



**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado.
Doctorado en Farmacia**

Doctorando
Carlos G. Altamirano

**Efecto antiproliferativo de extractos de
Acanthospermum australe (Loefl) Kunze
(Asteraceae) y Polygonum hydropiperoides
Michaux (Polygonaceae)**

**Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de
“Doctor en Farmacia”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Directora
Dra. Marta Yajía
Co-Director
Dr. Pedro Darío Zapata

Posadas, Misiones 2020



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

DOCTORADO REGIONAL EN FARMACIA
(UNT-UNCAus-UNaM)



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,
QUÍMICAS Y NATURALES

**Efecto antiproliferativo de
extractos de *Acanthospermum
australe* (Loefl) Kunze
(Asteraceae) y *Polygonum
hydropiperoides* Michaux
(Polygonaceae).**

DOCTORANDO
CARLOS G. ALTAMIRANO

DIRECTORA
DRA. MARTA YAJÍA

CO-DIRECTOR
DR. PEDRO ZAPATA

2020



Resumen

Las plantas han sido fuente de medicamentos desde la antigüedad. Actualmente el cáncer es una enfermedad ocasionada por múltiples factores, que aún no cuenta con una alternativa terapéutica eficiente, por lo que las plantas medicinales aún son utilizadas, aunque muchas de ellas no cuentan con evidencia científica. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto antiproliferativo de extractos de *Acanthospermum australe* y *Polygonum hydropiperoides*, especies utilizadas en forma empírica para el tratamiento del cáncer, sobre líneas tumorales de mama y hueso (MCF-7, MG-63 y MDA-MD-231). Se tratan principalmente los siguientes aspectos: 1) La selección de las especies según los relevamientos etnobotánicos, dando como resultado *Acanthospermum australe* (Loefl) Kunze (Asteraceae) y *Polygonum hydropiperoides* Michaux (Polygonaceae) especies vegetales vasculares utilizadas en forma empírica para el tratamiento de enfermedades neoplásicas; 2) la recolección e identificación botánica de las mismas, fueron recolectadas en la Ciudad de Posadas e identificadas valiéndose de herramientas taxonómicas y técnicas histológicas de rutina. En la búsqueda de las especies en los diferentes circuitos de comercialización de la Ciudad de Posadas, se encontró que *P. hydropiperoides* es comúnmente confundida con *P. punctatum*, por lo que ambas son comercializadas atribuyéndose las mismas propiedades medicinales. Se realizaron análisis micrográficos de las especies en cuestión, por medio de técnicas histológicas de rutina. 3) Estudios genotóxicos de ambas especies: Los estudios de toxicidad general y genotoxicidad, fueron realizados mediante el test de *Allium cepa*, donde fueron ensayadas diferentes concentraciones, dando como resultado efectos genotóxicos a concentraciones muy superiores a las utilizadas en la medicina tradicional. El criterio para la selección de dichas concentraciones fue que la probabilidad de encontrar efectos genotóxicos es mayor en concentraciones superiores a la concentración 50. 4) Extracción: se obtuvieron extractos de diferentes mezclas hidroalcohólicas mediante maceración a temperatura ambiente para cada especie y posteriormente se concentraron los extractos en rotavapor, hasta la obtención de extractos secos. Se calcularon los rendimientos para los cuatro (4) extractos obtenidos para cada especie. 5) Estudios Químicos: Los extractos, se analizaron mediante cromatografía en capa delgada (TLC). Se seleccionó el extracto más enriquecido de cada especie para separarlos en fracciones mediante cromatografía en columna. Para finalizar esta etapa, los extractos y sus fracciones se analizaron mediante HPLC-DAD (acoplado a detector de diodos). 6) Estudios biológicos: Para evaluar la actividad biológica de los extractos crudos y sus fracciones mediante el ensayo de MTT, se seleccionaron 3 líneas celulares tumorales MCF-7 (carcinoma de mama), MG-63 (Osteosarcoma) y MDA-MD-231 (carcinoma de mama triple negativo). Finalmente, el extracto crudo de *P. hydropiperoides* no demostró actividad significativa, por lo que el uso de sus fracciones quedo desestimado. Sin embargo, el extracto crudo de *A. australe* fue activo frente a las 3 líneas tumorales probadas. La línea MDA, el estadio más agresivo del carcinoma de mama, fue la más sensible al extracto. En base a estos resultados, fueron probadas todas las fracciones del extracto crudo de *A. australe*, observándose que la actividad de debe principalmente a las fracciones 1 y 2. Comparando los perfiles de HPLC-DAD del extracto crudo y de las 6 fracciones se observó que comparten un pico de intensidad variable con un tiempo de retención comprendido entre 51-52 min, por lo que quizás la actividad observada podría estar relacionada con este pico.

Abstract

Plants have been a source of medications since ancient times. Currently, cancer is a disease caused by multiple factors, which does not yet have an efficient therapeutic alternative, so medicinal plants are still used, although many of them do not have scientific evidence. The objective of the present work was to study the antiproliferative effect of extracts of *Acanthospermum australe* and *Polygonum hydropiperoides*, species used empirically for cancer treatment, on tumor lines of breast and bone on tumor lines (MCF-7, MG-63 and MDA-MD-231). The following aspects are treated: 1) The selection of species according to ethnobotanical surveys, resulting in *Acanthospermum australe* (Loefl) Kunze (Asteraceae) and *Polygonum hydropiperoides* Michaux (Polygonaceae) vascular plant species used empirically for the treatment of neoplastic diseases; 2) The collection and botanical identification of the same, were collected in the City of Posadas and identified using taxonomic tools and routine histological techniques. In the search of the species in the different marketing circuits of the City of Posadas, it was found that *P. hydropiperoides* is commonly confused with *P. punctatum*, so both are marketed attributing the same medicinal properties to them. Micrographic analyzes of the species in question were carried out, by means of routine histological techniques. 3) Genotoxic studies of both species: The studies of general toxicity and genotoxicity were carried out using the *Allium cepa* test, where different doses were tested, resulting in genotoxic effects at doses much higher than those used in traditional medicine. The criterion for the selection of these doses was that the probability of finding genotoxic effects is greater in doses higher than the dose 50. 4) Extraction: extracts of different hydroalcoholic mixtures were obtained by maceration at room temperature for each species and then the extracts were concentrated in a rotary evaporator, until obtaining dry extracts. The yields were calculated for the four (4) extracts obtained for each species. 5) Chemical Studies: The extracts obtained were analyzed by thin layer chromatography (TLC). The most enriched extract of each species was selected to be separated into fractions by column chromatography. To complete this stage, the extracts and their fractions were analyzed by HPLC-DAD (coupled to a diode detector). 6) Biological studies: To evaluate the biological activity of the crude extracts and their fractions by the MTT assay, 3 tumor cell lines MCF-7 (breast carcinoma), MG-63 (Osteosarcoma) and MDA-MD-231 were selected. (triple negative breast carcinoma). Finally, the crude extract of *P. hydropiperoides* showed no significant activity, so the use of its fractions was underestimated. However, the crude extract of *A. australe* was active against the 3 tumor lines tested. The MDA line, the most aggressive stage of breast carcinoma, was the most sensitive to the extract. Based on these results, all the fractions of the crude extract of *A. australe* were tested, observing that the activity of the extract is mainly due to fractions 1 and 2. Comparing the HPLC-DAD profiles of the crude extract and the 6 fractions was observed that share a peak of variable intensity with a retention time comprised between 51-52 min, so perhaps the activity observed could be related to this peak.

Agradecimientos

- Principalmente a **Dios**, mediante quien pude lograr este gran desafío.
- Profundamente a mi esposa **Gabriela**, nuestros hermosos hijos **Carlitos**, y ahora nuestro pequeño **Gustavito**, por haberme aguantado durante todo este tiempo.
- A mis padres **Carlos Leonardo** y **María Isabel**, que han estado siguiéndome y apoyándome en todo momento.
- A mis suegros, **Néstor** y **Mónica**, por la ayuda y el apoyo incondicional.
- A mis Directores, la **Dra. Marta Yajía** y el **Dr. Pedro Zapata** por acompañarme y aconsejarme a lo largo de todo este recorrido.
- A la **Dra. Catiana Zampini**, y todo el Instituto de Bioprospección Vegetal (UNT). Por las enseñanzas y el tiempo compartido.
- Al **Dr. Ignacio León**, y colaboradores (**CEQUINOR**) por brindarme un espacio y ayudarme en mi formación.
- A la querida **Irma Insaurrealde**, una persona muy valorada en el ambiente, ¡gracias por todo! Siempre te recordaré.
- A mis compañeros de trabajo de la **Cátedra de Farmacobotánica** y el **Laboratorio de Farmacobotánica** “Dr. Aníbal Amat”, por brindarme el apoyo necesario para lograr cumplir con mis metas.
- A los chicos de “**Farmacia Guacurari**”, quienes han aportado indudablemente en mis constantes ausencias.
- A todos y cada uno, de los **investigadores, colegas** y **amigos** que tuve el placer de conocer a lo largo de estos años, quienes demuestran día a día, superando innumerables desafíos de una época que no les fue propicia, el amor que tienen por el trabajo que hacen y de quienes eh aprendido que el valor como persona es lo más importante.

Índice Temático

Resumen.....	2
Abstract	3
Agradecimientos	4
Índice Temático	5
Índice de figuras, tablas y gráficos.....	8
Abreviaturas	13
1.- Marco teórico.....	14
1.1- Uso de las plantas medicinales.	14
1.2- Plantas medicinales como fuente de agentes quimioterápicos.	14
1.3- Moléculas bioactivas obtenidas de plantas medicinales.....	16
1.4- Selección de plantas para la Tesis Doctoral.	18
1.5- Posición taxonómica de las especies seleccionadas.	20
1.6- Antecedentes científicos de las especies seleccionadas.	21
1.7- Fisiopatología del Cáncer y situación actual.	23
1.8- Características de las líneas celulares tumorales seleccionadas.....	26
2.- Objetivos	30
2.1.- Objetivo General.....	30
2.2.- Objetivos Específicos.	30
3.- Materiales y métodos.....	31
3.1.- Estudios farmacobotánicos.....	31
3.1.1. - Recolección e identificación.....	31
3.1.2. - Recolección de datos etnobotánicos.....	33
3.1.3. - Caracterización macroscópica de la droga vegetal.....	33
3.1.4. - Caracterización microscópica de la droga vegetal.....	33
3.1.4.1. - Cortes a mano alzada.....	34
3.1.4.2.- Aclaramiento.....	34
3.1.4.3.- Tinción.....	34
3.1.4.4.- Medios de montaje.	35
3.1.4.5.- Técnicas para la obtención de epidermis:	36
3.1.4.6.- Diafanización	37
3.2.- Secado.....	37
3.3.- Molienda.....	37
3.4.- Preparación de extractos.	37
3.4.1.- Preparación de infusión para ensayos de genotoxicidad.....	38
3.4.2.- Maceración de mezclas hidroalcohólicas.	38

3.4.3.- Obtención de extracto seco.....	38
3.5.- Estudios genotóxicos.	41
3.5.1.- Acondicionamiento de bulbos.....	41
3.5.2.- Pretratamiento.....	41
3.5.3.- Material Vegetal.	42
3.5.3.- Diseño de E1.....	42
3.5.4.- Diseño de E2.....	43
3.5.5.- Fijación de raíces.	44
3.5.6.- Observación de mitosis.	44
3.6.- Estudios químicos.....	46
3.6.1.- Cromatografía en capa delgada.....	46
3.6.1.1.- Revelado físico.....	47
3.6.1.2.- Revelado Químico.....	47
3.6.2.- Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).	47
3.6.3.- Cromatografía en columna.....	47
3.6.3.1.- Siembra.....	48
3.6.3.2.- Limpieza de columna.....	48
3.7.- Estudios biológicos.....	49
3.7.1.- Líneas celulares.....	49
3.7.2.- Repique de monocapa.....	50
3.7.3.- Inoculación de placas.....	51
3.7.4.- Incubación.	52
3.7.5.- Medios de cultivo.....	52
3.7.6.- Diluciones de extractos.....	52
3.7.7.- Reacción con MTT.....	52
3.7.8.- Análisis estadístico.....	52
4.- Resultados	55
4.1.- Estudios farmacobotánicos.....	55
4.1.1. - Selección de especies.....	55
4.1.2. - Datos etnobotánicos.....	55
4.1.3. - Relevamiento de comercialización de las especies.....	56
4.1.4. - Caracterización macroscópica de la droga vegetal.....	60
4.1.5. - Caracterización microscópica de la droga vegetal.....	62
4.2. - Rendimiento de extractos.	64
4.2.1. - Rendimiento de extractos hidroalcohólicos de <i>P. hydroperoides</i>	65

4.2.2. - Rendimiento de extractos hidroalcohólicos de <i>A. australe</i> .	65
4.3.- Estudios genotóxicos.	66
4.3.1.- Concentración 50 de <i>P. punctatum</i> .	66
4.3.2.- Concentración 50 de <i>P. hydropiperoides</i> .	67
4.3.3.- Concentración 50 de <i>A. australe</i> .	68
4.3.4.- Toxicidad general de <i>P. punctatum</i> .	69
4.3.5.- Toxicidad general de <i>P. hydropiperoides</i> .	70
4.3.6.- Toxicidad general de <i>A. australe</i> .	71
4.3.7.- Genotoxicidad de <i>P. punctatum</i> .	72
4.3.8.- Genotoxicidad de <i>A. australe</i> .	75
4.4.- Estudios químicos.	79
4.4.1.- Cromatografía en capa delgada de los extractos crudos.	79
4.4.2.- Cromatografía en columna.	83
4.4.2.1.- Rendimiento de la separación de extractos de <i>P. hydropiperoides</i> .	85
4.4.2.2.- Rendimiento de la separación de extractos de <i>A. australe</i> .	85
4.4.3.- Cromatografía en capa delgada de las fracciones obtenidas.	86
4.4.4.- Cromatografía en capa delgada de las fracciones reveladas con NP/PEG.	91
4.5.- Estudios biológicos.	95
4.5.1.- Efectos del extracto crudo de <i>P. hydropiperoides</i> sobre MCF-7.	95
4.5.2.- Efectos del extracto crudo de <i>P. hydropiperoides</i> sobre MG-63.	98
4.5.3.- Efectos del extracto de <i>P. hydropiperoides</i> sobre MDA-231.	101
4.5.4.- Efectos del extracto de <i>A. australe</i> sobre MCF-7.	105
4.5.5.- Efectos del extracto de <i>A. australe</i> sobre MG-63.	108
4.5.6.- Efectos del extracto de <i>A. australe</i> sobre MDA-231.	112
4.5.2.- Efecto de las fracciones de <i>A. australe</i> sobre las líneas celulares.	119
4.5.2.1.- Efectos de las 6 fracciones de <i>A. australe</i> sobre MCF-7.	119
4.5.2.2.- Efectos de las 6 fracciones de <i>A. australe</i> sobre MG-63.	122
4.5.2.3.- Efectos de las 6 fracciones de <i>A. australe</i> sobre MDA-231.	124
4.5.3.- Efectos de diluciones de la fracción 1 y 2 de <i>A. australe</i> sobre las líneas celulares.	127
4.5.3.1.- Efectos de diluciones de la fracción 1 y 2 de <i>A. australe</i> sobre MCF-7.	127
4.5.3.2.- Efectos de diluciones de la fracción 1 y 2 de <i>A. australe</i> sobre MG-63.	128

4.5.3.3.- Efectos de diluciones de la fracción 1 y 2 de <i>A. australe</i> sobre MDA-231.....	128
4.5.4.- Estimación de proliferación relativa.....	129
4.6.- Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) del extracto crudo de <i>A. australe</i> y de sus fracciones.....	131
5.- Discusión	134
5.1.- Pureza de las drogas vegetales comercializadas bajo la denominación de “Katai” y “Tapekue” en la Ciudad de Posadas.....	134
5.2.- Situación actual de la comercialización de <i>P. hydropiperoides</i> y <i>A. australe</i>	134
5.3.- Farmacobotánica de las especies seleccionadas.....	134
5.4.- Extracciones, rendimientos y aspectos generales.....	135
5.5.- Evaluación de la genotoxicidad de las especies seleccionadas.....	136
5.6.- Análisis químicos y metabolitos secundarios de interés.....	137
5.7.- Actividades biológicas observadas.....	138
5.8.- Comparación de los resultados obtenidos, con especies de la misma familia, del mismo género o diferentes; con actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares tumorales.....	140
5.9.- Comparación del modelo celular experimental utilizado, frente a otras alternativas probables.....	143
6.- Conclusiones.....	145
7.- Bibliografía.....	146
7.1- Bibliografía adicional.....	153
7.2.- Publicaciones surgidas del presente trabajo.....	157

Índice de figuras, tablas y gráficos.

