mayoría de especies medicinales utilizadas por el hombre y que a su vez se dividen en monocotiledóneas y dicotiledóneas. Estos dos últimos grupos proporcionan fármacos útiles, fundamentalmente las dicotiledóneas (Verpoorte, 2000).

Las divisiones pteridophyta y briophyta no son muy utilizadas en la medicina. Las pteridophytas son farmacéuticamente conocidas por los helechos tenicidas y al licopodio. La importancia de las briophytas reside en la producción de antibióticos, su empleo en ingeniería genética, como la producción de insulina humana y la transformación de células de plantas superiores. Entre las talofitas, podemos citar a los hongos los cuales proporcionan varios fármacos útiles, especialmente antibióticos y tienen importancia en otros campos. Las algas también, constituyen una fuente de drogas por ejemplo agar y ácido algínico. El líquen *Cetraria islandica*, contiene ácido cetrárico, que es una depsidona sumamente amarga; se utiliza para enmascarar el sabor nauseoso de algunos medicamentos (Evans, 2002).

Pese a la rápida expansión de la literatura científica, solo un pequeño porcentaje de la totalidad de las especies se han estudiado y resta, un amplio campo de investigación futura (Kinghorn 2002). De esta manera, se retoma con gran fuerza las investigaciones destinadas a dotar de base científica el uso terapéutico, no sólo de las plantas empleadas desde la antigüedad, sino de otras especies no consideradas hasta el momento como posibles fuentes de nuevas moléculas de interés farmacológico, algunos ejemplos fueron colocados en la Tabla I.

Tabla I. Utilización de Productos Naturales en la Actualidad.

	Plantas	USOS
Como modelos de estructuras químicas de nuevos medicamentos	Opio	Analgésico
	Coca	Anestésico local
Como materias primas para la hemisíntesis de medicamentos	Dioscóreas	Antiinflamatorio
Materia prima para la extracción de principios activos	Cornezuelo de centeno	Ocitócico
	<i>Catharanthus roseus</i>	Antineoplásico
Utilización de extractos totales como medicamentos	Manzanilla	Antiinflamatorio/ Antiespasmódico
	Valeriana	Sedante
	<i>Ginkgo biloba</i>	Trastornos Circulatorios

Esta demostrado que las plantas medicinales constituyen una fuente inagotable de compuestos bioactivos que, en algunos casos, son extraídos directamente para su empleo en terapéutica y en otros sirven como modelo para la obtención por síntesis de fármacos análogos. Con relación a esta segunda posibilidad, hemos asistido a lo largo de los últimos tiempos al desarrollo de un elevado número de fármacos a los que, de forma racional, se les han introducido modificaciones estructurales para mejorar o diversificar sus propiedades (Dewick, 2002).

De éste modo tenemos, los alcaloides los cuales constituyen la materia prima para la obtención de diversos principios activos que se emplean actualmente en terapéutica. Desde el punto de vista semisintético, están vinculados con la obtención de fármacos indicados en el tratamiento de procesos neoplásicos. A partir de los lignanos del podofilo americano (*Podophyllum peltatum* L., Berberidaceae) se han obtenido productos con actividad antineoplásica. Estas investigaciones constituyen un ejemplo del desarrollo de nuevas estructuras químicas con nuevos mecanismos de acción y con utilidad clínica, a partir de productos de origen natural (der Heijden et al., 2004; Facchini 2001).

De los diterpenos presentes en la corteza del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia* Nutt., Taxaceae) se han obtenido también productos con actividad antineoplásica. Se trata de diterpenos tricíclicos derivados del núcleo del taxano, algunos de los cuales son diterpenoides, como la baccatina III y sus derivados, y otros, como el paclitaxel (taxol), tienen además una función amida. Los Heterósidos cardiotónicos (familias Escrofulariáceas), son compuestos que han adquirido importancia en terapéutica desde la introducción de los digitálicos en la práctica médica. Siendo la digoxina el único utilizado actualmente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y de determinadas arritmias (der Heijden et al., 2004).

Las saponinas triterpénicas presentes en la raíz del regaliz, constituyen material de partida para la síntesis parcial de otras sustancias activas. El principal constituyente de la raíz es la glicirricina, una mezcla de sales potásicas y cálcicas del ácido glicirrético. Este ácido es un diglucorónido del ácido glicirrético (enoxolona), fármaco utilizado como antiinflamatorio (Verpoorte , 2000).

Uno de los ejemplos más representativos de obtención de principios activos por hemisíntesis lo constituyen las hormonas esteroidales. En la actualidad, la mayoría de los esteroides producidos por la industria farmacéutica se obtienen por hemisíntesis a partir de sustancias de origen natural, debido a los inconvenientes que plantea el proceso de síntesis total (dado su complejidad por las diferentes variaciones espaciales del propio núcleo). Se

caracterizó un precursor abundante, la diosgenina, a partir de una batata mexicana (*Dioscorea macrostachya*, Dioscoreaceae). A partir de esta sapogenina espirocíclica, y mediante un proceso de degradación química se obtiene progesterona (der Heijden et al., 2004). Este proceso continúa y algunos ejemplos fueron colocados en la figura 1.

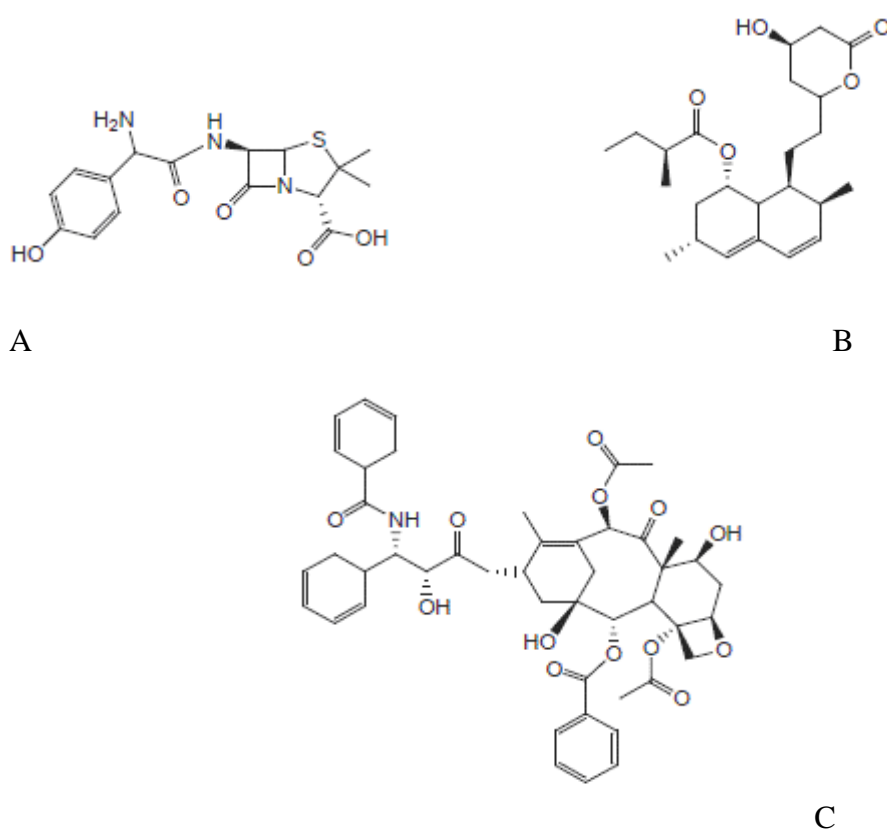


Figura 1. Estructura de algunas de las drogas derivadas de productos naturales, a) Amoxicilina, b) Lovostatina, c) Taxol. (Verpoorte, R., 2000)

Si además analizamos las fuentes naturales que han dado lugar a nuevos principios activos utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas, podemos observar que los productos naturales juegan un papel significante en los procesos de descubrimiento y desarrollo de estos nuevos medicamentos. De los 1010 productos aprobados entre 1981-2006, el 44 % fueron productos de origen natural o derivados a partir de ellos y, entre el 62-67 % de los medicamentos antibacterianos o anticancerígenos se derivaron, igualmente, a partir de sustancias de origen natural (Monguelli et al., 2002).

Si examinamos las enfermedades más recalcitrantes actuales, estas tienden a ser multifacéticas que precisan más de un fármaco para el manejo efectivo de la enfermedad (Fontana 2005). En ese contexto, las drogas vegetales ofrecen un nuevo paradigma y pueden brindar soluciones a enfermedades graves y complejas, especialmente las provocadas por múltiples causas y dianas, entregando la clave para crear un nuevo conjunto de fármacos multipotenciales que los enfoques anteriores y actuales habían sido incapaces de lograr. Por otra parte, no podemos dejar de considerar las enfermedades parasitarias, de distribución mundial como la leishmaniasis, la trichomoniasis que causan problemas sociales y económicos.

En nuestro país, un ejemplo de ello es la aparición de tricomonosis bovina, una enfermedad de transmisión sexual muy frecuente en el ganado bovino (BonDurant, 1997). El diagnóstico positivo de tricomonosis es razón suficiente para la eliminación de un animal del rodeo (Resolución SENASA 358/2008).

Trichomonas foetus, es el microorganismo asociado a esta enfermedad, es un parásito unicelular que infecta el tracto genital bovino y provoca con frecuencia la muerte del embrión (Rhyan, J.C. y col., 1988). Se han testado diversos agentes terapéuticos contra la misma como por ejemplo el dimetridazol, el metronidazol y la nitrimidazina pero en todos los casos se observaron fallas en la efectividad de los mismos (BonDurant, 1997). Además se ha observado que todas las drogas tricomonicidas presentan una elevada toxicidad para el huésped y se sugiere que las mismas presentan actividad cancerígena. En adición, el único medicamento legalmente aprobado y elaborado por las industrias “el metronidazol” ha dado origen a cepas de *T. foetus* quimioresistentes.

En contraste, las drogas basadas en plantas generalmente representan productos multicomponentes que proporcionan terapias potencialmente nuevas para las enfermedades complejas y que además permiten ahorrar tiempo y gasto. Considerando, que los relatos de la medicina tradicional son adecuados para la identificación de las especies vegetales potencialmente terapéuticas y pueden ser orientadores de las investigaciones realizadas con plantas medicinales (Debenedetti y col 2002)

En este trabajo, se pretende comprobar una potencial actividad biológica de las plantas catalogadas de la provincia de La Pampa, a las que se les atribuyen propiedades medicinales. Ya que, la población actual está perdiendo estos conocimientos y practicas, debido a la relación desventajosa entre el saber etnomédico y los sistemas oficiales de salud. Esto sumado a la desaparición de los bosques y la sobreexplotación de algunos de los recursos hasta el agotamiento (Casais de Corne, 1977).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dado que en la región existen diferentes especies vegetales que son usadas en la medicina casera frente a diversas enfermedades provocadas por microorganismos, el presente trabajo plantea como hipótesis que esas plantas poseen potencial actividad antioxidante y que podrían inhibir el crecimiento del protozoo flagelado causante de la tricomonosis bovina: *Trichomonas foetus*.

OBJETIVOS

El objetivo general de nuestro trabajo fue evaluar de diversos extractos obtenidos a partir de plantas nativas de la región semiárida Pampeana (pertenecientes a las familias Anacardiaceae, Ephedraceae, Ramnáceas, Asteraceae, Zygophyllaceae y Leguminosae) como potenciales agentes antioxidantes y *trichomonicida*.

Objetivos específicos

Parte a) Colección de las especies vegetales previamente catalogadas, que son de uso en La Pampa.

Parte b) Parte química

- Obtención de extractos crudos de diferentes polaridades por de técnicas de extracción con solventes.
- Prospección fitoquímica (screening) de los principales compuestos presentes en los extractos obtenidos.

Parte c) Ensayos biológicos

- Evaluación de la actividad antimicrobiana con los extractos crudos.
- Determinación del potencial antioxidante de los extractos.
- Vinculación de los resultados obtenidos con el perfil químico de los extractos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS:

En éste trabajo se siguieron los requisitos y los procedimientos establecidos para los métodos de ensayo de las drogas crudas de origen vegetal referidos en “Quality Control methods for plant materials” de la Organización Mundial de la Salud (Geneva, 1998). Todos los reactivos se obtuvieron de fuentes comerciales y de calidad puro para análisis. La metodología con la que se realizaron las diferentes actividades incluyó trabajos a campo, en laboratorio y en gabinete.

2.1 Reactivos, disolventes y productos

Metanol, diclorometano, etanol, cloroformo, ácido sulfúrico, cloruro férrico, acetato de plomo, amoníaco, hidróxido de sodio, ácido acético, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, Sigma), papel de filtro, jeringas, porta y cubre objetos, filtros de pvdf, Resazurina, Taq DNA polimerasa.

2.2 Instrumentos, aparatos

Rotavapor, molinillo, agitador magnético, balanza, baño de agua, microscopio de luz, espectrofotómetro, peachimetro, autoclave, termociclador, cuba de electroforesis, estufa.

2.3 Especies vegetales

2.3.1 Recolección de especies vegetales

El material vegetal fue recolectado en su hábitat natural, en la región sur de la provincia de La Pampa en el momento de la floración. Los mismos fueron colectados por los integrantes de éste proyecto. Fueron seleccionadas 7 especies vegetales y se tomaron fotografías de las mismas en su ambiente. La identificación taxonómica del material vegetal, fue realizada por el Dr. Walter Muino. Posteriormente una muestra de cada ejemplar fue depositada en el herbario de la facultad de Agronomía de la Universidad

Nacional de La Pampa. Las plantas corresponden a las siguientes familias: Anacardiaceae, Ephedraceae, Ramnáceas, Asteraceae, Zygophyllaceae y Leguminosae.

2.3.2 Pre-acondicionamiento de las plantas

La desecación de las especies colectadas fue realizada a temperatura ambiente en un lugar ventilado durante un mes, para luego preparar los extractos.