FIGURA 1. MOLÉCULAS BIOACTIVAS OBTENIDAS DE FUENTES VEGETALES. 1 ARTEETHER; 2 GALANTAMINA; 3 NITISINONA; 4 TIOTROPIO; 5 M6G; 6 VINFLUNINA; 7 EXATECAN Y 8 CALANOLIDE A. FUENTE: BALUNAS, M. ET AL, 2005.	18
FIGURA 2. FOTOGRAFÍA SATELITAL UBICANDO EL SITIO DE RECOLECCIÓN EN LA CIUDAD DE POSADAS, Y SU CERCANÍA CON LA CIUDAD DE ENCARNACIÓN PARAGUAY. (FOTO TOMADA DE GOOGLE STREET VIEV).	31
FIGURA 3. FOTOGRAFÍA SATELITAL UBICANDO EL SITIO DE RECOLECCIÓN Y EL CAMPUS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES, EN LA CIUDAD DE POSADAS. (FOTO TOMADA DE GOOGLE STREET VIEV).	32
FIGURA 4. FOTOGRAFÍA SATELITAL UBICANDO EL SITIO DE RECOLECCIÓN EN LA CIUDAD DE POSADAS. (FOTO TOMADA DE GOOGLE STREET VIEV).	32
FIGURA 5. EVAPORADOR ROTATORIO LABOROTA 4000 HEIDOLPH	39
FIGURA 6. DISEÑO DEL DISPOSITIVO ARMADO PARA LA EXPERIENCIA, EN EL PERIODO DE CRECIMIENTO INICIAL DE LAS RAICILLAS, PREVIAS AL CONTACTO CON LOS DIFERENTES EXTRACTOS, Y LUEGO EN CONTACTO CON LOS EXTRACTOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES, Y EL CONTROL. (FOTOS TOMADAS EN EL LABORATORIO).	42

FIGURA 7. SECUENCIA DE PASOS PARA EL REPIQUE DE MONOCAPA. FUENTE: MANUAL DE PRACTICAS DE CULTIVOS EN TEJIDOS. INSTITUTO DE ONCOLOGÍA “ÁNGEL H. ROFFO”. (2014).	51
FIGURA 8. MUESTRAS ADQUIRIDAS EN LA FERIA FRANCA.	56
FIGURA 9. COMPARATIVO DE P. HYDROPIPEROIDES Y P. PUNCTATUM. ESPECIES IDENTIFICADAS FORMANDO PARTE DE UN MISMO MAZO.	58
FIGURA 10. MUESTRA DE A. AUSTRALE COMERCIALIZADA.	59
FIGURA 11. A. OCREAS GLANDULOSAS CORTAS. B. FRUTO AQUENIO TRÍQUETO.	60
FIGURA 12. A. INFLORESCENCIA DE P. HYDROPIPEROIDES. B. DETALLE DE OCREAS Y TALLO ROJIZO CARACTERÍSTICO.	61
FIGURA 13. PLANTA COMERCIALIZADA.	62
FIGURA 14 A. EPIDERMIS ADAXIAL CON TRICOMAS Y ESTOMAS 200X. B. CORTE TRANSVERSAL DE LA HOJA 200X. C. TRICOMAS PLURICELULARES UNISERIADOS Y TRICOMAS GLANDULARES CAPITADOS 400X. D. CORTE TRANSVERSAL DE LA LÁMINA FOLIAR 400X.	63
FIGURA 16. A. DISEÑO DE E1. B, C Y D CORRESPONDEN A RAICILLAS EXPUESTAS A 100 G/L DE INFUSIÓN DE P. PUNCTATUM MOSTRANDO LAS ANOMALÍAS MACROSCÓPICAS ENCONTRADAS. B TUMOR. C. GANCHO. D. NECROSIS.	70
FIGURA 17. A. RAÍCES DEL GRUPO CONTROL. B. RAÍCES QUE HAN ESTADO EN CONTACTO CON LOS EXTRACTOS.	71
FIGURA 18. A Y C. DETALLE DE GANCHOS. B Y D. TUMORES Y NECROSIS.	71
FIGURA 19. RESULTADOS DE GENOTOXICIDAD. A, B Y C. DETALLE DE ANAFASE PUENTE. D. METAFASE ANÓMALA CON CROMOSOMAS REZAGADOS Y DESORDENADOS.	74
FIGURA 20. PREPARADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA GENOTOXICIDAD DE A. AUSTRALE. CONTROLES: A. ANAFASE. B. TELOFASE Y METAFASE. C Y D. METAFASE Y TELOFASE. GENOTOXICIDAD: E Y F. DETALLE DE ANAFASE PUENTE. G Y H. METAFASE ANÓMALA CON CROMOSOMAS REZAGADOS Y DESORDENADOS.	78
FIGURA 21. DISEÑO DEL EXPERIMENTO. CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA.	79
FIGURA 22. TLC DE P. HYDROPIPEROIDES EN SISTEMA 1 (10 ACETATO DE ETILO / 1 ÁCIDO ACÉTICO / 1 AGUA). COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS DISTINTOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS	80
FIGURA 23. TLC DE P. HYDROPIPEROIDES EN SISTEMA 2: 3 ACETATO DE ETILO / 1 CLOROFORMO / 4 GOTAS DE ÁCIDO ACÉTICO. COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS DISTINTOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.	81
FIGURA 24. TLC DE A. AUSTRALE EN SISTEMA 1 (10 ACETATO DE ETILO / 1 ÁCIDO ACÉTICO / 1 AGUA).. COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS DISTINTOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.	82
FIGURA 25. TLC DE A. AUSTRALE EN SISTEMA 2 (3 ACETATO DE ETILO / 1 CLOROFORMO / 4 GOTAS DE ÁCIDO ACÉTICO). COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS DISTINTOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.	83
FIGURA 26. A. COLUMNA SEMBRADA. B Y C. FRACCIONES OBTENIDAS SUSPENDIDAS EN METANOL.	84
FIGURA 27. TLC EN SISTEMA 1 (10 ACETATO DE ETILO / 1 ÁCIDO ACÉTICO / 1 AGUA) DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE P. HYDROPIPEROIDES.	87
FIGURA 28. TLC EN SISTEMA 2 (3 ACETATO DE ETILO / 1 CLOROFORMO / 4 GOTAS DE ÁCIDO ACÉTICO) DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE P. HYDROPIPEROIDES	88
FIGURA 29: TLC EN SISTEMA 1 (10 ACETATO DE ETILO / 1 ÁCIDO ACÉTICO / 1 AGUA) DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE A. AUSTRALE.	89
FIGURA 30: TLC EN SISTEMA 2 (3 ACETATO DE ETILO / 1 CLOROFORMO / 4 GOTAS DE ÁCIDO ACÉTICO) DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE A. AUSTRALE.	90
FIGURA 31: TLC EN SISTEMA 1 (10 ACETATO DE ETILO / 1 ÁCIDO ACÉTICO / 1 AGUA)., DE LAS OCHO FRACCIONES OBTENIDAS DE P. HYDROPIPEROIDES, REVELADAS CON NP/PEG.	91

FIGURA 32: TLC EN SISTEMA 2, DE LAS OCHO FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> , REVELADAS CON NP/PEG.	92
FIGURA 33: TLC EN SISTEMA 1 (10 ACETATO DE ETILO / 1 ÁCIDO ACÉTICO / 1 AGUA), DE LAS SEIS FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>A. AUSTRALE</i> , REVELADAS CON NP/PEG.	93
FIGURA 34: TLC EN SISTEMA 2 (3 ACETATO DE ETILO / 1 CLOROFORMO / 4 GOTAS DE ÁCIDO ACÉTICO), DE LAS SEIS FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>A. AUSTRALE</i> , REVELADAS CON NP/PEG.	94
3.4.4.- TABLA 1. REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN PROCESAMIENTO DE DROGAS VEGETALES Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.	40
3.5.7.- TABLA 2. REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD.	45
3.6.4.- TABLA 3. REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPAMIENTO, UTILIZADOS EN LOS ESTUDIOS QUIMICOS.	49
3.7.9.- TABLA 4. REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPAMIENTO, UTILIZADOS EN LOS ESTUDIOS BIOLÓGICOS.	54
TABLA 5. RENDIMIENTO DE EXTRACTOS DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i>.	65
TABLA 6. RENDIMIENTO DE EXTRACTOS DE <i>A. AUSTRALE</i>.	66
TABLA 7. PORCENTAJES DE CADA FASE DE LA MITOSIS, EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PROBADAS PARA LAS INFUSIONES DE <i>P. PUNCTATUM</i>.	72
TABLA 8. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS PARA LAS INFUSIONES DE <i>P. PUNCTATUM</i>.	72
TABLA 9. PORCENTAJES DE CADA FASE DE LA MITOSIS, EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PROBADAS PARA LAS INFUSIONES DE <i>A. AUSTRALE</i>.	75
TABLA 10. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS PARA LAS INFUSIONES DE <i>A. AUSTRALE</i>.	75
TABLA 11. FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> EN SISTEMA 1 CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS: 100= 100% AGUA; 80= 80% AGUA 20% ALCOHOL; 50 = 50% AGUA 50% ALCOHOL; 20= 20%AGUA 80%ALCOHOL.	80
TABLA 12. FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> EN SISTEMA 2 CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS: 100= 100% AGUA; 80= 80% AGUA 20% ALCOHOL; 50 = 50% AGUA 50% ALCOHOL; 20= 20%AGUA 80%ALCOHOL.	81
TABLA 13. FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>A. AUSTRALE</i> EN SISTEMA 1 CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS: 100= 100% AGUA; 80= 80% AGUA 20% ALCOHOL; 50 = 50% AGUA 50% ALCOHOL; 20= 20%AGUA 80%ALCOHOL.	82
TABLA 14. FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>A. AUSTRALE</i> EN SISTEMA 1 CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS: 100= 100% AGUA; 80= 80% AGUA 20% ALCOHOL; 50 = 50% AGUA 50% ALCOHOL; 20= 20%AGUA 80%ALCOHOL.	83
TABLA 15. RESUMEN DE LOS RENDIMIENTOS OBTENIDOS PARA EL EXTRACTO DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i>.	85
TABLA 16. RESUMEN DE LOS RENDIMIENTOS OBTENIDOS PARA EL EXTRACTO DE <i>A. AUSTRALE</i>.	86
TABLA 17. FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> EN SISTEMA 1 CON LAS 8 FRACCIONES.	87
TABLA 18. FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> EN SISTEMA 2 CON LAS 8 FRACCIONES.	88
TABLA 19. FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>A. AUSTRALE</i> EN SISTEMA 1 CON LAS 6 FRACCIONES.	89
TABLA 20: FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>A. AUSTRALE</i> EN SISTEMA 2 CON LAS 6 FRACCIONES.	90
TABLA 21: FRACCIONES OBTENIDAS EN SISTEMA 1, DE LAS OCHO FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i>, REVELADAS CON NP/PEG.	91

TABLA 22: FRACCIONES OBTENIDAS EN SISTEMA 2, DE LAS OCHO FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> , REVELADAS CON NP/PEG.	92
TABLA 23: FRACCIONES OBTENIDAS EN SISTEMA 1, DE LAS SEIS FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>A. AUSTRALE</i> , REVELADAS CON NP/PEG.	93
TABLA 24: ESTIMACIÓN RELATIVA DE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA MCF7 FRENTE A LOS EXTRACTOS PROBADOS DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> Y DE <i>A. AUSTRALE</i> .	129
TABLA 25: ESTIMACIÓN RELATIVA DE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA MG-63 FRENTE A LOS EXTRACTOS PROBADOS DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> Y DE <i>A. AUSTRALE</i> .	130
TABLA 26: ESTIMACIÓN RELATIVA DE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA MDA-231 FRENTE A LOS EXTRACTOS PROBADOS DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> Y DE <i>A. AUSTRALE</i> .	130
TABLA 27: COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON OTRAS ESPECIES CON ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA.	141

GRÁFICO 1. ESTUDIO DE LA GENOTOXICIDAD DE <i>P. PUNCTATUM</i> . SE GRAFICA LA LONGITUD DE LAS RAÍCES EN CENTÍMETROS VERSUS LAS CONCENTRACIONES DE 100 G/L, 50 G/L, 25 G/L Y 12,5 G/L. LA CONCENTRACIÓN 50 OBTENIDA SURGE DE LA EXTRAPOLACIÓN DE LA RECTA QUE UNE LAS DIFERENTES DOSIS ENSAYADAS.	67
GRÁFICO 2. ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> . SE GRAFICA LA LONGITUD DE LAS RAÍCES EN CENTÍMETROS VERSUS LAS CONCENTRACIONES DE G/L. 100 G/L, 50 G/L Y 25 G/L. LA CONCENTRACIÓN 50 OBTENIDA SURGE DE LA EXTRAPOLACIÓN DE LA RECTA QUE UNE LAS DIFERENTES DOSIS ENSAYADAS.	68
GRÁFICO 3. ESTUDIO DE LA GENOTOXICIDAD DE <i>A. AUSTRALE</i> . SE GRAFICA LA LONGITUD DE LAS RAÍCES EN CENTÍMETROS VERSUS LAS CONCENTRACIONES DE 100 G/L, 50 G/L, 25 G/L Y 12,5 G/L. LA CONCENTRACIÓN 50 OBTENIDA SURGE DE LA EXTRAPOLACIÓN DE LA RECTA QUE UNE LAS DIFERENTES DOSIS ENSAYADAS.	69
GRAFICO 4: CURVA REPRESENTANDO PROMEDIOS Y DESVÍO STANDARD DE LA VIABILIDAD MEDIA DE MCF-7 EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> EN DOSIS DE 25 µG/ML, 50 µG/ML, 100 µG/ML, 250 µG/ML Y 500 µG/ML. UTILIZANDO COMO CONTROL EL DMSO AL 0,5 %.	95
GRAFICO 5: CURVA REPRESENTANDO PROMEDIOS Y DESVÍO STANDARD DE LA VIABILIDAD MEDIA DE MG-63 EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> EN DOSIS DE 50 µG/ML, 100 µG/ML, 150 µG/ML, 200 µG/ML Y 250 µG/ML. UTILIZANDO COMO CONTROL EL DMSO AL 0,5 %.	98
GRÁFICO 6: CURVA REPRESENTANDO PROMEDIOS Y DESVÍO STANDARD DE LA VIABILIDAD MEDIA DE MDA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>P. HYDROPIPEROIDES</i> EN DOSIS DE 50 µG/ML, 100 µG/ML, 150 µG/ML, 200 µG/ML Y 250 µG/ML. UTILIZANDO COMO CONTROL EL DMSO AL 0,5 %.	102
GRÁFICO 7: CURVA REPRESENTANDO PROMEDIOS Y DESVÍO STANDARD DE LA VIABILIDAD MEDIA DE MCF-7 EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>A. AUSTRALE</i> EN DOSIS DE 25 µG/ML, 50 µG/ML, 100 µG/ML, 250 µG/ML, Y 500 µG/ML. UTILIZANDO COMO CONTROL EL DMSO AL 0,5 %.	105
GRÁFICO 8: CURVA REPRESENTANDO PROMEDIOS Y DESVÍO STANDARD DE LA VIABILIDAD MEDIA DE MG-63 EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>A. AUSTRALE</i> EN DOSIS DE 5 µG/ML, 10 µG/ML, 25 µG/ML, 50 µG/ML Y 100 µG/ML. UTILIZANDO COMO CONTROL EL DMSO AL 0,5 %.	109
GRÁFICO 9: CURVA REPRESENTANDO PROMEDIOS Y DESVÍO STANDARD DE LA VIABILIDAD MEDIA DE MDA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>A. AUSTRALE</i> EN DOSIS DE 50 µG/ML, 100 µG/ML, 150 µG/ML, 200 µG/ML Y 250 µG/ML. UTILIZANDO COMO CONTROL EL DMSO AL 0,5 %.	112

GRÁFICO 10: CURVA REPRESENTANDO PROMEDIOS Y DESVÍO STANDARD DE LA VIABILIDAD MEDIA DE MDA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>A. AUSTRALE</i> EN DOSIS DE 5 µG/ML, 10 µG/ML, 25 µG/ML, 50 µG/ML Y 100 µG/ML. UTILIZANDO COMO CONTROL EL DMSO AL 0,5 %.	116
GRÁFICO 11: VIABILIDAD MEDIA DE MCF-7 FRENTE A LAS FRACCIONES 1 A 6 DEL EXTRACTO DE <i>A. AUSTRALE</i> . UTILIZANDO COMO CONTROL EL METANOL AL 0,5 %.	120
GRÁFICO 12: VIABILIDAD MEDIA DE MG-63 FRENTE A LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE <i>A. AUSTRALE</i> . UTILIZANDO COMO CONTROL EL METANOL AL 0,5 %.	122
GRÁFICO 13: VIABILIDAD MEDIA DE MDA-231 FRENTE A LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE <i>A. AUSTRALE</i> . UTILIZANDO COMO CONTROL EL METANOL AL 0,5 %.	125
GRÁFICO 14: VIABILIDAD MEDIA DE MCF-7 FRENTE A LAS FRACCIONES 1 Y 2 (F1 Y F2) PURAS (1) Y DILUIDAS (1/2; 1/4; 1/8), DE <i>A. AUSTRALE</i> . UTILIZANDO METANOL 0,5% COMO CONTROL.	127
GRÁFICO 15: VIABILIDAD MEDIA DE MG-63 FRENTE A LAS FRACCIONES 1 Y 2 (F1 Y F2) PURAS (1) Y DILUIDAS (1/2; 1/4; 1/8), DE <i>A. AUSTRALE</i> . UTILIZANDO METANOL 0,5% COMO CONTROL.	128
GRÁFICO 16: VIABILIDAD MEDIA DE MDA FRENTE A LAS FRACCIONES 1 Y 2 (F1 Y F2) PURAS (1) Y DILUIDAS (1/2; 1/4; 1/8), DE <i>A. AUSTRALE</i> . UTILIZANDO METANOL 0,5% COMO CONTROL.	129
GRÁFICO 17: CROMATOGRAMAS EXTRAÍDOS EN MAX PLOT DE EXTRACTO Y FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>A. AUSTRALE</i> . A. EXTRACTO 20% AGUA 80% ALCOHOL DE <i>A. AUSTRALE</i> (EXTRACTO CRUDO). B. FRACCION 1. C. FRACCION 2. D. FRACCION 3. E. FRACCION 4. F. FRACCION 5. Y G. FRACCION 6.	133
GRÁFICO 18. GRAFICO COMPARATIVO DE NIVELES DE COMPLEJIDAD 2D Y 3D, EN ENSAYOS CON LÍNEAS TUMORALES. (VERA, R. ET AL, 2015)	144

Abreviaturas

cm: centímetros.

DMEM: derivado de las siglas de Dulbecco's Modified Eagle Medium. Medio de cultivo utilizado para células de mamíferos.

DMEM-F12: Una mezcla 1: 1 de DMEM y Ham's F-12, esta formulación combina las altas concentraciones de glucosa, aminoácidos y vitaminas de DMEM con la amplia variedad de componentes de F-12.

DMSO: Dimetilsulfoxido.

g/L: gramos de soluto por litro de solución.

g: gramos.

h: Horas.

HPLC: siglas en inglés de cromatografía líquida de alta eficiencia.