2.3.3 Obtención de los extractos crudos

Los extractos se obtuvieron por maceración durante 30 días a temperatura ambiente con disolventes de diferentes polaridades: Diclorometano o Metanol. Luego fueron filtrados y llevados a sequedad en evaporador rotatorio (Decalab SA. Bs As. Argentina). Para los estudios de bioactividad, los extractos diclorometano fueron solubilizados en dimetil sulfóxido (DMSO) y los metanolicos con o metanol-agua y nuevamente filtrados con membranas de pvdf (0.25µm).

2.3. 4 Prospección fitoquímica

Las reacciones químicas de coloración o precipitación nos permiten observar la presencia de determinados grupos de compuestos químicos en las plantas. Las pruebas químicas son sencillas, sensibles, específicas y rápidas de realizar. Estos ensayos fitoquímicos pueden realizarse sobre los mismos extractos a partir de la droga con distintos solventes. En éste estudio, a través de reacciones químicas se investigo la presencia de polifenoles, flavonoides, saponinas, triterpenos y taninos.

2.3.4.1 Detección de Saponinas:

Se realizo según el ensayo con agua caliente; para el cual una parte del extracto se disolvió en agua caliente durante 15-30 min luego se agitó durante 3-5 min. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja estable por 30 min se considero como positiva la presencia de saponinas en la muestra. . (Bruneton, J., Villar del Fresno, A. M., 2001)

2.3.4.2 Detección de flavonoides:

Se realizo mediante dos ensayos distintos:

- la reacción con vapores de amoníaco. Se diluyo una porción del extracto en etanol, se impregno en una tira de papel de filtro y se seco a temperatura ambiente, sometiéndolo luego a vapores de amoniaco. El desarrollo de una coloración amarillo ocre se considero positiva la presencia de flavonoides en la muestra.
- reacción con hidróxido de sodio. A una porción del extracto se le agrego unas gotas de hidróxido de sodio diluido. La aparición de color amarillo o naranja fue considerada como positiva la presencia de flavonoides en la muestra.

(Bruneton, J., Villar del Fresno, A. M., 2001)

2.3.4.3 Detección de Triterpenos:

Una parte del extracto se disolvió en 1 ml de cloroformo. Se agrego por las paredes del tubo 1 ml de anhídrido acético y se deja reposar en frio. El color rojo, rosa, verde, purpura o azul en la interfase cuando se añade 1 o 2 gotas de acido sulfúrico concentrado, se considera positiva la presencia de triterpenos en la muestra. (Bruneton, J., Villar del Fresno, A. M., 2001)

2.3.4.4 Detección de polifenoles, taninos y sustancias proteicas:

Se coloco en un tubo 4 ml del extracto y se le agrego gotas de acetato de plomo, la aparición de un precipitado negro se tomo como positivo a la presencia de alguna de estos compuestos en la muestra. (Bruneton, J., Villar del Fresno, A. M., 2001)

2.3.4.5 Detección de Taninos:

A 4 ml de extracto vegetal se le agregaron gotas de solución de $FeCl_3$, una coloración azul, verde o parda indica la presencia de taninos en la muestra. (Bruneton, J., Villar del Fresno, A. M., 2001)

2.4 Cultivo y caracterización *Trichomonas foetus*

Los aislamientos de *T. foetus* se cultivaron en medio Diamond y se confirmaron mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

El medio de cultivo contiene 0.2 % de peptona, 0.1 extracto de levadura, 0,05 % glucosa, 0,001 % L-cysteina, 0,5 % de agar y 12% de suero equino. Para la axenización se

empleó clindamicina (25 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y ciprofloxacina (60 µg/ml) y luego se cultivaron en presencia de gentamicina (50 µg/ml) y nistatina (50 µg/ml). Los microorganismos se evalúan por su aspecto y movilidad al microscopio óptico.

Fue realizada una curva de crecimiento para los aislamientos GM069 y GM075 en triplicata durante tiempo de 5 días, conforme se muestra en la Figura 2.

Para la confirmación de la especie se emplean dos reacciones de PCR que consisten en la amplificación de un fragmento que incluye la región 5.8S del gen ribosomal, y las regiones circundantes, ITS1 e ITS2. Un par de oligonucleótidos, TF1 y TF2 (Hayes et al. 2003. J Vet Diagn Invest 15:390–394), amplifican ADN de protozoos conocidos del orden tricomonadida (*T. foetus*, *Trichomonas vaginalis*, *Tetratrichomonas sp*, *Pentatrichomonas hominis*, *Monocercomonas sp*, *Hypotrichomonas sp*) y un par de oligos, TF3-TF4 (Felleisen et al. 1998. J Clin Microbiol. p. 513–519), amplifica específicamente ADN de *T. foetus*. La PCR con ADN de *T. foetus* da fragmentos de 371 pb (pares de bases) con el par TF1-TF2 y 347 pb con el par TF3-TF4 (figura 1).

Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 25 µl conteniendo 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 0.5 µM TFR primers, 140 µM de cada dNTP, 2 U of Taq DNA polymerase (PBL, Quilmes) y 2.5 µl de ADN genómico. La amplificación incluyó 36 ciclos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos, una hibridación a 67°C, 30 segundos, y una extensión a 72°C, 90 segundos, con una extensión final de 15 minutos a 72°C. Finalizada la amplificación se agregaron 6 µl of 6X loading buffer y corrieron 8 µL de la mix final en gel de agarosa al 2% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio.

2.5 Estudios de actividad biológica

2.5.1 Evaluación de la actividad trichomonocida.

Una concentración aproximada de 10⁵ parásitos se sembró en 20 ml de medio Diamond y cultivó a temperatura ambiente (25-28°C) durante 48-72 h. Cuando el cultivo alcanzó una concentración de 4.10⁷-10⁸ células por mililitro, estas se centrifugaron a 1500 xg por 10 minutos, y lavaron dos veces en medio fresco sin suero. Luego, las células se suspendieron en medio con suero a una concentración de 4.10⁶ células por mililitro y distribuyeron en microplacas de 96 pocillos a una concentración de 2.10⁵ parásitos/pocillo (50 µl por pocillo). Cada pocillo recibió entonces 50 µl de medio completo conteniendo

diferentes concentraciones de extractos (50-400 µg/ml). Las placas con parásitos y extractos se incubaron entonces 72 horas a temperatura ambiente.

La inhibición del crecimiento se evaluó mediante conteo de células móviles en cámara de Malassez y por absorbancia ($A_{570 \text{ nm}}$, absorción máxima del producto de reacción, la resofurina) tras 4 h de incubación con 20 µl de resazurina (Sigma) de concentración final 15 µg/ml. Como controles negativos de la experiencia las células se incubaron en presencia de medio sin aditivos (crecimiento normal), y de medio con 1% metanol o medio con 1% DMSO (crecimiento en presencia de vehículo). Como control positivo de inhibición de crecimiento se emplearon dosis crecientes de Metronidazol (0-100 µg/ml). Las pruebas se realizaron por duplicado durante la optimización y luego por triplicado. En adición, fue realizada la técnica colorimétrica de la resazurina y *T. foetus*, de forma previa a la evaluación de los extractos, conforme se demuestra en la Figura 3 en la sección de los resultados.

2.5.2 Determinación del poder antioxidante

El poder antioxidante fue determinado de acuerdo al método establecido por Blois 1958, con algunas modificaciones. Se utilizó una solución metanólica del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), y como patrón positivo rutina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Las muestras fueron leídas a 517 nm y los resultados expresos en porcentaje de DPPH (%).

$$\% \text{ de inhibición} = [1 - (\text{Absorbancia de la muestra}/\text{Absorbancia del blanco})] \times 100$$

2.5.3 Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza de una vía (ANOVA). Todos los datos se expresaron como media ± error estadístico.

3. RESULTADOS

3.1 Especies vegetales

3.1.1 Rendimiento

En el presente trabajo, se han estudiado 7 plantas de la región semiárida de la Provincia de La Pampa. Como los principios activos a extraer se encuentran disueltos en el citoplasma de la célula vegetal o formando sales que se encuentran incrustadas en la célula, para facilitar su extracción, la droga fue sometida a un proceso de troceado que destruye las estructuras que los contienen, facilitando el rendimiento de la extracción. De cada una de estas especies vegetales se prepararon extractos orgánicos, obteniéndose un total de 14 extractos: 7 de metanol y 7 de diclorometano. En la Tabla 1 se muestran los rendimientos obtenidos.

Tabla 1: Rendimientos de extracción de plantas vegetales.

Especie vegetal	Disolvente	Peso (g)	Peso del extracto (g)	% Rendimiento
Anacardiaceae	Metanol	3,7549	1,9167	51,04
	Diclorometano	4,3704	1,5785	36,12
Ephedraceae	Metanol	9,0274	1,1907	13,19
	Diclorometano	11,1076	1,4404	12,97
Ramnáceas	Metanol	1,4210	0,4972	34,99
	Diclorometano	1,5995	0,1150	7,19
Asteraceae	Metanol	3,4958	1,9548	55,92
	Diclorometano	3,7379	1,0644	28,47
Zygophyllaceae	Metanol	5,8435	2,305	39,44
	Diclorometano	6,9011	2,203	31,92
Zygophyllaceae	Metanol	2,6242	1,4518	55,32
	Diclorometano	2,8943	1,2707	43,90
Leguminosae	Metanol	7,6959	1,9791	25,72
	Diclorometano	9,5636	0,7567	7,91

Según estos resultados, se puede observar que, de los extractos metanólicos el de mayor rendimiento fue la familia Asteraceae (55,92 %); mientras que para los extractos de diclorometano fue la familia Zygophyllaceae (43,90%).

3.1.2 Estudio fitoquímico

La investigación fitoquímica, permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en el vegetal y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de color y precipitación. Permite la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Diversos métodos están descritos en la literatura. Algunos evalúan grupos de sustancias (polifenoles), otros evalúan la presencia de compuestos de poco interés (ex. ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos, mucílagos). En éste trabajo se realizaron una batería de ensayos fitoquímicos a las hojas secas y trituradas de las diferentes especies colectadas, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de los ensayos fitoquímicos

Metabolitos	Extracto	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	
Saponinas	CH ₃ OH	+	+	-	-	+	+	+	
	CH ₂ Cl ₂	-	-	-	-	-	-	-	
Flavonóides (NaOH) (NH ₃)	CH ₃ OH	+	+	+	+	+	+	+	
		+	+	+	+	+	+	+	
	CH ₂ Cl ₂	(NaOH)	-	-	+	+	+	+	+
		(NH ₃)	-	-	+	+	+	+	-
Triterpenos	CH ₃ OH	-	+	-	-	+	+	-	
	CH ₂ Cl ₂	+	+	+	-	+	+	-	
Polifenoles Taninos Sustancias Protéicas	CH ₃ OH	-	-	-	+	+	+	+	
	CH ₂ Cl ₂	-	-	-	-	-	+	-	
Taninos	CH ₃ OH	+	+	+	+	+	+	+	
	CH ₂ Cl ₂	-	-	-	+	+	+	-	

NaOH: reacción con hidróxido de Na. NH₃: reacción con vapores de amoníaco.

Los resultados del screening fitoquímico constituyen únicamente una orientación, dado que proporciona datos preliminares sobre los constituyentes químicos de la planta que, junto con los resultados del tamizaje farmacológico, pueden orientar la continuación de los estudios.

3.2 Cultivo e identificación de las cepas

Las cepas de *T. foetus* provenientes de diferentes laboratorios de la provincia, han sido cultivadas y caracterizadas con técnica estándar y visualización microscópica. También fue realizada con éxito la identificación molecular por PCR para diferenciar *T. foetus* de otras *trichomonas* (figura 1). En función de los datos preliminares obtenidos, consideramos que la técnica de cultivo expuesta es adecuada y susceptible de ser mejorada.

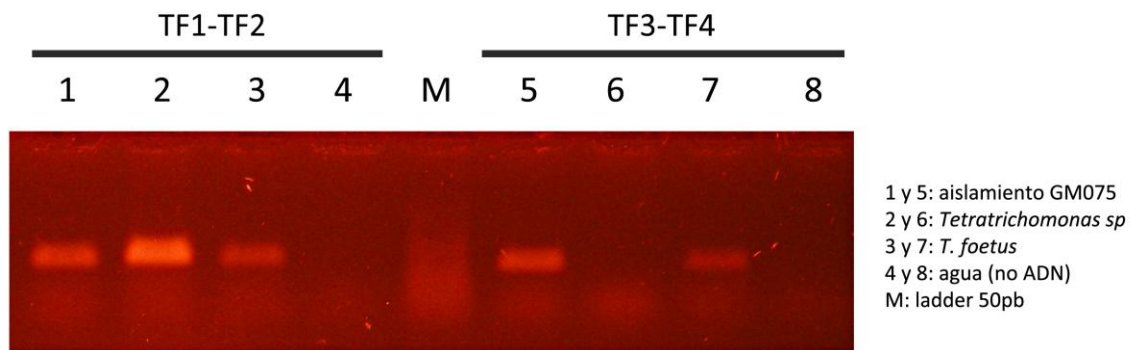


Figura 1. Resultados de PCR con ADN de *T. foetus*. Para confirmar la identidad del aislamiento GM075 como *T. foetus* se realizaron dos reacciones de PCR, una con primers TF1-TF2 y otra con primers TF3-TF4. La reacción positiva con primers TF1-TF2 (calle 1) indica que pertenece al orden Tricomonadida (al igual que los dos controles positivos, *Tetratrichomonas sp* y *T. foetus*, en las calles 2 y 3), la reacción positiva con primers TF3-TF4 (calle 5) confirma su pertenencia a la especie *T. foetus*.

3.3 Estudios de actividad biológica

3.3.1 Evaluación de la actividad trichomonocida en extractos naturales

Para el screening se emplearon dos aislamientos de *T. foetus* (GM069 y GM075). Ambas líneas demostraron velocidades de crecimiento semejantes y sensibilidad al metronidazol.