IBONE: Instituto de Botánica del Nordeste.

IM: Índice mitótico.

Katai: Nombre vulgar de *Polygonum hydropiperoides*.

L: Litros.

MCF-7: adenocarcinoma de mama hormono-dependiente.

MDA-MB-231: adenocarcinoma de mama hormono-independiente.

mg: miligramos.

MG-63: Osteosarcoma humano.

min: minutos.

ml: mililitros.

mm: milímetros.

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

nm: nanómetros.

NP/PEG: sigla de Natural products - Polyethylene glicol.

PBS: siglas en inglés de tampón fosfato salino o buffer fosfato salino.

Rf: Ratio of front. Término de cromatografía en capa delgada que expresa la posición de un compuesto, luego del recorrido realizado.

RPMI: Revoluciones por minuto.

Tapakue: Nombre vulgar de *Acanthospermum australe*.

TLC: siglas en inglés de cromatografía en capa delgada.

TRYPLE®: producto comercial sustituto de la tripsina.

UV: espectro ultravioleta.

1.- Marco teórico

1.1- Uso de las plantas medicinales.

Las plantas han suministrado a la humanidad, desde sus comienzos la materia prima para satisfacer sus diferentes necesidades, como abrigo, refugio, comida, sabores, aromas, colores y medicamentos. El uso medicinal de las plantas tiene su base fundamentada en la experiencia de la Medicina Popular (Etnobotánica), contando la misma con miles de años de existencia como ser el Ayurveda en la India, Medicina Árabe en la Mesopotamia, Medicina China, Tibetana y Medicina Japonesa están todas basadas en plantas (Barboza, *et al* 2009).

La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie medicinal que puedan ser empleadas con propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Estima que el 80% de las personas en regiones menos desarrolladas emplean la medicina tradicional con plantas para el cuidado de la salud (Schlaepfer y Mendoza-Espinosa, 2010). Las plantas medicinales en la actualidad han recuperado protagonismo, dado que son el punto de partida para la obtención de nuevos principios activos en la industria farmacéutica.

1.2- Plantas medicinales como fuente de agentes quimioterápicos.

Así las plantas medicinales se han convertido en importantes fuentes de agentes quimioterápicos, podemos citar los siguientes ejemplos: alcaloides de la vinca: vinblastina y vincristina, el paclitaxel obtenidos a partir de derivados de las especies *Catharantus roseus* y *Taxus brevifolia*. Otros agentes son el etopósido y el tenipósido, derivados semisintéticos de la epipodophylo toxina, extraída de *Podophyllum peltatum*. Las camptothecinas: los agentes activos irinotecan y topotecan (aprobados en 1994 y 1996 respectivamente), son derivados semisintéticos de las camptothecinas aisladas del árbol *Camptotheca accuminata*. Otros ejemplos de plantas en investigación es el árbol

chino *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* (Sieb y Zucc), del cual se aisló la homoharringtonina, que ha demostrado eficacia en el tratamiento de algunas leucemias, en tanto el elliptinium, un derivado de la elipticina aislada de especies de la Familia Apocináceas, como ser los géneros *Bleekeria vitensis*, se encuentran en el mercado francés para el tratamiento del cáncer de la región del pecho. El flavopiridol, se encuentra en investigación y se podría usar para el tratamiento de algunos tumores, a pesar de ser sintético, la base de su estructura procede de la planta *Dysoxylum benecarifera*. También en estudio se encuentra el furano neutotóxico ipomeanol, el cual es producido por *Ipomoea babatas* infectado por el hongo *Fusarium solani* (Laza Loaces D., *et al*, 2003). Si bien estos agentes quimioterápicos fueron aislados de especies vegetales, y en algunos casos se usaron como precursores para derivados semisintéticos, lo cierto es que existen casos en donde el potencial farmacológico de muchos extractos vegetales es mayor que el de sus principios activos aislados, fenómeno que podría deberse a un efecto de sinergismo entre los componentes del extracto. Por ejemplo, los preparados a base de extractos *Crataegus oxyacantha* (Rosaceae), conocido como Espino albar o espinillo blanco, poseen acción antihipertensiva y cardiotónica verificada en numerosos estudios clínicos, donde se observó que las proantocianidinas y los C-hererosidos flavónicos eran los responsables de dicha actividad. Estos compuestos actúan inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina (ECA), sumado a un efecto relajante de la musculatura lisa (endotelina-dependiente), antioxidante, antiinflamatorio y antiagregante plaquetario (Tauchert, 2002). Por otro lado, los extractos hidroalcohólicos de la raíz de *Urtica dioica* (Urticaceae), la ortiga, se han utilizado tradicionalmente para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata. La raíz contiene una mezcla de isolectinas denominadas UDA (*Urtica dioica* agglutin) que muestran especificidad por algunos receptores de membrana produciendo una inhibición competitiva de la proliferación. Además, también posee polisacáridos que poseen actividades inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Wagner *et al*, 1994).

1.3- Moléculas bioactivas obtenidas de plantas medicinales.

Numerosas drogas de importancia en la actualidad, han surgido de fuentes naturales, no solamente para el tratamiento del cáncer, sino de varias enfermedades de importancia. Diversas técnicas y métodos han sido utilizados para lograr estos alcances, para el aislamiento, la síntesis y la obtención de estas biomoléculas.

A pesar la importancia del modelado molecular, química combinada, y otras técnicas de química sintética, los productos naturales, y en particular las plantas medicinales, siguen siendo una importante fuente de nuevas drogas, nuevas pistas de drogas y nuevas entidades químicas (Newman *et al.*, 2000).

Algunos ejemplos de importancia que podemos citar son el Arteether (Artemotil®), la Galantamina (Reminyl®), La nitisinona (Orfadin®), el Tiotropio (Spiriva®) que se comercializan bajo marcas registradas, y la morfina-6-glucurónido, el Exatecan y el Calanolide A aún en investigación.

El Arteether es un potente antipalúdico derivado de la artemisinina, una lactona sesquiterpénica aislada de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) (comúnmente conocida como ajeno dulce), una planta utilizada en la medicina tradicional china (van Agtmael *et al.*, 1999).

La Galantamina (Reminyl®) es un producto natural descubierto a través de una investigación etnobotánica y aislada por primera vez de *Galanthus woronowii*. Losinsk. (Amaryllidaceae) en Rusia a principios de la década de 1950 (Heinrich y Teoh, *et al.*, 2004). La galantamina es aprobada para el tratamiento del Alzheimer, retrasando el proceso de degeneración neurológica por inhibición de la acetilcolinesterasa, así como la unión y modulación del receptor nicotínico de acetilcolina (Heinrich y Teoh, *et al.*, 2004).

La nitisinona (Orfadin®) es un medicamento derivado de plantas medicinales que se utiliza para el tratamiento de la tirosinemia, una rara enfermedad heredada. La nitisinona es una modificación de la

mesotriona, un herbicida químicamente derivado de la fitotoxina natural, obtenida de *Callistemon citrinus* Stapf. (Myrtaceae) (Mitchell *et al.*, 2001). Estos compuestos análogos inhiben a la misma enzima, 4-hidroxifenilpiruvato deshidrogenasa (HPPD), tanto en humanos como en maíz. En el maíz actúa como un herbicida y da como resultado la reducción de Biosíntesis de plastoquinona y tocoferol, mientras que en humanos previene el catabolismo de tirosina y La acumulación de bioproductos tóxicos en el hígado y riñones. (Hall *et al.*, 2001).

En enero de 2004 el bromuro de Tiotropio (Spiriva®) fue aprobado por la FDA y lanzado al mercado de los Estados Unidos (Mundy y Kirkpatrick, 2004). El Tiotropio es un antagonista específico de los receptores muscarínicos, utilizado como un broncodilatador. Está basado en el ipratropio, un derivado de atropina que ha sido aislada de la *Atropa belladonna* L. (Solanaceae) y otros miembros de la Familia de las solanáceas (Mundy y Kirkpatrick, 2004).

El M6G o morfina-6-glucurónido (5) es un metabolito de la morfina extraída de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae) y posee efectos analgésicos con menos efectos secundarios que la morfina (Lotsch y Geisslinger, 2001).

La vinflunina (6) es una modificación de la vinblastina obtenida de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae), utilizada como un agente anticanceroso de mayor eficacia (Okouneva *et al.*, 2003).

El Exatecan (7) es un análogo sintético de la camptotecina, aislada de *Camptotheca acuminata* Decne. (Nyssaceae) y desarrollado como un agente anticancerígeno (Butler, 2004).

El Calanolide A (8) es una dipirano-cumarina tetracíclica, un producto natural aislado de *Calophyllum lanigerum* var. *austrocoriaceum* (Whitmore) P.F. Stevens (Clusiaceae), un árbol de la selva tropical (Kashman *et al.*, 1992). Es un inhibidor de la transcriptasa inversa, una enzima clave para la replicación del virus VIH tipo 1 (Yu *et al.*, 2003).

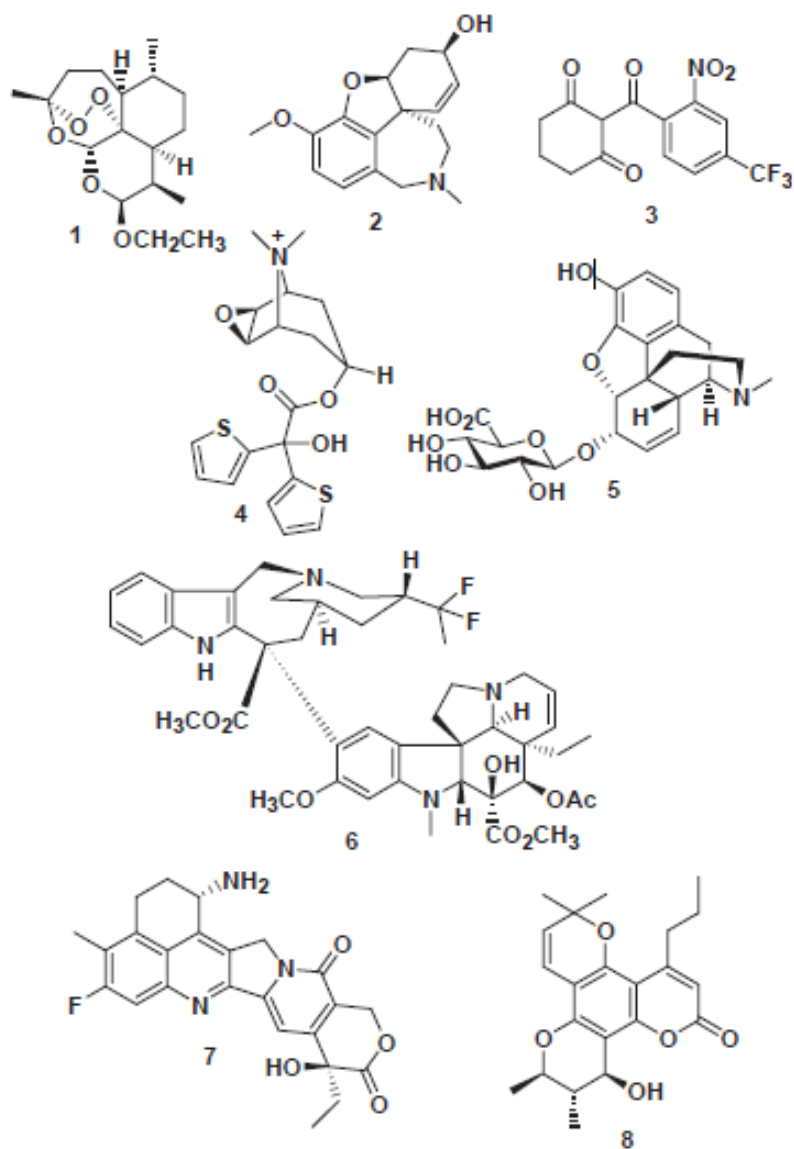


Figura 1. Moléculas bioactivas obtenidas de fuentes vegetales. 1 Arteether; 2 Galantamina; 3 nitisinona; 4 Tiotropio; 5 M6G; 6 vinflunina; 7 Exatecan y 8 Calanolide A. Fuente: Balunas, M. et al, 2005.

1.4- Selección de plantas para la Tesis Doctoral.

El uso y comercialización de especies vegetales como agentes terapéuticos en la medicina popular es un hecho de profunda raigambre histórica y actualmente se halla ampliamente difundido en todos los niveles sociales. En los diferentes ámbitos de comercialización en la ciudad de Posadas se logró relevar a las especies *Acanthospermum australe* (Loefl) Kunze (Asteraceae) y *Polygonum hydropiperoides* Michaux (Polygonaceae) como especies vasculares más frecuentemente

utilizadas en la fitoterapia popular como agentes terapéuticos en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas (Amat y Yajía 2000).

Desde el punto de vista botánico *A. australe* es una planta con tallos ramosos, decumbentes o ascendentes, pubescentes, hojosos hasta el ápice con hojas opuestas, rómbico-ovadas, agudas u obtusas en el ápice, atenuadas en corto pecíolo en la base, dentado- aserradas en el margen, laxamente pubescentes y con pequeñas glándulas en ambas caras, especialmente en la inferior. Inflorescencias en capítulos pedicelados solitarios en las axilas de las hojas y en el extremo de las ramitas con involucreo acampanado y brácteas biseriadas envolviendo por completo los ovarios de las flores femeninas, pubescentes en el dorso. Las flores son de color amarillentas, dimorfas. Presenta frutos aquenios completamente envueltos por las brácteas interiores del involucreo, dando lugar a un fruto fusiforme, cubierto totalmente de cerdas ganchudas rígidas. Es una especie frecuente en toda América, desde el Estado de Massachusetts hasta el norte y centro de la República Argentina. También existe de forma adventicia en la India y en las Islas Hawai. Posee un número cromosómico de $n = 11$ (Keil, Luckow y Pinkava 1988). Es utilizado en la medicina popular como cicatrizante de heridas, para tratar úlceras estomacales, y distintos tipos de cáncer.

Por otro lado, la familia *Polygonaceae* comprende 30 géneros y 800 especies en todo el mundo. En la Argentina, el género se halla dividido en 5 secciones y 21 especies. Debido a su amplia distribución geográfica los ambientes en que viven son variados, comprendiendo así plantas hidrófitas-palustres, mesófitas y xerófitas. Las especies del género son hierbas perennes, anuales o bienales.

En Argentina la especie de la familia *Polygonaceae* utilizada en la medicina popular, para tratar distintos tipos de cáncer es *Polygonum hydropiperoides* Michaux. Se encuentran en el país además 2 variedades: *Polygonum hydropiperoides* Michx. var. *hydropiperoides* y *Polygonum hydropiperoides* var. *setaceum* (Baldwin ex Elliot) Gleason. Se ha relevado también su uso como antiinflamatorio, analgésico (preparados en gotas), antidiarreico y anti-hemorroidal (se registra

formas farmacéuticas formuladas a base de extractos de *P. hydropiperoides*).

Desde el enfoque Etnofarmacológico *A. australe* y *P. hydropiperoides* son consideradas como especies con propiedades anticancerígenas, entre otros usos que les atribuye. Se utiliza la parte aérea de ambas plantas. El cocimiento, a razón de una rama hojosa por litro de agua, se utiliza para todo tipo de neoplasias, en tomas continuadas durante varios meses. Se vende la planta entera sin envoltorio y en estado fresco o seco.

1.5- Posición taxonómica de las especies seleccionadas.

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Clase: Eudicotyledoneae

Orden: Caryophyllales

Familia: Polygonaceae

Género: *Polygonum*

Especie: *P. hydropiperoides*

Variedad: *P. hydropiperoides* var. *hydropiperoides*; *P. hydropiperoides* var. *setaceum*

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Clase: Eudicotyledoneae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Acanthospermum*

Especie: *A. australe*

1.6- Antecedentes científicos de las especies seleccionadas.

No se encontraron antecedentes de haber estudiado efectos antiproliferativos para *P. hydropiperoides*. Sin embargo, existen numerosos antecedentes de la familia botánica, además de especies del mismo género.

Los compuestos más característicos identificados en las especies de la familia *Polygonaceae* son principalmente flavonoides, polisacáridos y glicósidos de fenilpropano. Los compuestos fenólicos más importantes son antraquinonas y estilbenos. Compuestos característicos de algunas especies de *Polygonum* son sesquiterpenoides drimanos, norsesquiterpenoides y flavonoides sulfatados. Muchas especies de *Polygonaceae* son fuentes ricas de constituyentes bioactivos, que contribuyen a una amplia gama de propiedades medicinales (Lajter, I. *et al*, 2013).

Han sido estudiados extractos acuosos y orgánicos de 27 especies seleccionadas de cinco géneros (*Fallopia*, *Oxyria*, *Persicaria*, *Polygonum* y *Rumex*) de la familia *Polygonaceae* que se presentan en la cuenca de los Cárpatos y se examinaron *in vitro* para detectar actividad antiproliferativa contra células **HeLa** (adenocarcinoma epitelial del cuello uterino), **A431** (carcinoma epidermoide de la piel) y **MCF7** (Adenocarcinoma epitelial de mama), utilizando el ensayo del MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio). Se investigaron un total de 196 extractos n-hexano, cloroformo, metanol al 50% o de agua, de diferentes partes de la planta. Finalmente se encontró que los extractos de *Polygonum hydropiper*, *Rumex acetosa*, *Rumex alpinus*, *Rumex aquaticus*, *Rumex scutatus* y *Rumex thyrsiflorus* a 10 o 30 mg / ml demostraron una inhibición sustancial del crecimiento celular actividad (al menos 50% de inhibición de la proliferación celular) contra una o más líneas celulares. *R. acetosa* y *R. thyrsiflorus* fueron los más activos y se consideran dignos de investigaciones fitoquímicas guiadas por actividad (Lajter, I. *et al*, 2013).

Diferentes tipos estructurales de flavonoides extraídos de *Polygonum amphibium* L. y de *Polygonum minus* Huds. Fl. Angl. recolectados en la Republica de Kazakhstan han sido estudiados en modelos animales, para evaluar sus propiedades antitumorales. Los flavonoides obtenidos fueron administrados a los ratones por vía oral, monitoreando la evolución de los diferentes tumores probados. Han demostrado poseer efectos antitumorales a una baja toxicidad, incluso a exposiciones prolongadas, no modificando sustancialmente el peso, el apetito y los parámetros hematológicos de los animales (Korulkin, D. *et al*, 2015).

Los extractos de *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. originaria de China, ampliamente utilizada en la medicina popular de ese país para tratar inflamaciones, ictericia, hiperlipemias, y el cáncer, posee capacidades antioxidantes, pro-apoptóticas e inductor de anoikis en células de hepatocarcinoma (Hu, B. *et al*, 2012).

Acanthospermum australe por otro lado, forma parte de una familia botánica (Asteraceae) con gran importancia en la medicina y la investigación farmacéutica (Amat, 1983).

Los componentes fitoquímicos de las hojas de *A. australe* han sido analizados en extractos realizados con metanol y agua en una proporción de 9: 1 v/v, encontrándose contenidos de taninos, saponinas, terpenoides, fenoles, alcaloides, anillos esteroideos, pero los esteroides y los flavonoides se encontraron ausentes. La presencia de estos importantes fitoquímicos es una justificación científica del uso de la planta en el tratamiento tradicional contra diversas enfermedades que afectan a los seres humanos y animales (Thangiah, A., *et al*, 2013).

Existen antecedentes del Acanthostrin, un germacranolido (lactona sesquiterpénica) aislado de *Acanthospermum australe* como un componente antineoplásico. Su estructura fue aclarada por métodos espectroscópicos y mostró una actividad antineoplásica significativa contra el cultivo de células L1210.

También han sido analizados los extractos hidroalcohólicos de *A. australe in vivo*. Estudios sobre el modelo de tumor de ascitis de Ehrlich (EAT, por sus siglas en inglés) indican que la progresión del tumor se

asocia con una reducción de la mielopoyesis y un aumento de la hematopoyesis extramedular. Para evaluar la actividad antitumoral in vivo de *Acanthospermum australe*, su extracto hidroalcohólico se repartió con diferentes disolventes y los extractos resultantes se monitorizaron por sus efectos sobre la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea y bazo y la diferenciación en ratones con EAT. El tratamiento oral de ratones portadores de tumores con 3 dosis de 100, 500 y 1000 mg / kg de extracto hidroalcohólico crudo y sus fracciones clorofórmicas, butanólicas y acuosas estimularon significativamente la mielopoyesis y devolvieron la hematopoyesis extramedular a valores casi de control. En ratones normales, la estimulación de la mielopoyesis solo se observó con el crudo y los extractos butanólicos. Todos los extractos a 500 mg / kg aumentaron significativamente la supervivencia de los ratones portadores de tumores, sin embargo, se observó una clara ventaja de supervivencia en el grupo tratado con el extracto butanólico. Estos resultados sugieren que *A. australe* puede ejercer efectos sobre la mielopoyesis que pueden estar implicados en las respuestas inmunes antitumorales (Mirandola, L. *et al*, 2002)

Acanthospermum hispidum DC es una especie emparentada con *A. australe*, y también reviste importancia en la investigación farmacéutica. El extracto de metanol de las raíces de *Acanthospermum hispidum* DC, especie del mismo género y familia que la seleccionada para este estudio, recogido en Nigeria, es activo contra el carcinoma de pulmón de tamaño caucásico humano línea celular COR-L23. Esta especie ha sido la fuente de varios sesquiterpenos bioactivos como melampolides, (Ashidj, J. *et al*, 2010).

1.7- Fisiopatología del Cáncer y situación actual.

Actualmente se está trabajando en obtener nuevas alternativas farmacológicas más eficaces y con menos efectos adversos sobre: Cáncer (tratamiento y prevención), Trastornos cardiovasculares (hipertensión, aterosclerosis, isquemia); Sistema nervioso central

(Alzheimer, Parkinson); Enfermedades infecciosas (virales como HIV, Hepatitis, parasitarias y fúngicas); Afecciones inflamatorias (Asma, Gastrointestinales, Psoriasis) (Wagner, 2006). Siendo entre ellas el cáncer, una de las más importantes líneas de investigación debido a su vasta distribución en la población mundial y a su elevada complejidad fisiopatológica.

El término cáncer engloba a más de 200 formas de la enfermedad, de acuerdo con el tejido afectado; cabe mencionar en relación al cáncer que existen distintas variedades de morfología y grado de malignidad diferente (McDonald *et al.*, 2004). Los mismos se clasifican en dos grandes grupos: sarcomas (neoplasias malignas que se originan en un tejido conjuntivo, como pueden ser hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos, u otros) y son los tumores más comunes del tejido óseo, y carcinomas que son los tumores más frecuentes derivados de células epiteliales o glandulares. Generalmente, el desarrollo de un cáncer comprende muchas etapas, cada una de las cuales está gobernada por múltiples factores: entre ellos tenemos los dependientes de la constitución genética de los individuos y otros que son dependientes de su entorno, ambiente y modo de vida. Las células cancerosas tienen alterados los controles normales de proliferación y en general crecen respondiendo a señales internas estimuladoras de la proliferación celular (León, I. 2015). Esto produce un crecimiento sin límites, infiltrando los espacios que dejan entre sí los tejidos vecinos y logrando penetrar a los vasos sanguíneos y linfáticos a través de los cuales viajan hacia otras partes del cuerpo generando el fenómeno conocido como metástasis. Para esto las células tumorales producen niveles elevados de receptores de superficie celular específicos de las proteínas y los polisacáridos que componen las láminas basales y secretan enzimas que digieren estas proteínas (Lewin, 2007).

«Cáncer» es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir

partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer. Habiéndose detectado a través de relevamientos bibliográficos basados en las Publicaciones de Estadísticas Hospitalarias emitidas por la OMS, el cáncer es una enfermedad no transmisible (ENT), siendo la principal causa de muerte en el planeta y el número total de casos está aumentando en todo el mundo. Se prevé que, a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará un 45% entre 2007 y 2030 (pasará de 7,9 millones a 11,5 millones de defunciones), debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población. Se estima que durante el mismo periodo el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11,3 millones en 2007 a 15,5 millones en 2030. La Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172.3-242.9 x 100.000 habitantes); de acuerdo a las estimas realizadas por International Agency for Research on Cancer (IARC) para el año 2012. Esta estimación corresponde a más de 100.000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres. Con estos números, la IARC ha estimado para la Argentina una incidencia en ambos sexos de 217 casos nuevos por año cada 100.000 habitantes, basándose en datos provenientes del Registro de Cáncer de Bases Poblacionales (RCBP) del país y otros que pertenecen a países de la región (Instituto Nacional del Cáncer 2012).

El cáncer es en la actualidad uno de los problemas de salud más preocupantes en la actualidad. Se ha avanzado considerablemente en el conocimiento, tratamiento y prevención de la enfermedad, pero aún quedan muchos puntos pendientes. No existe un tratamiento unánimemente aceptado, debido a la complejidad de la fisiopatología de la enfermedad. Las drogas de origen sintético no ofrecen una considerable ventaja, por lo que la alternativa de origen natural es una opción prominente. Un análisis efectuado sobre las nuevas drogas aprobadas para el tratamiento del cáncer por la FDA durante el periodo 1981-2002, reveló que el 62% de estas drogas eran de origen natural.

1.8- Características de las líneas celulares tumorales seleccionadas.

En 1973 el Dr. Soule y sus colegas en el Michigan Cancer Foundation, de donde deriva posteriormente su nombre, aislaron células MCF-7 del derrame pleural de una mujer de 69 años con enfermedad metastásica (Soule, H. *et al*, 1973). La paciente estuvo sometida a una mastectomía de su seno derecho por un tumor benigno 7 años antes de que se iniciara el cultivo primario de células y una mastectomía radical consecutiva de su seno izquierdo para un adenocarcinoma maligno 4 años después (6). En junio de 1970, se tomaron muestras de un derrame pleural para estudios de laboratorio, donde finalmente se aislaron las primeras células. El cultivo logro ser estable en el tiempo (a diferencia de los intentos anteriores) iniciando así una nueva etapa en la investigación del Cáncer.

Posteriormente un descubrimiento fundamental para el cáncer de mama fue la descripción de los receptores de estrógenos, andrógenos, progesterona y glucocorticoides en las células MCF-7, constituyendo en si un tejido de mama diferenciado (Brooks, S. *et al*, 1973).

MCF-7 es una línea celular de cáncer de mama ampliamente utilizada, que se ha propagado durante muchos años por múltiples grupos de investigación a nivel mundial, y representa un modelo celular adecuado para Investigaciones en el cáncer de mama, incluidas las investigaciones relacionadas con los fármacos anticancerígenos. Con el tiempo, MCF-7 ha producido más datos de conocimiento práctico para el cuidado del paciente que cualquier otra línea celular del cáncer (Leverson, A. *et al*, 1997).

Las células MCF-7 son útiles para estudios de cáncer de mama in vitro como resultado de que la línea celular retiene varias características ideales particulares del epitelio mamario. Estos incluyen la capacidad de las células MCF-7 para procesar el estrógeno en forma de estradiol a través de los receptores de estrógeno en el citoplasma celular. Esto hace que la línea celular MCF-7 sea una línea celular positiva para el receptor de estrógeno (ER). MCF-7 también es un receptor de progesterona positivo y HER2 negativo. Además de conservar la sensibilidad al

estrógeno, las células MCF-7 también son sensibles a la citoqueratina. No son receptivos a la desmina, endotelina, GAP y vimentina. Cuando se cultiva in vitro, la línea celular es capaz de formar cúpulas y las células epiteliales similares crecen en monocapas. El crecimiento puede inhibirse mediante el uso del factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) y el tratamiento de las células cancerosas MCF-7 con antiestrógenos puede modular las proteínas del factor de crecimiento tipo insulina, que en última instancia tienen el efecto de una reducción en el crecimiento celular. Los científicos han encontrado que, aunque las células MCF-7 son fáciles de propagar, generalmente son una población de crecimiento lento. El tiempo de duplicación de MCF-7 es típicamente de 30 a 40 horas (Horwitz, K. *et al*, 1975).

Las células MCF-7 son células adherentes bastante grandes, con un tamaño de célula típico que mide 20-25 micras. Genéticamente, la línea MCF-7 no es exactamente la misma que la del clon aislado inicial. Originalmente, se describió como que tenía un cariotipo que contiene 85 cromosomas, que desde entonces se ha reducido en 16 cromosomas. La línea celular MCF-7 de hoy tiene un cariotipo que contiene 69 cromosomas. Además, existen discrepancias genéticas entre la línea celular MCF-7 de la Michigan Cancer Foundation y la línea celular ATCC. Esto indica que la línea celular ATCC es de una fuente diferente a las otras líneas celulares MCF-7 (Comsa, S. *et al*, 2015).

La línea celular MG-63 derivada de un osteosarcoma humano fue aislada y caracterizada por Heremans y col. Esta línea celular presenta un cariotipo anormal y una elevada producción de interferón (Heremans, H. *et al*. 1978). Esta línea es ampliamente utilizada debido a su alta tasa proliferativa consecuencia de la pérdida de la inhibición por contacto característica de los osteosarcomas, así como por su capacidad para diferenciarse. Es por esto que es considerada una línea que posee muchas de las características propias de los osteoblastos (Prouillet, C. *et al*, 2004; Aubin 1998). Esta línea celular es utilizada principalmente para evaluar efectos de citoquinas, drogas, hormonas y factores de crecimiento, así como también para evaluar las ventajas de distintos biomateriales empleados en terapias reparadoras de hueso. Mohseny y

su equipo afirman que la línea MG-63 es un modelo de estudio representativo para abordar temáticas relacionadas a la malignidad y la biología general del osteosarcoma y al descubrimiento de drogas frente a éste (Mohseny, A. *et al*, 2011). Estos mismos autores recomiendan el uso de esta línea celular para la formación de esferoides y estructuras 3D para el estudio y el descubrimiento de nuevas terapias antitumorales (Mohseny, A. *et al*, 2012).

La línea celular MDA-MB-231 es una de las más utilizadas para el estudio experimental *in vitro* del cáncer de mama hormono-independiente. Estas células fueron aisladas por Cailleau y sus colaboradores en 1973, a partir de una muestra de derrame pleural en el Anderson Hospital (Houston, EE. UU.). Se ha comprobado que estas células presentan un crecimiento extraordinariamente rápido en medios de cultivo poco enriquecidos, en parte por una regulación autocrina a partir de factores de crecimiento celular que ellas mismas secretan al medio (Cailleau, R., *et al*, 1974 y 1978).

Poseen abundantes receptores de membrana para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), es un factor potencialmente mitogénico para una variedad de células de cultivo, incluidas las líneas celulares dependientes de hormonas del cáncer de mama. No obstante, EGF no logra estimular el crecimiento de las células MDA-MB-231, aunque estas células tienen altas cantidades de receptores de EGF (EGFR).

Tanto MCF-7 como MDA-MB-231 son células del tipo epitelial, correspondientes a dos líneas celulares de cáncer de mama humanas. MCF-7 es un modelo celular que expresa los receptores de estrógenos (RE), Receptores de progesterona (RP) y receptores de factor de crecimiento humano (HER2) (Canzoneri, R. 2016).

La línea celular MDA-MB- 231 es considerada un modelo de cáncer de mama triple negativo, pues no expresa ninguno de los receptores antes mencionados, por ende, no es susceptible al tratamiento hormonal.

Respecto a la clasificación de los subtipos intrínsecos del cáncer de mama, la línea celular MCF-7 presenta características del subtipo Luminal, mientras que la línea MDA-MB-231 se caracteriza como subtipo Basal o triple negativo (Martínez-Carpio, P.*et al*, 1999).

El carcinoma de tipo luminal es un subtipo con mejor pronóstico y se caracteriza por expresar el gen del receptor de estrógenos (RE), progesterona (RP) y queratinas de bajo peso molecular (CK7, CK8), similar al epitelio de los ductos mamarios. El subtipo triple negativo debe su nombre a la ausencia de expresión de RE, RP y de HER2 y se caracteriza por la sobreexpresión de citoqueratinas de la capa basal (CK 5,6,17) y expresión de genes de proliferación celular. Este subtipo se asocia a la mutación BRCA1 y presenta el comportamiento más agresivo (Bonilla-Sepúlveda, O., *et al*, 2015).

2.- Objetivos

2.1.- Objetivo General.

Estudiar el efecto antiproliferativo de extractos de *A. australe* y *P. hydropiperoides* sobre líneas tumorales MCF-7, MG-63 y MDA-MD-231.

2.2.- Objetivos Específicos.

- Recolectar e identificar *A. australe* y *P. hydropiperoides*.
- Relevar el estado de comercialización actual de las especies seleccionadas.
- Obtener extractos hidroalcohólicos, en diferentes proporciones de etanol/agua, a partir de las partes aéreas de *A. australe* y *P. hydropiperoides*.
- Evaluar la toxicidad general y la genotoxicidad de las infusiones de *A. australe* y *P. hydropiperoides* utilizando el modelo celular del *Allium cepa* test.
- Analizar los extractos hidroalcohólicos por medio de cromatografía en capa delgada (TLC).
- Seleccionar los extractos más enriquecidos en metabolitos secundarios para separarlos en diferentes fracciones, por medio de cromatografía en columna.
- Analizar los extractos y sus fracciones por medio de cromatografía de alta eficiencia (HPLC).
- Evaluar el efecto de los extractos de ambas especies, en la viabilidad de las líneas tumorales MCF-7, MG-63 y MDA-MD-231.
- Reconocer los componentes activos de los extractos, si es que los hubiera.

3.- Materiales y métodos

3.1.- Estudios farmacobotánicos

3.1.1. - Recolección e identificación

El material vegetal se corresponde con las partes aéreas de *Polygonum hydropiperoides* var. *setaceum* y *Acanthospermum australe*, utilizadas para los estudios botánicos, químicos, genotóxicos y biológicos, fue recolectado en Avenida 117 y calle 178 (27° 25´ 26´´ S 55° 56´ 33.8´´ W) situado en el barrio Itaembé Mini, zona ubicada al sur de la ciudad de Posadas Misiones. La droga vegetal fue recolectada durante los meses de julio a septiembre de 2017.

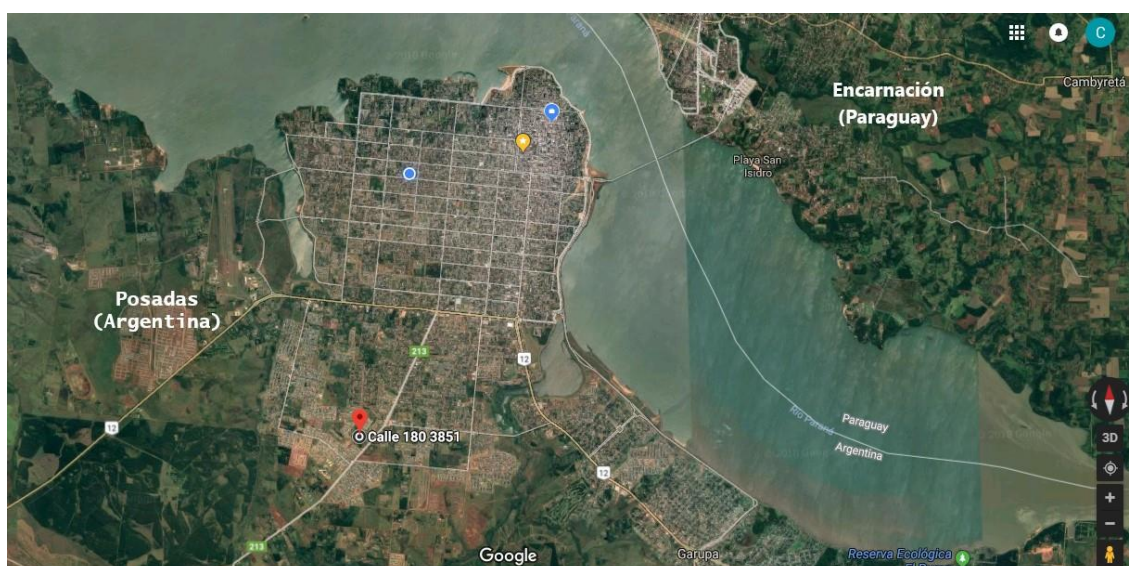


Figura 2. Fotografía satelital ubicando el sitio de recolección en la Ciudad de Posadas, y su cercanía con la ciudad de Encarnación Paraguay. (Foto tomada de Google Street View).