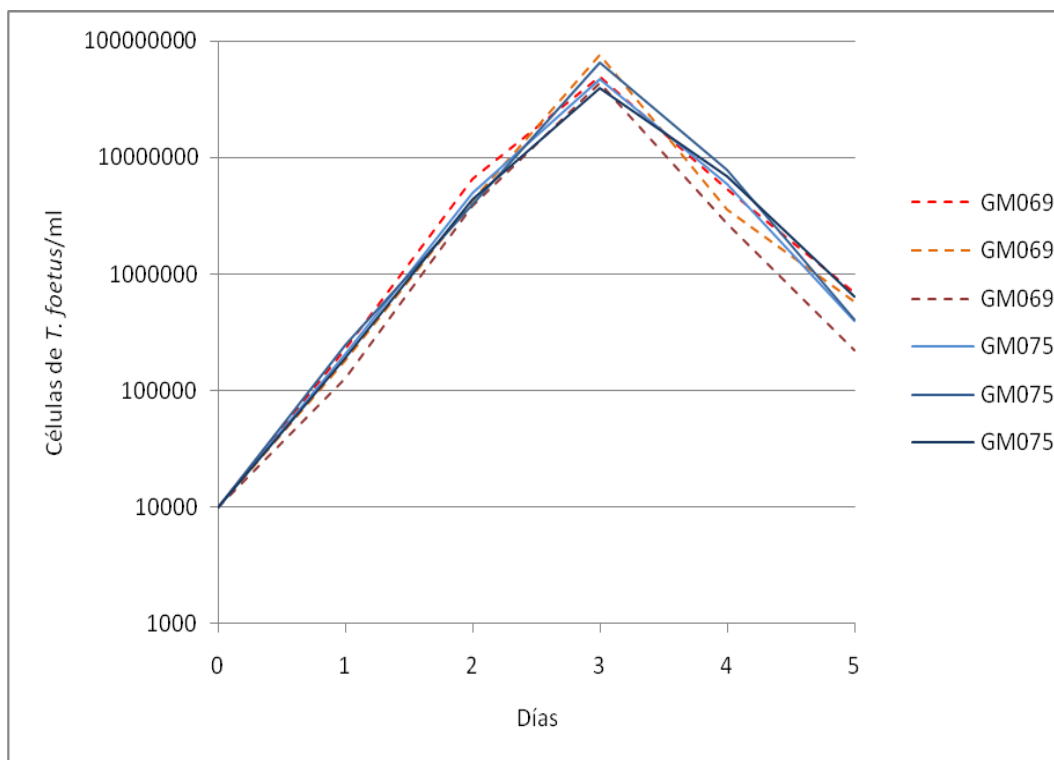


Figura 2: Curva de crecimiento de células de *T. foetus* de tres cultivos para cada una de las líneas celulares, evaluadas por conteo. Dichos aislamientos se obtuvieron de diferentes regiones de la provincia de La Pampa.

Para poder evaluar la actividad trichomonocida de los distintos extractos, se evaluó la actividad de la resazurina a distintas concentraciones de células, obteniendo lo siguiente:

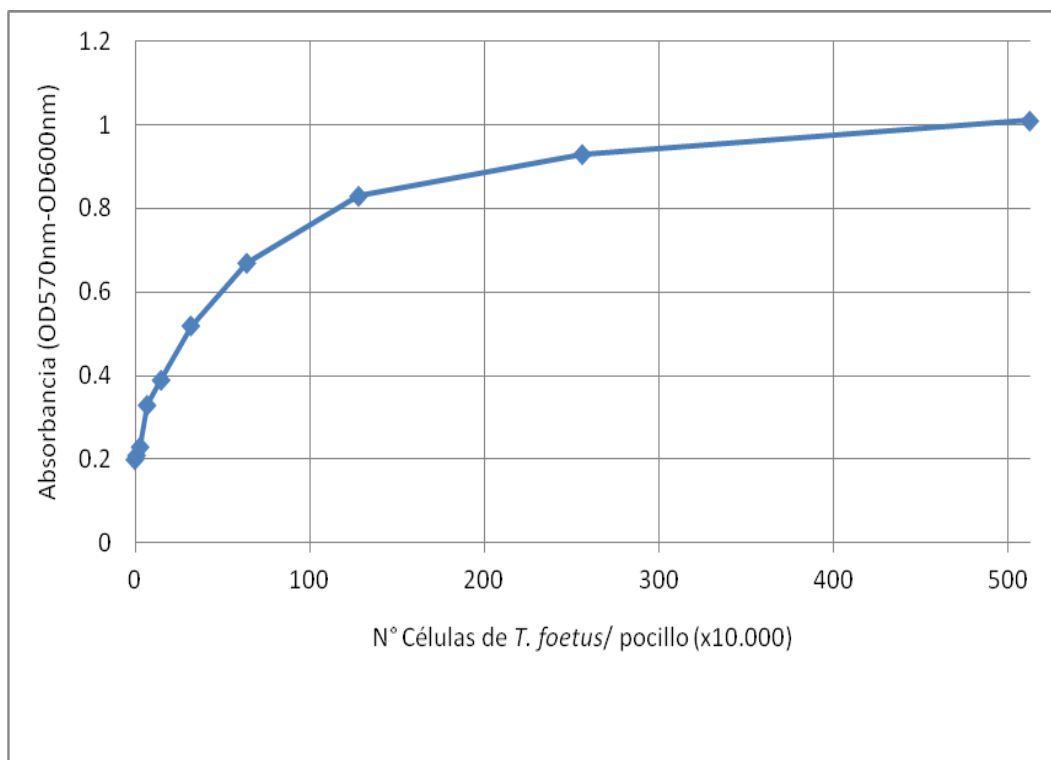


Figura 3: Medidas de Absorbancia de resazurina según la concentración de células.