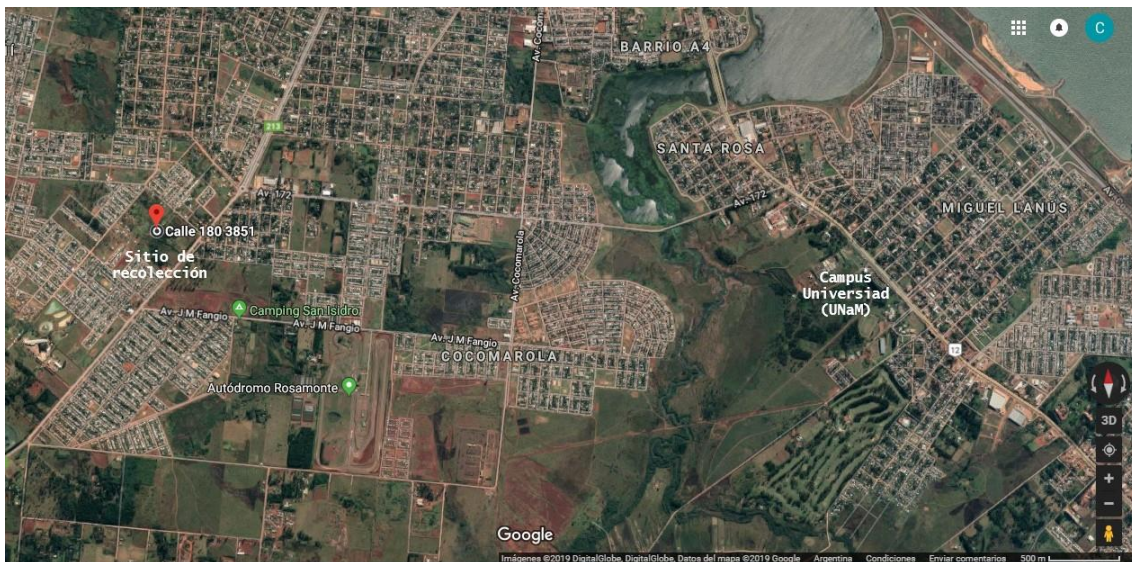


Figura 3. Fotografía satelital ubicando el sitio de recolección y el Campus de la Universidad Nacional de Misiones, en la ciudad de posadas. (Foto tomada de Google Street View).

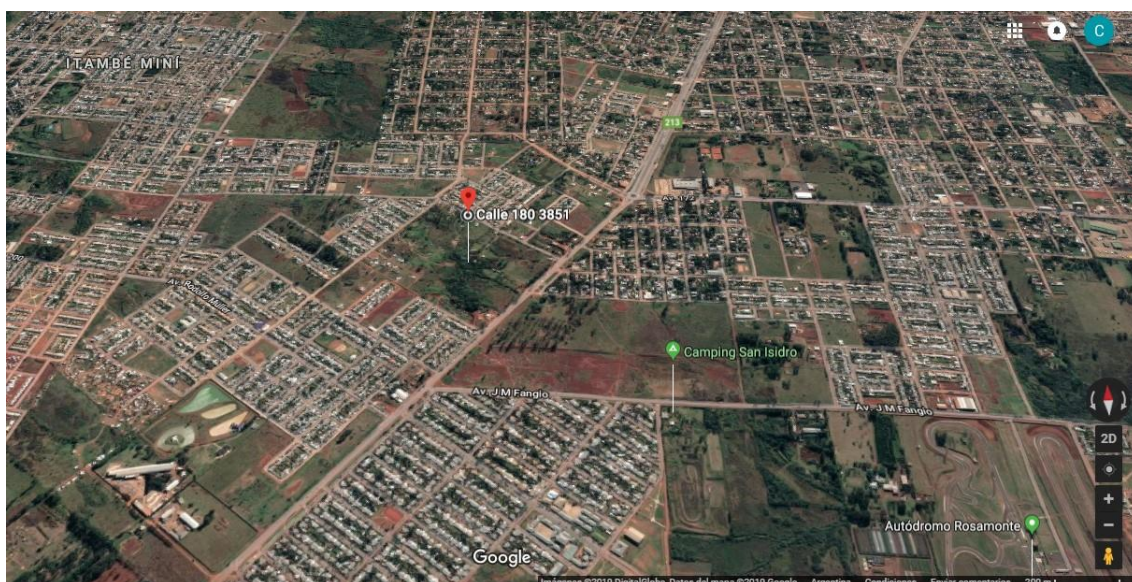


Figura 4. Fotografía satelital ubicando el sitio de recolección en la ciudad de posadas. (Foto tomada de Google Street View).

El material fue identificado en el laboratorio de Farmacobotánica “Dr. Aníbal Amat” de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, un ejemplar de cada especie fue depositado en el herbario del laboratorio de Farmacobotánica, bajo la ficha N° 4555 para *Acanthospermum australe* y N° 4556 para *Polygonum hydropiperoides var. setaceum*.

3.1.2. - Recolección de datos etnobotánicos.

Se realizó un relevamiento y registro de los puntos de comercialización del Departamento Capital, Provincia de Misiones (Argentina) de las drogas provenientes de especies vegetales vasculares nativas empleadas como agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer.

Los usos han sido transcriptos textualmente de los enunciados por los entrevistados, sin que ello signifique la convalidación de los mismos. Los registros tuvieron en cuenta los siguientes datos: nombre vulgar, utilización etnofarmacológica, parte/s utilizada/s, forma de administración, lugar de comercialización y estado o forma de presentación en la comercialización del material.

3.1.3. - Caracterización macroscópica de la droga vegetal.

Hojas adultas, frescas y secas, de varias dimensiones fueron analizadas en cuanto a su dimensión, forma, aspecto, superficie, color, olor, sabor, entre otros caracteres considerados importantes para el análisis de drogas vegetales (Zarlavsky, G. E. 2014; Kuklinski, C. 2000; Oliveira, F. *et al*, 1991).

3.1.4. - Caracterización microscópica de la droga vegetal.

Para el estudio anatómico de las hojas y tallos se realizaron cortes a mano alzada, en el tercio medio para las hojas, y en forma transversal para el tallo. Se fotografiaron los caracteres de valor diagnóstico con cámara Moticam 10.0 MP adherida al microscopio óptico Motic BA200.

3.1.4.1. – Cortes a mano alzada.

Se realizaron cortes a mano alzada tanto de hojas como de tallos, de ambas especies, usando una hoja de afeitar.

Para efectuar los cortes se utilizaron hojas de afeitar nuevas, manteniendo siempre hoja de afeitar y material humedecidos con agua. Los cortes frescos se depositaron en agua directamente, para posteriormente ser aclarados.

Los cortes de objetos cilíndricos (tallos, ramas, etc.) se realizaron en sentido transversal (en un plano perpendicular al eje mayor del órgano).

En el caso de las hojas se realizaron cortes transversales, en la parte media de la lámina foliar y paradermales, paralelo a la epidermis.

3.1.4.2.- Aclaramiento.

Los cortes realizados para todos los órganos vegetales, fueron aclarados utilizando una solución al 50% de hipoclorito de sodio. Permaneciendo sumergidas en la solución un tiempo de 5 a 30 minutos, de acuerdo al grosor del material.

Luego de eliminados los pigmentos del material y logrado un decolorado completo, se volvió a colocar en agua hasta su tinción.

3.1.4.3.- Tinción.

Se lavaron los cortes 3 veces con agua hasta eliminar todo resto de hipoclorito.

Se utilizó la coloración directa con safranina al 1%, y la tinción doble con safranina-fast Green.

Para la coloración directa se coloreó con safranina al 1% durante 2-5 minutos según el material, se lavó con agua destilada y se montaron los cortes con gelatina glicerizada.

Safranina al 1%: Se preparó en alcohol etílico 96° y se diluyó la cantidad preparada 4 veces en agua destilada.

Safranina - Fast Green: Luego de teñir con Safranina al 1% como en la coloración directa, se lavó con agua corriente hasta que no decolore más. Y se continuaron con los siguientes pasos:

Etanol 70° 5 minutos.

Etanol 96° 5 minutos.

Etanol 100° 5 minutos

Teñido con fast green menos de 30 minutos.

Lavado con Etanol 100° 5 minutos

Xilol: Etanol 100° (1:1) 10 minutos.

Al finalizar, los cortes fueron montados en bálsamo de Canadá sintético.

3.1.4.4.- Medios de montaje.

Preparación de GELATINA-GLICERINADA – Medio de montaje semi-permanente.

Gelatina sin sabor 50 g

Agua destilada 170 ml

Glicerina..... 150 ml

Cristales de fenol 7 g

Se disolvió la gelatina a baño de María en el agua destilada agitando con varilla de vidrio. Se agregó la glicerina y los cristales de fenol. Se colocó en frascos de boca ancha y se dejó destapado cuidando que no se formen muchas burbujas. Se dejó reposar hasta que este sólida. Una vez preparada, se dejó en un tubo de ensayo con una varilla de vidrio. A temperatura ambiente es sólida, por lo que cada vez que iba a utilizarse, se calentó a baño maría, cuidando de no agitar para que no se formen burbujas.

Bálsamo de Canadá sintético – Medio de montaje permanente.

Se utilizó la formula comercial ya preparada.

3.1.4.5.- Técnicas para la obtención de epidermis:

"Peeling": Se tomó una hoja de cada especie y se introdujo la punta de la aguja histológica por debajo de la epidermis. Se levantó un trozo pequeño, se tomó con la pinza de puntas finas y se tiró hasta desprenderlo.

Se colocó inmediatamente el material en alcohol 50°, para evitar la formación de burbujas.

Se montaron los trocitos del material desprendido, sobre un portaobjetos con una gota de agua glicerinada, previa coloración directa con safranina al 1%, cuidando que la superficie exterior de la epidermis quede hacia arriba.

"Raspado". Técnica de Metcalfe, C. R., & Chalk, L. (1950). Se colocó sobre un portaobjetos un trozo de hoja con la epidermis que se desea estudiar hacia abajo. Se agregó sobre ella unas gotas de solución concentrada de hipoclorito de sodio se raspó suavemente la superficie con una hoja de afeitar. Eliminándose así la epidermis que no se desea y el mesófilo, procediendo con mucha suavidad al acercarse hacia la epidermis próxima al portaobjetos (epidermis abaxial o adaxial según se desee analizar).

Luego se transfirió el material a hipoclorito al 50% y con un pincel o cepillo de dientes se eliminó el resto de mesófilo residual que pudiera quedar.

Se lavó 5-6 veces con agua, y se observó al microscopio para cerciorarse que no hayan quedado restos de material. Se tiñó con safranina al 1% y se montó con una gota de agua glicerinada.

"Improntas": se procede a limpiar el material con algodón humedecido, luego se extiende el material y se procede a pincelar la superficie foliar en estudio con esmalte sintético incoloro, y se deja secar de 3 a 5 minutos. Con una pinza de punta fina o con una cinta adhesiva se desprende la película de esmalte que cubre la superficie y se deposita

sobre el porta objetos, y luego se coloca el cubreobjeto. Como no pueden aplicarse colorantes en esta técnica se pueden utilizar filtros de colores lo que puede favorecer la resolución visual de los tejidos (Altamirano y Yajía, 2017).

3.1.4.6.- Diafanización

Este tratamiento consiste en destruir el contenido celular y dejar únicamente la arquitectura de las paredes, se realizó pasando los cortes por un baño de hipoclorito de sodio. El tiempo que el corte permaneció en hipoclorito fue debido a la naturaleza del mismo: tejidos delicados (meristemas, hojas jóvenes, flores) un tiempo menor de 5 a 30 minutos, mientras que tejidos adultos y por tanto más resistentes, de 2 a 5 horas.

3.2.- Secado

Las partes aéreas de ambas especies luego de recolectadas, fueron limpiadas, eliminando insectos, tierra, piedras y demás material extraño. Fueron secadas a temperatura ambiente por 48 horas. Posteriormente fueron colocadas en estufa DALVO BHR a 45 grados por 72 horas. El material al final se dividió en porciones que fueron destinadas a molienda.

3.3.- Molienda

La droga vegetal proveniente de ambas especies, luego de secadas fueron fraccionadas manualmente en trozos más pequeños, y posteriormente molidas en molino a cuchilla hasta la obtención de polvo fino.

3.4.- Preparación de extractos.

3.4.1.- Preparación de infusión para ensayos de genotoxicidad.

Para cada ensayo de genotoxicidad realizado, se utilizaron infusiones preparadas in situ según Farmacopea Nacional Argentina VI edición 1978. Calentando agua mineral baja en sodio hasta ebullición, luego agregando la droga molida, dejando hervir durante 20 minutos. Luego se dejó enfriar, y se filtró utilizando gasa estéril. Se enjuago el resto de droga con agua mineral baja en sodio hasta obtener el volumen final deseado para cada experiencia.

3.4.2.- Maceración de mezclas hidroalcohólicas.

Porciones de 20 g de droga vegetal molida, fueron colocados en recipientes de vidrio con tapa, utilizando como solvente 4 mezclas hidroalcohólicas, en un volumen de 100ml para cada preparación. Se dejó macerar en constante agitación, al resguardo de la luz solar, por 48hs para el caso de las soluciones alcohólicas, y 24hs para las soluciones acuosas.

Las mezclas maceradas fueron las siguientes:

- A. 20% de alcohol y 80% de agua.
- B. 50% de alcohol y 50% de agua.
- C. 80% de alcohol y 20% de agua.
- D. 100% de agua.

Una vez transcurrido el tiempo de maceración, los extractos fueron filtrados por medio de trampa de vacío y papel de filtro.

3.4.3.- Obtención de extracto seco.

Volúmenes de 100ml de extracto de cada clase, fueron secados en Evaporador Rotatorio Laborota 4000 Heidolph a 45°C y a presión reducida de 560 mmHg hasta lograr la máxima concentración.

Posteriormente el volumen final fue colocado en placas de Petri de vidrio, y dejadas en estufa DALVO BHR a 45°C por 24hs hasta sequedad total. El resultado final se retiró con espátula de metal y se almacenó en frascos de vidrio rotulados y guardados en refrigerador a -5°C hasta el momento de su utilización.

Como se desconoce la naturaleza de los posibles componentes activos, la temperatura del proceso no se elevó por encima de 45°C.



Figura 5. Evaporador Rotatorio Laborota 4000 Heidolph

Reactivos solventes y equipamiento	
Caracterización macroscópica de la droga vegetal	Lupa estereoscópica, pinza
Caracterización microscópica de la droga vegetal	Microscopio óptico Motic BA200, Cámara MOTIC10, safranina, fast-green, alcohol 96, portaobjeto, cubreobjetos, pinzas, placas de Petri, hojas de afeitar, hipoclorito de sodio, gelatina sin sabor, glicerina, fenol, bálsamo de Canadá.
Secado	Estufa DALVO BHR.
Molienda	Molino a cuchilla.
Preparación de infusión para ensayos de genotoxicidad.	Agua mineral baja en sodio SER®, mechero de bunsen, matraz de 3 litros, varilla de vidrio, gasa estéril.
Maceración de mezclas hidroalcohólicas.	Balanza, recipientes de vidrio con tapa de 300ml, alcohol 96, agua destilada, kitasato, Erlenmeyer, trampa de vacío
Obtención de extracto seco.	Papel de filtro, Evaporador Rotatorio Laborota 4000 Heidolph, estufa DALVO BHR, placas de Petri, pinzas espátula y cuchara de metal, frascos de vidrio con tapa rosca de 10 g de capacidad.

3.4.4.- Tabla 1. Reactivos, solventes y equipamiento utilizados en procesamiento de drogas vegetales y obtención de extractos.

3.5.- Estudios genotóxicos.

Los estudios genotóxicos fueron realizados según la metodología descrita por Mudry & Carballo (2006), utilizando el test de *Allium cepa*. En general se diseñó un experimento dividido en 2 ensayos. El primero con la finalidad de obtener la concentración 50 y relevar las anomalías macroscópicas, y un segundo ensayo en función de la concentración 50 calculada con la finalidad de observar los efectos genotóxicos. Realizando cada experiencia por duplicado. Las concentraciones utilizadas en estos ensayos, fueron calculadas considerando concentraciones superiores a las utilizadas en medicina tradicional, con el propósito de buscar efectos genotóxicos.

3.5.1.- Acondicionamiento de bulbos.

Los bulbos de *Allium cepa* fueron adquiridos en el comercio local, eligiendo tamaños homogéneos, de 5-6cm de diámetro, de buen aspecto, sin golpes o cortaduras, con el disco entero.

Previo a cada experiencia fueron despojados de sus catáfilas más externas, el disco inferior fue raspado con cuidado de no dañar la zona meristemática, eliminando la porción corchosa exterior, para permitir que emerjan las raicillas.

3.5.2.- Pretratamiento.

Un total de 30 bulbos fueron utilizados para cada experiencia. El pretratamiento consistió en un lavado constante con agua corriente, por 2 horas. Con la finalidad de eliminar sustancias que podrían estar presentes, producto de la manipulación durante la logística de la producción y el comercio.

3.5.3.- Material Vegetal.

El material fue recolectado en Itaembe mini, se identificó en el laboratorio y se guardó el material de resguardo (voucher) en el herbario del laboratorio de Farmacobotánica. Posteriormente se secó en estufa DALVO BHR por 48hs a 50 °C, se trituroó con mortero manual, y se lo guardó en bolsas de nylon hasta el momento de utilizarlo.

3.5.3.- Diseño de E1.

El primero ensayo (E1) se diseñó con el objeto de obtener la concentración 50, concentración a la cual la longitud de las raíces se corresponde al 50% de lo que crecen los controles.



Figura 6. Diseño del dispositivo armado para la experiencia, en el periodo de crecimiento inicial de las raicillas, previas al contacto con los diferentes extractos, y luego en contacto con los extractos en diferentes concentraciones, y el control. (Fotos tomadas en el laboratorio).

Los bulbos fueron acomodados en el dispositivo diseñado para tal fin. Colocando cada bulbo en el frasco de vidrio con boca ancha y una manguera conectada a un aireador de pecera con derivadores, de modo que cada bulbo reciba aire constantemente.

En total se utilizan 25 bulbos de los 30 seleccionados, dejando 5 como reemplazo en el caso de que algunos no hayan producido raicillas.

Cinco bulbos fueron utilizados para cada concentración, probando 4 concentraciones en cada experiencia y 5 bulbos de control. El agua utilizada para todas las experiencias fue agua baja en sodio marca SER® adquirida en el comercio, reemplazada cada 24 horas, y también utilizada para preparar los extractos de cada experiencia.

Una vez armado el experimento los bulbos fueron puestos a germinar durante 48hs, tiempo en el cual se produjeron raicillas de 3 a 5cm en promedio, en los 30 bulbos.

Una vez producidas las raicillas se reemplazaron los bulbos que no tuvieron buen crecimiento y fueron eliminados.

Posteriormente fueron preparados los extractos según la metodología descrita en 3.4.1, y colocados en los tubos.

Los bulbos estuvieron en contacto con los extractos un total de 48h, una vez transcurrido el tiempo fueron retirados, enjuagados con agua para eliminar los residuos producidos, y cortadas las raíces al ras del bulbo.

Las raicillas de cada bulbo fueron fotografiadas sobre un portaobjeto, con una regla milimetrada DIAMANTE® como referencia. Seguidamente se midieron la longitud de las raicillas de cada bulbo, para cada concentración y para los controles. Las raíces que no lograron germinar de cada bulbo, fueron eliminadas del análisis, así también las que germinaron con una longitud menor a 1cm.

Las medidas de todas las raíces y los cálculos de concentración 50 fueron procesados mediante el programa GraphPad Prism 6.

En esta etapa también se obtuvieron datos de toxicidad general, evaluando las anomalías macroscópicas producidas en las raíces, luego de estar en contacto con los extractos. Las mismas fueron fotografiadas e identificadas como tumores, ganchos y necrosis.

3.5.4.- Diseño de E2.

Una vez obtenida la concentración 50 para cada experiencia, se procedió a diseñar el segundo ensayo (E2), en el cual se estudiaron los efectos genotóxicos de los extractos sobre las raíces de *Allium cepa*.

El procedimiento fue similar a E1, en cuanto al diseño y ejecución. La diferencia fue que se procedió a trabajar con una concentración igual o superior a la concentración 50 calculada en E1.

Se diseñó E2 dejando crecer las raíces por 48hs en agua mineral baja en sodio, reemplazando el agua a las 24hs. Posteriormente se prepararon los extractos, con la misma metodología que en E1 y considerando la concentración 50 calculada. Se colocaron los bulbos en contacto durante 48hs.

Una vez finalizado el periodo se retiraron los bulbos, se limpiaron con abundante agua a los fines de eliminar las impurezas que pudieran generarse y luego se cortaron las raíces al ras.

3.5.5.- Fijación de raíces.

Se colocaron en tubos de ensayo con fijador FARMER preparado *in situ* y se las dejó reposar en heladera a -3 C° por 24hs.

Una vez transcurrido el tiempo, se retiraron las raíces del farmer y se colocaron en alcohol 70°, permaneciendo allí hasta el momento de ser utilizadas para la realización de preparados.

3.5.6.- Observación de mitosis.

Para la observación de la mitosis en las raicillas de *Allium cepa*, se utilizaron preparados histológicos realizados en el momento, seleccionando un total de 2 raicillas por cada bulbo, para cada uno de los 25 bulbos tratados en cada experimento. Una vez realizado el preparado, se tomaron fotografías con cámara MOTIC10 adherida al microscopio MOTIC con la finalidad de obtener imágenes de las diferentes fases mitóticas anómalas, como así también poder realizar luego el conteo de células y el procesamiento de datos.

TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

Para la obtención de preparados se procedió seleccionando 2 raíces por cada bulbo, colocando cada raíz bajo la lupa y eliminando cuidadosamente la cofia, ubicada en el extremo.

Luego se cortó una longitud de 3mm en promedio, considerando esta zona meristemática. Se colocó el tejido sobre un vidrio reloj y se le adicionó unas gotas de orceína acética. Con ayuda de una pinza se colocó el vidrio reloj directamente sobre la llama, balanceando el preparado constantemente para que el fuego no actúe directamente.

Se repitió este proceso 3 veces, adicionando orceína acética cada vez.

Una vez realizado el flameado se colocó el tejido sobre un portaobjeto, se le adicionaron unas gotas de orceína, y se colocó el cubreobjetos, realizando suavemente el “squash”.

Luego se procedió a observar al microscopio.

Reactivos solventes y equipamiento	
Acondicionamiento de bulbos	Cuchillo, Erlen meyer de 3lts.
Pretratamiento	Erlen meyer de 3 lts, lupa esteroscópica.
Diseño de E1	Dispositivo, motor de pecera, frascos de vidrio, material de vidrio, bisturí, lupa, calibre, cámara MOTIC, GraphPad Prism 6.
Diseño de E2.	Dispositivo, motor de pecera, frascos de vidrio, material de vidrio, bisturí, lupa, calibre, cámara MOTIC, orceína acetica
Fijación de raíces.	Tubos de ensayo, bisturí, fijador FARMER, alcohol 70°, heladera.
Observación de mitosis	Cámara MOTIC, orceína acética, material de vidrio, mechero de Bunzen

3.5.7.- Tabla 2. Reactivos, solventes y equipamiento utilizados en los ensayos de genotoxicidad.

3.6.- Estudios químicos.

Las pruebas fitoquímicas fueron diseñadas para tratar ambas especies en simultáneo, siguiendo la metodología de Wagner (1996) Plant drug analysis.

3.6.1.- Cromatografía en capa delgada.

Los análisis de cromatografía en capa delgada corresponden a análisis preliminares de la composición química de los mismos. Se realizó en placas de Kieselgel 60 F254 0,2 mm, Merck. Se recortaron fragmentos de 5cm de ancho por 6cm de largo para cada experimento. La siembra se realizó a 1cm de distancia del extremo inferior que estará en contacto con la fase móvil, y a una distancia de 2cm entre las distintas siembras. Se utilizaron frascos de precipitado de 250ml con tapa de vidrio, todas las pruebas se realizaron bajo campana de extracción.

El diseño de los experimentos incluyó 2 fases móviles, para todas las pruebas:

Sistema 1: de características polares compuesta por diez partes de acetato de etilo, una parte de ácido acético y una parte de agua, una vez preparada se retiró con pipeta el agua (ubicada en el fondo del Erlenmeyer), y se utilizó la fase orgánica.

Sistema 2: de características no polares conformada por tres partes de acetato de etilo, una parte de cloroformo y 4 gotas de ácido acético.

Las fases fueron preparadas en el momento de ser usadas.

Los Rf se calcularon como la relación entre la distancia recorrida por el compuesto en cm, sobre la distancia recorrida por el frente de corrida en cm.

3.6.1.1.- Revelado físico.

Las placas sembradas, con fase móviles polares y no polares fueron reveladas por luz ultravioleta de 254nm y 365nm en cuarto oscuro. Las mismas fueron fotografiadas también a luz visible.

3.6.1.2.- Revelado Químico.

Las placas sembradas, con fase móviles polares y no polares fueron reveladas por medio del reactivo “Natural Product” (NP, solución metanólica al 1% del éster β -etilamino del ácido difenilbórico), NP/PEG, calentadas a estufa y luego reveladas por luz ultravioleta.

3.6.2.- Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

Se utilizó el sistema de bombas binarias Waters 1525, con detector por arreglo de fotodiodos Waters 2998 (220-540nm). Cromatogramas adquiridos a MAXPLOT. Columna XBridge C18 5 μ m; 4,6x150mm; loop 20 μ l y la fase móvil se conformó con el sistema de desarrollo en gradiente A: Ácido acético: 0,1%; B: Metanol: 0,1%, como se detalla en el siguiente cuadro:

	Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1	0,01	0,50	90,0	10,0	0,0	6
2	45,00	0,50	43,0	57,0	0,0	6
3	60,00	0,50	0,0	100,0	0,0	6
4	65,00	0,50	0,0	100,0	0,0	6

Los extractos crudos y las fracciones fueron llevados a una concentración de 2mg/ml de metanol y fueron filtrados previamente a cada inyección.

3.6.3.- Cromatografía en columna.

Se utilizó una columna Sephadex LH20 de 36cm de alto, 2cm de diámetro y un total de 113ml de volumen. La fase móvil fue metanol

puro. Los extractos crudos fueron primero solubilizados a una concentración de 50mg/ml.

Una vez sembrado el extracto, el volumen de metanol equivalente al de la columna fue descartado y posteriormente fueron recolectadas las fracciones cada 25ml consecutivamente.

3.6.3.1.- Siembra.

Se descartó el metanol contenido en la columna hasta que apenas esté cubierto el sephadex. Luego se adicionó por medio de un capilar de vidrio, con cuidado y sobre las paredes de la columna, el extracto solubilizado en metanol, por medio de movimientos circulares. Una vez sembrado el mismo se depositó en el sephadex, y haciendo los mismos movimientos se colocó metanol sobre la siembra, con mucho cuidado de no mover el sephadex. Luego de que se agregaron unos 5cm de metanol por sobre el punto de siembra, se procedió a agregar metanol con ayuda de un embudo de vidrio, hasta completar la columna.

3.6.3.2.- Limpieza de columna.

La columna de Sephadex LH20 se limpió pasando a velocidad constante 3 volúmenes de columna de metanol y posteriormente agregando 5ml de dimetilsulfóxido, se dejó reposar y se volvió a adicionar 3 volúmenes de metanol. En todas las experiencias se utilizó alcohol metílico absoluto reactivo químico de Laboratorio Cicarelli (metanol).

Reactivos solventes y equipamiento	
Cromatografía en capa delgada.	Placa de Kieselgel 60 F254 0,2 mm, Merck, campana, balanza, acetato de etilo, cloroformo, ácido acético, agua destilada, luz ultravioleta, NP/PEG, pulverizador en spray, estufa.
Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).	Ácido acético, alcohol metílico absoluto reactivo químico, detector de diodos, columna C18, bomba binaria.
Cromatografía en columna.	Sephadex LH20, alcohol metílico absoluto reactivo químico, capilar de vidrio, DMSO.

3.6.4.- Tabla 3. Reactivos, solventes y equipamiento, utilizados en los estudios químicos.

3.7.- Estudios biológicos.

Los extractos crudos como las fracciones fueron ensayadas sobre líneas celulares tumorales, por medio del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Los ensayos biológicos se realizaron por duplicado, bajo las mismas condiciones para ambas especies vegetales.

3.7.1.- Líneas celulares.

Las líneas seleccionadas son pertenecientes a cáncer humano, de los siguientes tipos:

- MG-63 (ATCC® CRL-1427). Organism: *Homo sapiens*. Tissue bone. Disease osteosarcoma.
- MCF7 (ATCC® HTB-22). Organism: *Homo sapiens*. Tissue mammary gland, breast; derived from metastatic site: pleural effusion. Cell Type epithelial. Disease adenocarcinoma.
- MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26). Organism: *Homo sapiens*. Tissue mammary gland/breast; derived from metastatic site: pleural effusion. Cell Type epithelial. Disease adenocarcinoma.

3.7.2.- Repique de monocapa.

Se calentó el PBS, TRYPLE y medio a 37° C. Bajo el flujo laminar se retiró el medio de cultivo del frasco por medio de una pipeta, se lava la monocapa con PBS con cuidado de no romperla, luego se retira y descarta el PBS.

Se agrega el TRYPLE® y se lo dejó actuar el tiempo necesario dependiendo de cada línea. Se observó en microscopio invertido el desprendimiento de la monocapa. Posteriormente se agrega medio al frasco y se toma el volumen necesario. El recuento de células se realizó con cámara de newbauer, hasta lograr la concentración necesaria de células para cada ensayo.



Figura 7. Secuencia de pasos para el repique de monocapa. Fuente: Manual de Practicas de Cultivos en Tejidos. Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo". (2014).

3.7.3.- Inoculación de placas.

Para los ensayos se utilizaron Placa cultivo celular 96 wells para células adherentes, estériles en paquete individual, libres de DNAsa/RNAsa y apirogénicas. Marcación alfanumérica. Fondo plano. Marca: JETBIOFIL. Las líneas celulares fueron sembradas a una densidad de 25000 células por pocillo, utilizando un total de $1,75 \times 10^5$ células por cada placa medio RPMI 1640 por 24h hasta la formación de la monocapa. Los pocillos de los extremos no se sembraron, se les adicionó agua estéril con la finalidad de disminuir la evaporación del medio.

3.7.4.- Incubación.

Las placas permanecieron incubando en estufa de cultivo gaseada E.G. 4060 a 37° C, y 5% de CO₂, durante 24hs hasta la adherencia y la formación de la monocapa, en contacto con los extractos por un total de 48hs, y con el MTT un total de 3hs.

3.7.5.- Medios de cultivo.

Para todos los ensayos realizados para las líneas MCF-7 y MG-63 se utilizó el medio de cultivo DMEM. Para la línea MDA-MD-231 se utilizó el medio DMEM-F12.

3.7.6.- Diluciones de extractos.

Los extractos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración de 50mg/ml. Disueltos por medio de vórtex hasta la disolución total. A partir de esta solución se prepararon las concentraciones de cada ensayo, diluyendo el extracto con DMSO en el medio de cultivo utilizado en cada ocasión.

3.7.7.- Reacción con MTT.

Se utilizó el reactivo MTT preparado en el momento y almacenado en heladera a -3 C °. Transcurrido el tiempo de incubación con MTT de 3hs en estufa gaseada, se adiciono DMSO a cada pocillo, con la finalidad de disolver los cristales de formazan formados. La lectura de los resultados se realizó por medio del espectrofotómetro para micro placas Thermo Scientific™ 51119300.

3.7.8.- Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics, para el cálculo de IC₅₀ se utilizó el programa GraphPad Prism 6. Los gráficos corresponden al promedio y el desvío standard de los resultados obtenidos. Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre la media de viabilidad de un nivel de concentración a otro, la prueba de los múltiples rangos (LSD) para

determinar las diferencias significativas entre las diferentes medias de viabilidad de las concentraciones respecto a la media del control, y la regresión lineal como base para la comparación de modelos alternos y la selección del modelo que mejor describe el comportamiento de los datos.

La tabla ANOVA descompone la varianza de % viabilidad en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. El valor-P de la prueba-F cuando es menor que 0,05, prueba que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % viabilidad entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

La prueba de múltiples rangos aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior se han identificado grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica en su magnitud porcentual de la variabilidad en % Viabilidad. El coeficiente de correlación indica la relación entre las variables.

El error absoluto medio (MAE) es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en

el que se presentan en el archivo de datos. El valor-P cuando es menor que 0,05 indica una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0%.

Reactivos solventes y equipamiento	
Líneas celulares	MG-63, MCF-7, MDA-MD-231.
Repique de monocapa	Flujo laminar estéril, pipeta electrónica, material estéril, DMEM, DMEM-F12, cámara newbauer, microscopio invertido, PBS, TRYPLE®
Inoculación de placas	Placa de 96 pocillos JETBIOFIL, agua estéril.
Incubación	Estufa de cultivo gaseada E.G. 4060
Reacción con MTT	MTT, espectrofotómetro para micro placas, DMSO

3.7.9.- Tabla 4. Reactivos, solventes y equipamiento, utilizados en los estudios biológicos.

4.- Resultados

4.1.- Estudios farmacobotánicos.

4.1.1. – Selección de especies.

La selección de las especies surge del análisis de datos etnobotánicos y etnofarmacológicos realizados por la Dra. Yajía con anterioridad.

En su momento se habían analizado las drogas vegetales comercializadas en los diferentes Centros de distribución de la Ciudad de Posadas, para diferentes afecciones. El interés se centró en aquellas especies utilizadas en forma empírica para el tratamiento del cáncer en términos generales.

Una vez identificadas y seleccionadas las especies para continuar con el estudio, se procedió a realizar la identificación botánica de las mismas recolectando los caracteres de valor diagnóstico por medio de técnicas histológicas.

4.1.2. - Datos etnobotánicos.

Polygonum hydropiperoides* Michx. var. *hydropiperoides

(POLYGONACEAE)

Se lo considerada como un agente antineoplásico. Se utiliza la planta entera, en infusiones de tres o cuatro hojitas, una taza de té, en tres tomas diarias. Se comercializa en estado fresco y seco y sin envoltorio en el Mercado Municipal, en la Feria Franca de Villa Cabello y por vendedores ambulantes.

***Acanthospermum australe* (Loeffl.) O. Kuntze**

(ASTERACEAE)

Se considera una especie con propiedades antineoplásicas y para la curación de heridas externas. Se utiliza la parte aérea. El cocimiento de la planta, a razón de una rama hojosa por litro de agua, se utiliza para

todo tipo de neoplasias, en tomas continuadas durante varios meses. La misma forma de preparación se ingiere con el mate. Se comercializa la planta entera sin envoltorio y en estado fresco o seco. en el Mercado Municipal, en las Ferias Francas y Vendedores ambulantes.

4.1.3. - Relevamiento de comercialización de las especies.

Una vez registrados los datos etnobotánicos, se realizó una actualización de datos y material vegetal de los centros de comercialización de la Ciudad de Posadas, y también en campo, donde fueron ubicadas poblaciones de ambas especies.