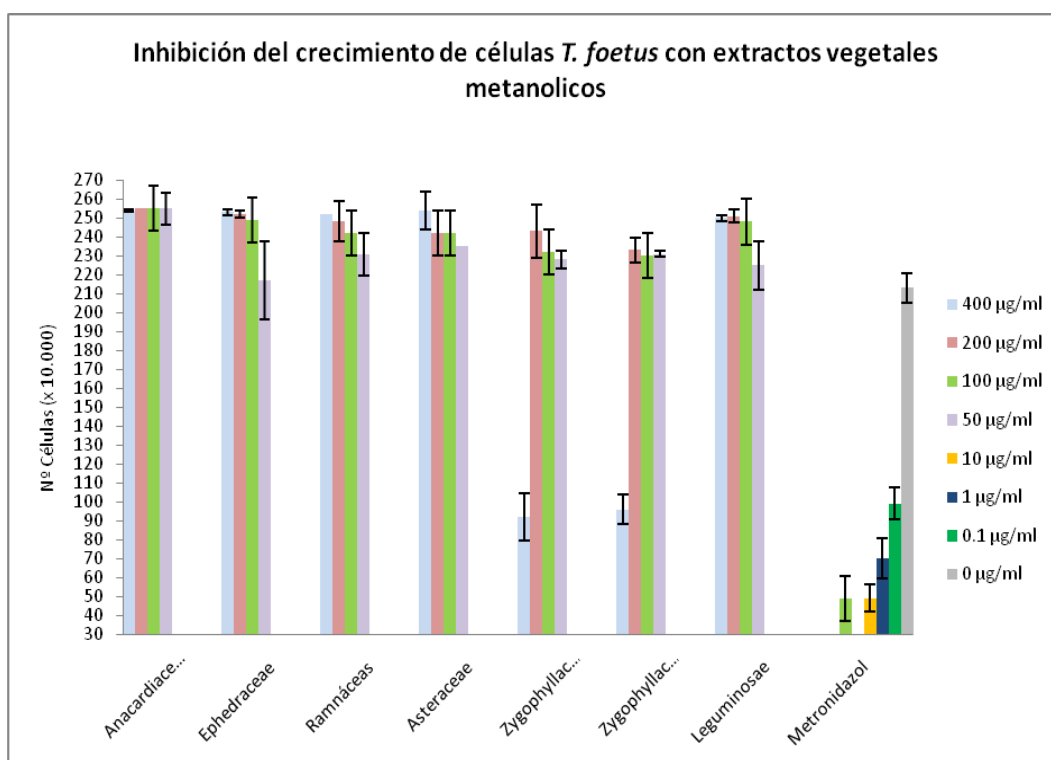


Figura 4: Inhibición del crecimiento de células *T. foetus* con los extractos vegetales metanólicos, mediante resazurina. Control: metronidazol. Todos los datos se expresaron como media \pm error estándar.

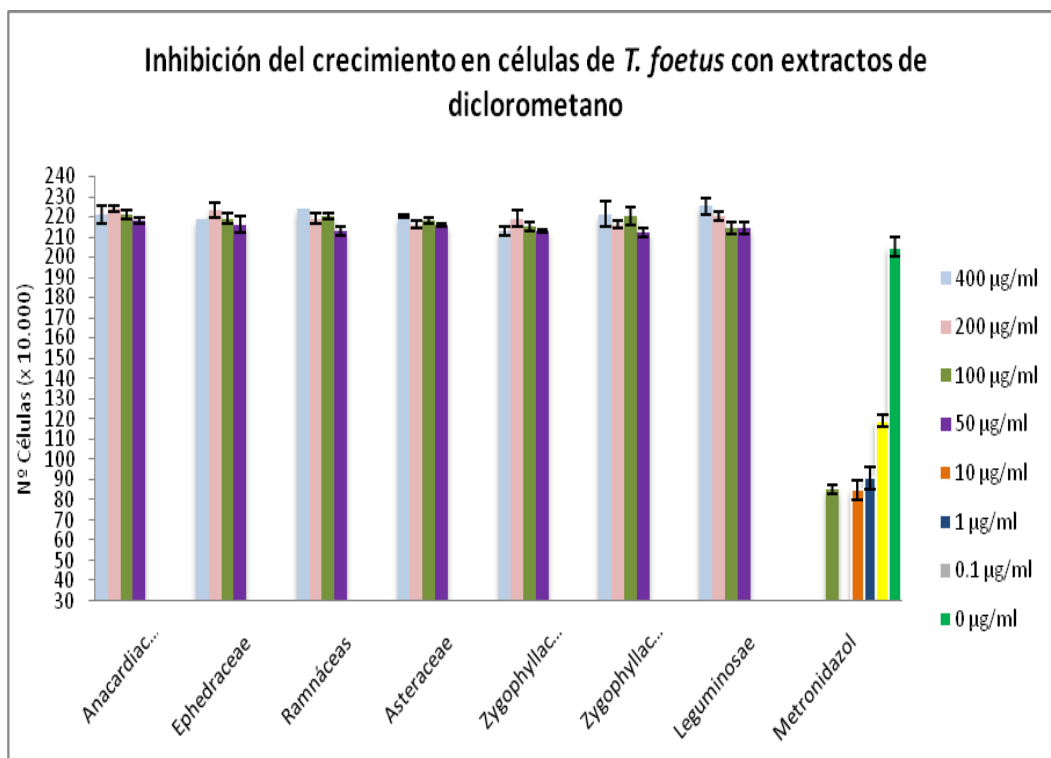


Figura 5: Inhibición del crecimiento de células *T.foetus* con extractos de diclorometano, mediante resazurina. Control: metronidazol. Todos los datos se expresaron como media \pm error estándar.

Entre los extractos metanólicos evaluados se hallaron dos con débil actividad inhibitoria a la máxima concentración (400 ug/ml). Se refiere esta actividad como débil dado que se observó durante un breve lapso de tiempo y no inhibe por completo el crecimiento de las células. El conteo de células móviles en estos pocillos arrojó una reducción de microorganismos cercana al 50 % con la planta 5 y 60 % con la planta 6 (Zygophyllaceae). Entre los extractos obtenidos con diclorometano no se observó inhibición en el crecimiento.

3.3.2 Evaluación del efecto antioxidante

Se sometieron a este ensayo todos los extractos filtrados con el objeto de determinar si presentaban o no poder antioxidante, se utilizó como control positivo a la rutina.

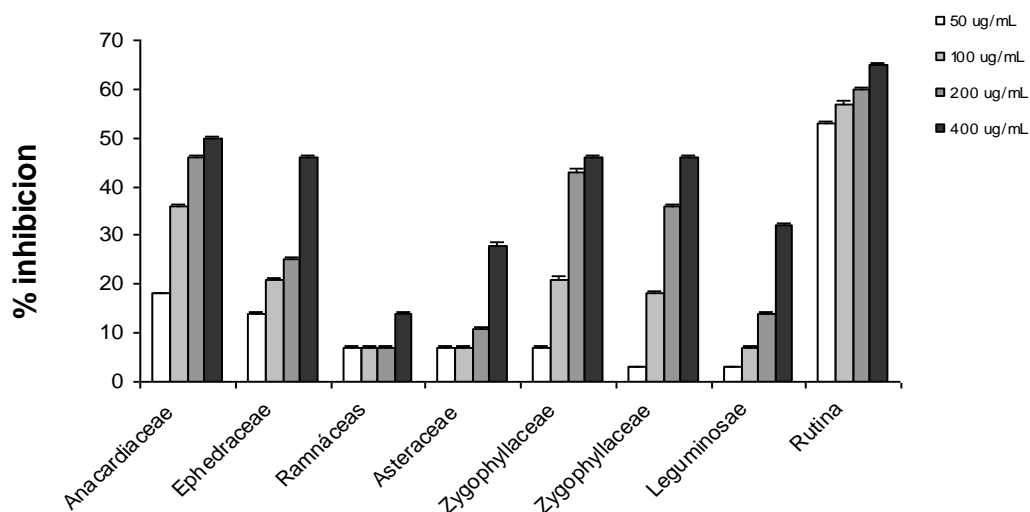


Figura 6. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos obtenidos a partir de 7 plantas presentes en la región semiárida Pampeana. Las muestras fueron incubadas con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por 30 min (517 nm). Como control positivo se utilizó rutina. Todos los datos se expresaron como media \pm error estándar.