El material vegetal se adquirió en la Feria Franca de la ciudad de Posadas, se adquirieron 30 muestras en estado fresco y sin envoltorio, comercializados en forma de mazos. Se evaluaron las características foliares por medio de técnicas farmacobotánicas de rutina, transcortes, moldes epidérmicos, desgarrados epidérmicos, etc. Los caracteres de valor diagnósticos han sido fotografiados Moticam 10.0 MP adherida al microscopio óptico Motic BA200.



Figura 8. Muestras adquiridas en la feria franca.

Sin embargo *P. hydropiperoides*, se encuentra en menor medida en los centros de distribución y a menudo confundida con *P. punctatum*, especie emparentada, que crece en el mismo hábitat y de similares características.

Se procedió a analizar Se puede destacar que actualmente que *A. australe* continúa siendo ampliamente utilizada, y no es confundida con *A. hispidum*.

Para el *P. hydropiperoides*, la droga vegetal se conformó de la parte aérea (tallos, hojas, inflorescencias y frutos). Se comercializa fresca enrollada. Se analizó la exomorfología de la droga vegetal, encontrando que la misma se conformaba de 2 especies diferentes ***Polygonum hydropiperoides*** Michx. var. ***hydropiperoides*** y ***Polygonum punctatum*** Elliot. A ambos se le atribuye el nombre vulgar “katái”, el cual se comercializa por sus propiedades empíricas como anticancerígeno, depurativo, antiinflamatorio, analgésico, antihemorroidal, entre otros.



Figura 9. Comparativo de *P. hydropiperoides* y *P. punctatum*. Especies identificadas formando parte de un mismo mazo.

Ambas especies son muy similares en cuanto a su exomorfología. Siendo un buen parámetro de comparación la presencia de tricomas en la superficie de la hoja de *P. hydropiperoides* y las ocreas glandulosas y cortas. El *P. punctatum*, a diferencia presenta sus hojas y ocreas glabras. Además, los tricomas de las ócreas son más largos. En cuanto al análisis micrográfico la diferencia radica en el número de estratos presentes en el parénquima en empalizada, siendo de 1-2 estratos de

células en *P. hydropiperoides* y 2-3 en *P. punctatum*. Los resultados fueron comparados con material de herbario certificado por IBONE, y bibliografía específica.

Se puede inferir que la situación actual encontrada para esta especie en el mercado local, donde se la comercializa en forma de mezcla, podría deberse a la gran similitud en cuanto a su exomorfología. Donde los recolectores y comerciantes podrían pasar por alto el hecho de que sean 2 especies diferentes (Los resultados obtenidos fueron publicados en el evento XII SIMPOSIO ARGENTINO DE FARMACOBOTÁNICA, bajo el nombre “Análisis micrográfico de drogas vegetales denominadas “katái”, comercializadas en la feria franca de la ciudad de posadas” en el año 2017).

Sin embargo, en los análisis realizados para *A. australe*, no se encontraron especies adulterantes, siendo que se encuentra *A. hispidum* con similares características, pero se puede concluir que no es comúnmente confundida con *A. australe*.



Figura 10. Muestra de *A. australe* comercializada.

4.1.4. - Caracterización macroscópica de la droga vegetal.

Polygonum hydropiperoides Michx. var. *hydropiperoides*.

Familia POLYGONACEAE

Sinónimos: *Polygonum hydropiperoides* var. *persicarioides* (Kunth) Stanford; *Polygonum persicarioides* Kunth; *Polygonum rivulare* Phil.

Nombres vulgares: “Caa-tay”, “yerba picante”, yerba de los dioses”.

Descripción exomorfológica:

Hierba perenne, de 30 a 100 cm de altura, con tallos decumbentes en la base y radicales en los nudos, luego erectos, de color rojizo, generalmente con puntuaciones glandulares. Flores hermafroditas, a veces polígamas. Cáliz de 4-5 sépalos hundidos, lobulados, subiguales. Estambres 4-5, inclusos o exsertos. Ovario súpero, comprimido o trígono unilocular, uniovulado; estilos 2-3 unidos o separados; estigmas capitados. Fruto aquenio lenticular o trígono incluido total o parcialmente en los sépalos acrescentes. Plantas leñosas o herbáceas, erguidas o decumbentes, terrestres o palustres, de hojas lineales, lanceoladas, hastadas, etc; Flores pequeñas dispuestas en fascículos, falsas espigas o panículas. Aquenios lenticulares o tríquetos.



Figura 11. A. Ocreas glandulosas cortas. B. Fruto aquenio tríquetro.



Figura 12. A. Inflorescencia de *P. hydropiperoides*. B. Detalle de ocreas y tallo rojizo característico.

***Acanthospermum australe* (Loeffl.) O. Kuntze**

Familia ASTERACEAE

Sinónimos: *Melampodium australe* Loeffl., *Acanthospermum brasilium* Schrank., *Centrospermum xanthioides* H. B. K.

Nombres vulgares: “Tapecué”, “tapekué”, “ypé rupá”.

Descripción exomorfológica:

Planta con tallos ramosos, decumbentes o ascendentes, pubescentes, hojosos hasta el ápice. Hojas opuestas, rómbico-ovadas, agudas u obtusas en el ápice, atenuadas en corto pecíolo en la base, dentado-aserradas en el margen, laxamente pubescentes y con pequeñas

glándulas en ambas caras, especialmente en la inferior. Capítulos pedicelados solitarios en las axilas de las hojas y en el extremo de las ramitas. Involucro acampanado; brácteas biseriadas envolviendo por completo los ovarios de las flores femeninas, pubescentes en el dorso. Flores amarillentas, dimorfas. Aquenios completamente envueltos por las brácteas interiores del involucro, dando lugar a un fruto fusiforme, cubierto totalmente de cerdas ganchudas rígidas.



Figura 13. Planta comercializada.

4.1.5. - Caracterización microscópica de la droga vegetal.

***Acanthospermum australe* (Loeffl.) O. Kuntze**

Descripción endomorfológica:

En vista superficial, la epidermis adaxial presenta células con contornos sinuosos y la abaxial, poligonales. Las estomas son anomocíticos y la lámina es anfiestomática. Asimismo, en ambas superficies se encuentran tricomas de cubierta pluricelulares uniseriados y tricomas glandulares capitados.

En el corte transversal de la hoja se observa un mesófilo de estructura dorsiventral, con clorénquima en empalizada 1-estratificado y parénquima esponjoso formado por varias capas de células pequeñas. En la nervadura central, el haz vascular es dorsiventral y posee forma lenticular.

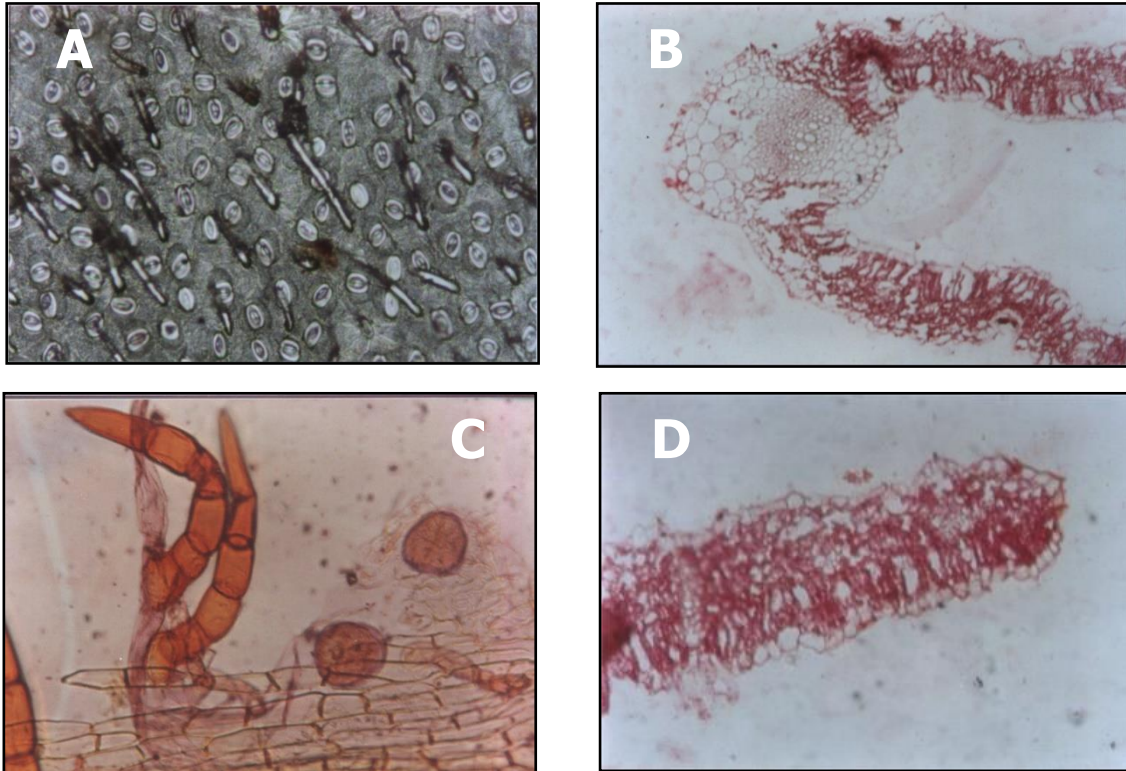


Figura 14 A. Epidermis adaxial con tricomas y estomas 200x. B. Corte transversal de la hoja 200x. C. Tricomas pluricelulares uniseriados y tricomas glandulares capitados 400x. D. Corte transversal de la lámina foliar 400x.

El transcorte del tallo muestra una epidermis con numerosos tricomas tectores y glandulares como los ya descritos y una banda de colénquima dispuesta hacia el interior; el cilindro central está constituido por numerosos haces colaterales discretos rodeados cada uno de ellos por un casquete de fibras asociadas al floema.

***Polygonum hydropiperoides* Michx. var. *hydropiperoides*.**

Descripción endomorfológica:

En vista superficial las células epidérmicas presentan contorno poligonal, con estomas anisocíticos, y abundantes tricomas tectores verrucosos unicelulares y glandulares bicelulares sésiles en depresiones de la epidermis abaxial.

En el corte transversal la hoja exhibe un mesófilo de estructura dorsiventral, con parénquima en empalizada uniestratificado y parénquima esponjoso laxo con numerosas drusas y glándulas que se presentan en relación con la epidermis adaxial. La nervadura media

posee tejido colenquimático en relación con ambas epidermis; el haz vascular es colateral.

En el corte transversal del tallo se observa una epidermis uniestratificada, con tricomas unicelulares de cubierta y tricomas de cubierta pluricelulares sésiles, 2-3 capas de colénquima laminar, y un anillo de fibras en posición pericíclica; el floema forma un anillo continuo; la médula parenquimática posee numerosas drusas y puede hallarse reabsorbida.

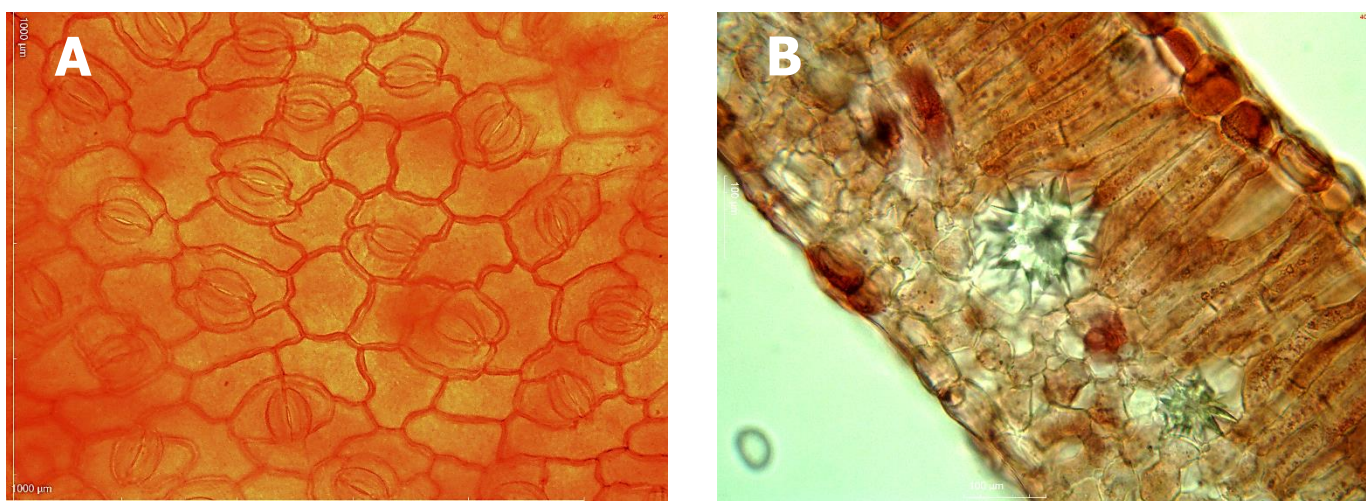


Figura 15. A. Diafanizado: estomas anisocíticos y células epidérmicas poliédricas de paredes anticlinales. B. C.T. hoja: Estructura dorsiventral, 1-2 estratos de parénquima empalizada, drusas de oxalato de calcio.

4.2. - Rendimiento de extractos.

Los extractos fueron realizados en el laboratorio de Farmacotecnia del módulo de Farmacia y Bioquímica, de la facultad de ciencias exactas químicas y naturales de la Universidad Nacional de Misiones. El procedimiento para ambas especies fue el mismo, utilizando la metodología descrita en 3.4.3. Las diferentes mezclas hidroalcohólicas fueron las siguientes:

- A. 20% de alcohol y 80% de agua.
- B. 50% de alcohol y 50% de agua.
- C. 80% de alcohol y 20% de agua.
- D. 100% de agua.

4.2.1. - Rendimiento de extractos hidroalcohólicos de *P. hydropiperoides*.

Considerando los extractos realizados a partir de 20 g de droga seca por cada 100ml de volumen final de extracto, posteriormente al secado en rotavapor se obtuvieron los siguientes rendimientos:

Tipo de Extracto	Rendimiento promedio en g cada 100 ml de extracto	Rendimiento en mg/ml de extracto	Rendimiento en mg/gr de droga seca
0 % alcohol	0,95 g	9,48 mg/ml	94,8 mg/g
20 % alcohol	0,96 g	9,65 mg/ml	96,5 mg/g
50 % alcohol	1,18 g	11,8 mg/ml	118 mg/g
80 % alcohol	0,95 g	9,48 mg/ml	94,8 mg/g

Tabla 5. Rendimiento de extractos de *P. hydropiperoides*.

Los extractos obtenidos de *P. hydropiperoides* presentaron buen aspecto, cristalino y de fácil manipulación.

El extracto de mejor rendimiento fue el que contenía 50% de alcohol.

4.2.2. - Rendimiento de extractos hidroalcohólicos de *A. australe*.

Considerando los extractos realizados a partir de 20 g de droga seca por cada 100ml de volumen final de extracto, posteriormente al secado en rotavapor se obtuvieron los siguientes rendimientos:

Tipo de Extracto	Rendimiento promedio en g cada 100 ml de extracto	Rendimiento en mg/ml de extracto	Rendimiento en mg/gr de droga seca
0 % alcohol	1,975 g	19,75 mg/ml	197,5 mg/g
20 % alcohol	1,95 g	19,5 mg/ml	195,5 mg/g
50 % alcohol	2,25 g	22,5 mg/ml	225,6 mg/g
80 % alcohol	2,06 g	20,6 mg/ml	206,1 mg/g

Tabla 6. Rendimiento de extractos de A. australe.

Los extractos obtenidos de *A. australe* a diferencia del anterior presentaron aspecto resinoso, de difícil manipulación.

El extracto de mejor rendimiento fue el que contenía 50% de alcohol.

A su vez el extracto de *A. australe* presenta un rendimiento superior al extracto de *P. hydropiperoides*.

4.3.- Estudios genotóxicos.

Para la realización de los estudios genotóxicos se decidió incluir a *P. punctatum*, especie afín a *P. hydropiperoides* ya que se considera utilizada para la misma finalidad a ambas especies.

4.3.1.- Concentración 50 de *P. punctatum*

Para el cálculo de la concentración 50, se probaron en el primer ensayo (E1) además de los controles, cuatro concentraciones (gramos de droga vegetal por litro de infusión): 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L y 12,5 g/L.

Se fotografiaron las raíces de todos los bulbos, y se midió la distancia de cada una, obteniéndose en promedio 3,5cm para las raíces control, 1,87 cm para 100 g/L, 2 cm para 50 g/L, 2,14 cm para 25 g/L y 2,16 cm para 12,5 g/L.

Con los datos obtenidos, por medio de GraphPad Prism, se obtuvo lo siguiente:

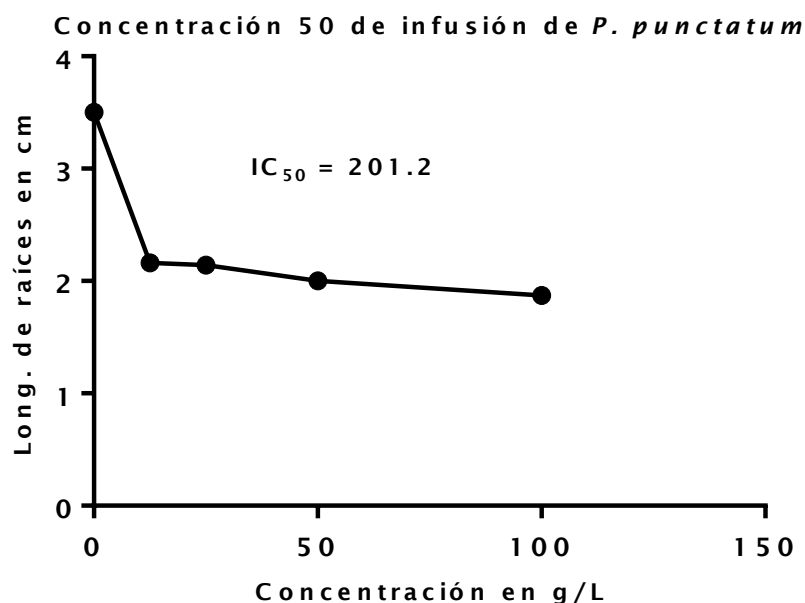


Gráfico 1. Estudio de la genotoxicidad de *P. punctatum*. Se grafica la longitud de las raíces en centímetros versus las concentraciones de 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L y 12,5 g/L. La concentración 50 obtenida surge de la extrapolación de la recta que une las diferentes dosis ensayadas.