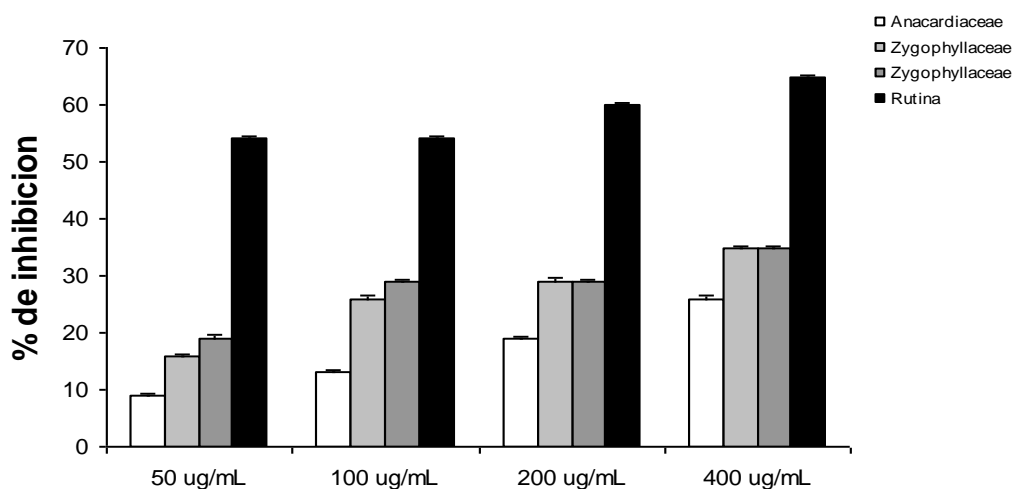


Figura 7. Actividad antioxidante de los extractos diclorometano obtenidos a partir de las diferentes especies colectadas en la región semiárida Pampeana. Las muestras fueron incubadas con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por 30 min (517 nm). Como control positivo se utilizó rutina. Todos los datos se expresaron como media \pm error estándar.

Se observó que la mayor parte de los extractos metanólicos de las plantas evaluadas presentan una importante capacidad antioxidante. Los máximos porcentajes de inhibición

para la concentración de 400 µg/mL fueron: P1 50%, P2 46%, P3 14%, P4 28%, P5 46%, P6 46%, P7 32% con relación a la sustancia de referencia rutina, 65% en la misma concentración. Las actividades que se reportan son semejantes entre sí, sin embargo, los resultados de la planta 3 (Ramnáceas) están por debajo de los mismos debidos probablemente a un error operacional.

Con relación a los extractos diclorometano, únicamente los obtenidos a partir de las plantas 1, 5 y 6 (Anacardiaceae, Zygophyllaceae), poseen la capacidad de inhibir los radicales libres, los valores oscilan entre 26 a 35 % de inhibición comparados con la rutina que presenta 65% en la mayor concentración testada (400 µg/mL).

4. DISCUSIÓN

Considerando que el arte de la medicina popular entre las poblaciones nativas esta en rápido declive, debido al cambio de modo de vida del pueblo, tratamos de librar una batalla contra el tiempo para recoger esas informaciones antes de que se pierdan con las actuales generaciones, siendo un posible atajo para llegar a algunas plantas con potencial medicinal. Siguiendo esta metodología, la selección de las especies vegetales para este trabajo se realizó con criterios etnofarmacológicos (Rios 1998). De esta manera, fue direccionada la colección del material vegetal y la subsecuente determinación de la actividad biológica. Adicionalmente, utilizamos los criterios de selección al azar y quimiotaxonómicos. En este último, el conocimiento de un grupo particular de plantas conteniendo una cierta clase de productos naturales puede ser utilizado para predecir plantas taxonómicamente relacionadas, las cuales pueden contener compuestos estructuralmente similares (Clavin et al., 2007; Martínez Crovetto 1968).

Este criterio es bastante utilizado cuando la química y la actividad biológica de algunos compuestos son conocidos, requiriendo estructura química similar para el desarrollo de ensayos biológicos. El criterio aleatorio o al azar se utiliza con plantas a las cuales no se les conoce su química o actividad biológica pero que son disponibles y abundantes en una determinada área (Toursarkissian, 1980; Newman et al., 2007).

En las investigaciones actuales sobre nuevos fármacos que posean actividad antiparasitaria por ejemplo, las plantas implicadas salvo algunas de las más tradicionales, con frecuencia no poseen indicaciones inmediatas de su actividad farmacológica. En consecuencia, nos enfrentamos al problema de realizar una investigación sistemática entre numerosas especies aun no estudiadas.

La cantidad del material utilizado para la prospección ha sido pequeña y los procedimientos se programaron para utilizar el material bruto, en éste caso extractos de plantas obtenidos con dos solventes de diferentes polaridades. En el análisis del perfil químico de los 14 extractos se observa que todos los extractos metanolicos presentan flavonoides y taninos, también fueron detectadas saponinas, triterpenos y otros compuestos fenólicos en la mayoría de los extractos estudiados (Tabla 2). Estos datos nos proporcionan una idea del tipo de compuestos que pueden ser responsables de la actividad biológica observada.

La actividad antioxidante de los extractos brutos fue determinada por el ensayo con el radical DPPH, y los resultados se presentan en la figura 6 y 7. Los datos obtenidos demuestran que la rutina en las concentraciones de 50 a 400 µg/mL, presenta mayor

actividad antioxidante (65 %) en comparación con todos los extractos brutos obtenidos. Tanto con metanol (14 a 50 %) como con diclorometano (26 a 35%).

La propiedad antioxidante de los polifenoles, es influenciada por el número y posición de los grupos OH, así como por las posiciones de glicosilación (Heim 2005). Siendo que el CH₂Cl₂, extrae compuestos de menor polaridad como los flavonoides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos y cumarinas.

De acuerdo con la prospección fitoquímica realizada en éste trabajo, nosotros sugerimos que la actividad antioxidante de los extractos metanolicos podría estar relacionada con la presencia de compuestos polifenólicos, como los flavonoides (C6-C3-C6), presentes en todas las especies estudiadas conforme se demuestra en la Tabla 2. La capacidad antioxidante de estos compuestos es atribuida al poder reductor del grupo hidroxilo aromático, que reduce radicales libres reactivos y produce el radical fenoxilo estabilizado por resonancia (Clavin et al., 2007, Scalbert et al., 2005).

En este trabajo hemos realizado la recolección de las plantas silvestres de forma controlada y planificada para evitar, la recolección indiscriminada e inadecuada que impida el posterior desarrollo de la especie o que altere a otras especies. La misma fue hecha de forma manual siendo éste método más selectivo y artesanal, y generalmente acompañados por personal nativo de la zona.

A partir del material colectado, se realizo la prospección química el cual constituye una de las etapas iniciales en la investigación sobre plantas de interés medicinal. Conforme las normas internacionales de reglamentación, se han aplicado un conjunto de técnicas y procedimientos relativamente simples y poco costosos que permiten evaluar de forma segura y reproducible la posible acción farmacológica.

Con relación a la actividad tricomonocida, se observo que apenas los extractos metanolicos crudos que corresponden a la familia Zygothylaceae (Plantas 5 y 6), presentaron una débil actividad tricomonocida (Figura 4). Considerando que el objetivo de éste estudio fue provocar la muerte del parasito, sugerimos que no existen diferencias significativas entre los mismos con relación al antiparasitario metronidazol, utilizado como referencia.

Nosotros sugerimos que estos resultados, están relacionados con las dosis evaluadas (p/v), o sea, las mismas no contendrían la cantidad adecuada de principios bioactivos necesarios para ejercer una función tricomonocida. Por ese motivo consideramos necesario continuar testando otras dosis y realizar la determinación cuantitativa de los compuestos presentes en los extractos.

5. CONCLUSIONES

Los resultados constituyen un primer estudio exploratorio de caracterización química de los extractos brutos obtenidos, considerando necesario complementarlo con otros estudios con el objeto de aislar e identificar los compuestos responsables de las actividades aquí investigadas. El estudio de la actividad trichomonocida de los extractos arroja resultados interesantes, que requieren mayores estudios ya que no hay reportes en la literatura del empleo de éstas especies como antiprotozoarios.

También se demostró que todas las especies evaluadas presentan actividad antioxidante. Sugerimos que la misma está relacionada con la presencia de compuestos polifenólicos, como los flavonoides moléculas reconocidas hace mucho tiempo por poseer esta actividad biológica. En conclusión, este trabajo reafirma la importancia de los datos etnofarmacológicos en la selección de especies vegetales de la flora regional, algunas de ellas, utilizados en la medicina popular.

6. REFERENCIAS

- Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* ;181:1199–1200.
- Bondurant, R.H., (1997). Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. *Vet. Clin. of N. America: Food animal practice* 13, 2: 345-361.
- Bruneton, Jean, Villar del Fresno, Angel María. 2001. *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales*. Editorial Acribia, S.A.
- Campero, C.M., Cobo, E.R. (2006). *Tritrichomonas foetus*: patogénesis de la mortalidad embrionaria / fetal, caracterización de antígenos vacunales y respuesta inmune inducida *Rev Med Vet Bs As.* 87: 47-56.
- Carvalho, K. P., Gadelha, A. P. R. (2007). Effects of three benzimidazole on growth, general morphology and ultrastructure of *Tritrichomonas foetus*. *Microbiol Lett* 275 292-300.
- Casais de Corne A.; Fiz Fernández A. y Lardiez González J. (1977) *Panorama Histórico de la Medicina Argentina. Todo es Historia*.
- Clark, B.L.; Dufty, J.H.; Parsonson, I.M., (1983) (b). The effect of *Tritrichomonas foetus* infection on calving rates in beef cattle. *Aust. Vet. J.* 60: 71-74.
- Clavin, M., Gorzalczany, S., Macho, A., Munoz, E., Ferraro, G., Acevedo, C., Martino, V. (2007). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *Journal of Ethnopharmacology* 112 585–589
- Cobo, E.R., Campero, C.M. (2002). Nuevos aspectos inmunológicos y vacunales de la tricomoniasis bovina. *Rev. Med. Vet. Bs. As.* 83: 203-208.
- Cobo, E.R., Cano, D., Rossetti, O., Campero, C.M. (2002). Heifers immunized with whole-cell and membrane vaccines against *Tritrichomonas foetus* and naturally challenged with an infected bull. *Vet Parasitol.* 11;109(3-4):169-84.
- Debenedetti, S., Muschietti, L., Van Baren, C., Clavin, M., Broussalis, A., Martino, V., Houghton, P., Warhust, D., Steele, J. (2002). In vitro antiplasmodial activity of extracts of Argentinian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 2–3
- der Heijden, R., Jacobs, D.I., Snoeijer, W., Hallard, D., Verpoorte, R. (2004). *The Catharanthus Alkaloids: Pharmacognosy and Biotechnology*. *Current Medicinal Chemistry*. 11: 607-628.
- Dewick, P. M. (2002) *Medicinal natural products, A biosynthetic Approach*. 2ª edition. Ed. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Evans, W.C. (2002). *Trease and Evans Pharmacognosy*. 15ª edition. Ed. Saunder. Edinburg.

- Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry cell biology molecular regulation and metabolic engineering applications. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:29–66.
- Fontana, D., Uema, S., Mazzieri, M. (2005). Medicamentos huérfanos: Una revisión necesaria para un problema sanitario no resuelto. *Act. Farm. Bonaerense*, 24,1- 7.
- Geneva, (1998) “Quality Control methods for plant materials”. World Health Organization. Suiza
- Heim, K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya, D.J. (2005) Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* x 13(10):572–84.
- Kinghorn, D. (2002). The Role of Pharmacognosy in Modern Medine. *Expert. Opin. Pharmacother.* 3: 77-79.
- Mancebo, O.A.; Russo, A.M.; Carabajal L.L.; Monzon, C.M., (1995). Persistence of *Tritrichomona foetus* in naturally infected cows and heifers in Argentina. *Vet. Par.* 59: 7-11.
- Martínez Crovetto R. Estudios etnobotánicos III. (1968). Nombres de plantas y su utilidad, según los indios araucano. pampas del oeste de Buenos Aires (República Argentina) *Etnobiológica*,12: 1-24
- Mongelli, E., Pomilio, A. B., Sanchez, J. B., Guerra, F. M., & Massanet, G. M. (2002). ent-Kaur-16-en-19-oic acid, a KB cells cytotoxic diterpenoid from *Elaeoselinum foetidum*. *Phytotherapy Research*, 16, 387-388.
- Newman, D. J., y Cragg, G. M. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*.
- Rhyan, J.C.; Stakehouse, L.L.; Quinn, W.J., (1988). Fetal and placental lesions in bovine abortion due to *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Pathol.* 25: 350-355.
- Rios JL, Recio MC, Villar A. (1998). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of a literature. *J Ethnopharmacol*; 23: 127-49.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., y Saltmarsh, M. (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*;81(suppl):215S–7S.
- Singh BN, BonDurant RH, Campero CM, Corbeil LB. (2001). Immunological and biochemical analysis of glycosylated surface antigens and lipophosphoglycan of *Tritrichomonas foetus*. *J Parasitol.* 87(4):770-7.).
- Soraru S.B. y Bandoni A.L. (1978) Plantas de la medicina popular.Guía ilustrada de las cincuenta plantas indígenas más empleadas. Ed. Albatros Buenos Aires.

- Talley, D. L. y otros (2001). Development of a sensitive, high throughput, cell based assay for use in validation of powered cell cultura médium blenders.
- Toursarkissian, M., (1980). Plantas Medicinales Argentinas. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, p. 31.
- Verpoorte, R. (2000) Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology. J. Pharm. Pharmacol. 52: 253-262.