El valor de IC₅₀ = 201,2 g/L se corresponde con un R² = 0,9807. Según los cálculos realizados el estudio de la genotoxicidad de los extractos de esta especie, deberían realizarse a una concentración igual o superior al IC₅₀ calculado. Pero dado que es una concentración muy alta, y las dificultades para obtener dicha infusión en el laboratorio, se utilizará el mismo diseño de E1 para observar la genotoxicidad, es decir repitiendo las mismas concentraciones.

4.3.2.- Concentración 50 de *P. hydropiperoides*.

Para el cálculo de la concentración 50, se probaron en el primer ensayo (E1) además de los controles, cuatro concentraciones (gramos de droga vegetal por litro de infusión): 100 g/L, 50 g/L y 25 g/L.

Se fotografiaron las raíces de todos los bulbos, y se midió la distancia de cada una, obteniéndose en promedio 3,82 cm para las raíces control, 1,67 cm para 100 g/L, 2 cm para 50 g/L, 2,23 cm para 25 g/L.

Con los datos obtenidos, por medio de GraphPad Prism, se obtuvo lo siguiente:

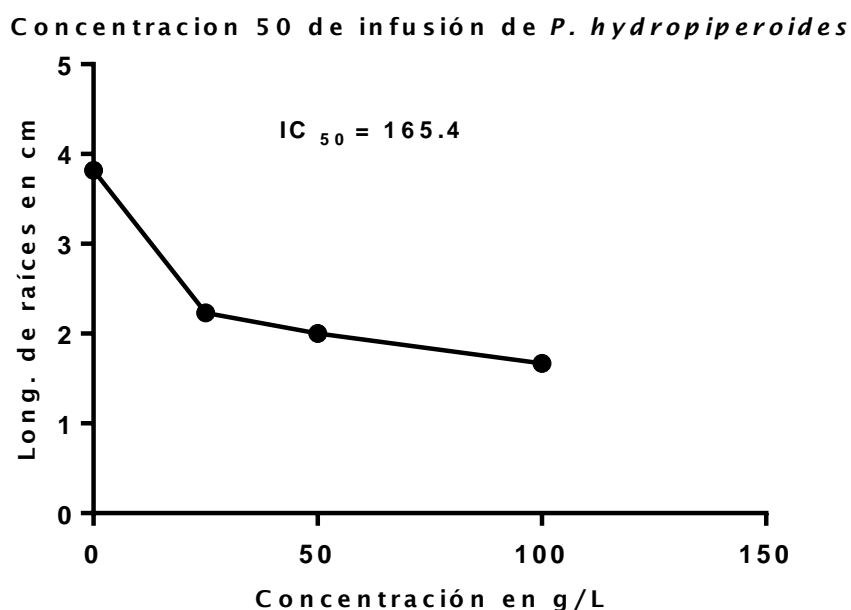


Gráfico 2. Estudio de genotoxicidad de *P. hydro Piperoides*. Se grafica la longitud de las raíces en centímetros versus las concentraciones de g/L. 100 g/L, 50 g/L y 25 g/L. La concentración 50 obtenida surge de la extrapolación de la recta que une las diferentes dosis ensayadas.

El valor de $IC_{50} = 165,4$ g/L se corresponde con un $R^2 = 0,9902$. Dados los resultados obtenidos en las pruebas biológicas, se desestimó continuar con el análisis de la genotoxicidad de *P. hydro Piperoides*.

4.3.3.- Concentración 50 de *A. australe*.

Para el cálculo de la concentración 50, se probaron en el primer ensayo (E1) además de los controles, cuatro concentraciones (gramos de droga vegetal por litro de infusión): 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L y 12,5 g/L.

Se fotografiaron las raíces de todos los bulbos, y se midió la distancia de cada una, obteniéndose en promedio 3,5cm para las raíces control,

1,94 cm para 100 g/L, 2 cm para 50 g/L, 2,22 cm para 25 g/L y 2,32 cm para 12,5 g/L.

Con los datos obtenidos, por medio de GraphPad Prism, se obtuvo lo siguiente:

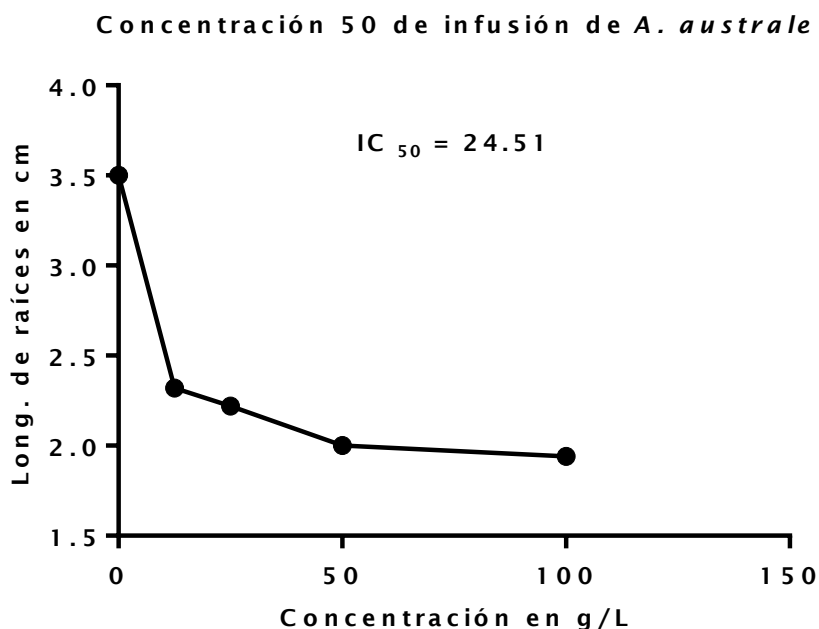


Gráfico 3. Estudio de la genotoxicidad de *A. australe*. Se grafica la longitud de las raíces en centímetros versus las concentraciones de 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L y 12,5 g/L. La concentración 50 obtenida surge de la extrapolación de la recta que une las diferentes dosis ensayadas.

El valor de $IC_{50} = 24,51$ g/L se corresponde con un $R^2 = 0,9672$. Si bien IC_{50} es menor que las anteriores, es una concentración elevada comparada con la utilizada en medicina tradicional. El análisis de la genotoxicidad entonces, se diseñó en función de una concentración superior a la calculada.

4.3.4.- Toxicidad general de *P. punctatum*

Los datos de toxicidad general fueron tomados de E1. Fueron fotografiadas todas las raicillas, de todos los bulbos de todas las

concentraciones probadas. Contabilizando tumores 11 %, ganchos 15 % y necrosis 45 %.

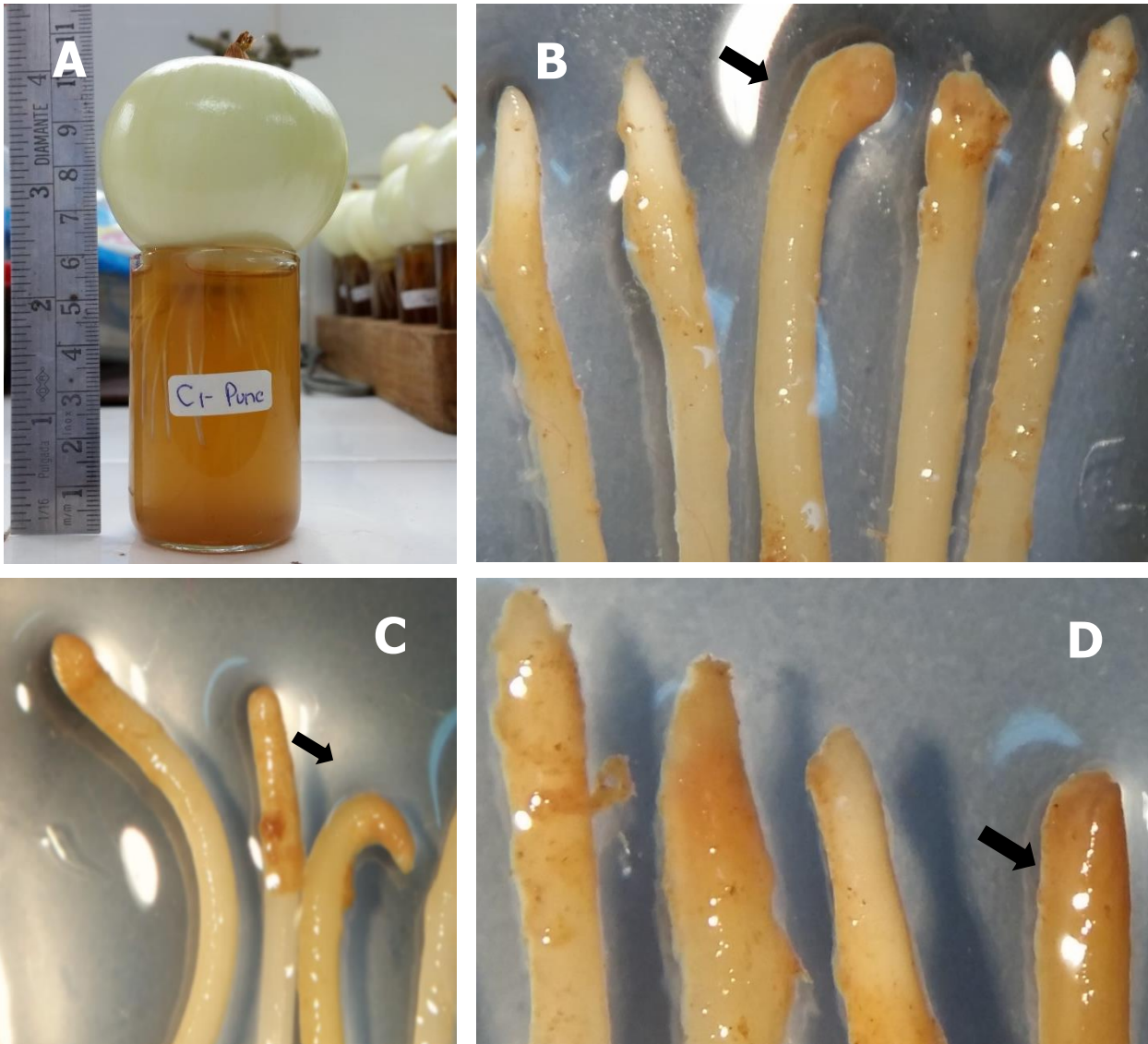


Figura 15. A. Diseño de E1. B, C y D corresponden a raicillas expuestas a 100 g/L de infusión de *P. punctatum* mostrando las anomalías macroscópicas encontradas. B Tumor. C. Gancho. D. Necrosis.

4.3.5.- Toxicidad general de *P. hydropiperoides*

Los datos de toxicidad general fueron tomados de E1. Fueron fotografiadas todas las raicillas, de todos los bulbos de todas las concentraciones probadas. Contabilizando tumores 21 %, ganchos 10 % y necrosis 45 %.

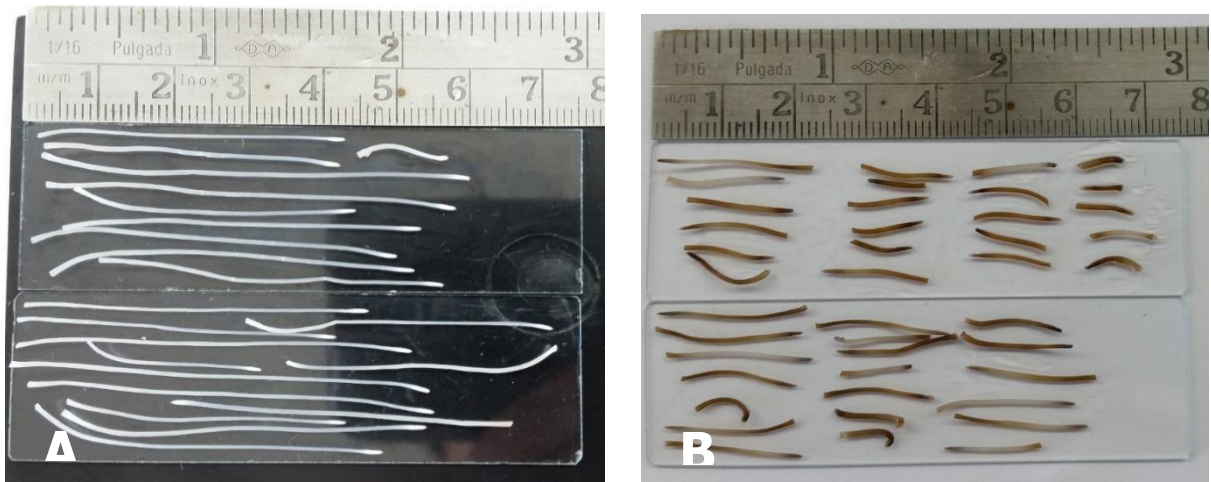


Figura 16. A. Raíces del grupo control. B. Raíces que han estado en contacto con los extractos.

4.3.6.- Toxicidad general de *A. australe*.

Los datos de toxicidad general fueron tomados de E1. Fueron fotografiadas todas las raicillas, de todos los bulbos de todas las concentraciones probadas. Contabilizando tumores 10 %, ganchos 13 % y necrosis 35 %.

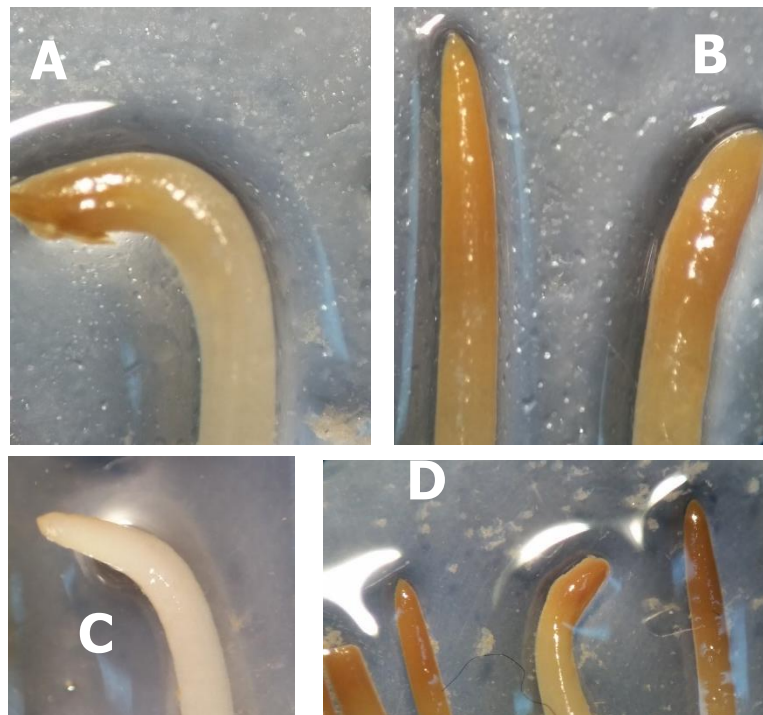


Figura 17. A y C. Detalle de ganchos. B y D. tumores y necrosis.

4.3.7.- Genotoxicidad de *P. punctatum*.

En E2 se analizaron las anomalías microscópicas, los porcentajes de cada fase de la mitosis para cada una de las concentraciones estudiadas de 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L, y los índices mitóticos.

Concentraciones	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Citocinesis
100 g/L	90%	8%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
50 g/L	86%	10%	2%	1%	1%	0,5%
25 g/L	83%	11%	3%	1,5%	1%	0,5%

Tabla 7. Porcentajes de cada fase de la mitosis, en función de las concentraciones probadas para las infusiones de *P. punctatum*.

Se contabilizaron un total de 2500 células contabilizadas por raíz, por cada bulbo, de cada concentración analizada. Las aberraciones cromosómicas se corresponden a un 2 % del total de células contabilizadas. Fueron encontradas metafases pegajosas y puentes anafase/telofase.

$$\text{Índice mitótico} = \left(\frac{\text{total de células en división}}{\text{total de células contabilizadas}} \right) \times 100$$

Concentraciones	Anomalías microscópicas	Índice mitótico	Tiempo de exposición	Número de células contadas
0 g/L	0%	20%	48 h	2500
100 g/L	0,44%	10%	48 h	2500
50 g/L	0,32%	13%	48 h	2500
25 g/L	0,20%	15%	48 h	2500

Tabla 8. Resumen de resultados obtenidos para las infusiones de *P. punctatum*.

Las concentraciones más elevadas mostraron mayor inhibición de la mitosis (IM=10% y 13% respectivamente) con respecto a los controles (IM=20%). Si bien no son concentraciones usuales en las que se utiliza *P. punctatum*, pueden considerarse genotóxicas, observándose efectos

tóxicos dependientes de la concentración del extracto. El efecto del extracto se manifiesta en la disminución del índice mitótico, el aumento del número de células en estadio de interfase y el número de anomalías microscópicas obtenidas para cada concentración.

Tabla ANOVA para % viabilidad por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	459,4	5	153,133	52,80	0,0000
Intra grupos	46,4	16	2,9		
Total (Corr.)	505,8	19			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Aberraciones entre un nivel de concentraciones y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Aberraciones por concentraciones

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	5	0,4	X
25	5	3,4	X
50	5	7,4	X
100	5	13,2	X

En la tabla se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. Las diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de concentración se muestran con las diferencias en las X's.

Diferencias estimadas entre las medias.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 25	*	-3,0	2,28321
0 - 50	*	-7,0	2,28321
0 - 100	*	-12,8	2,28321
25 - 50	*	-4,0	2,28321
25 - 100	*	-9,8	2,28321
50 - 100	*	-5,8	2,28321

* indica una diferencia significativa.

Se muestran las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

En la figura 19, se observan los preparados analizados de los controles y las anomalías microscópicas relevadas en el presente análisis.

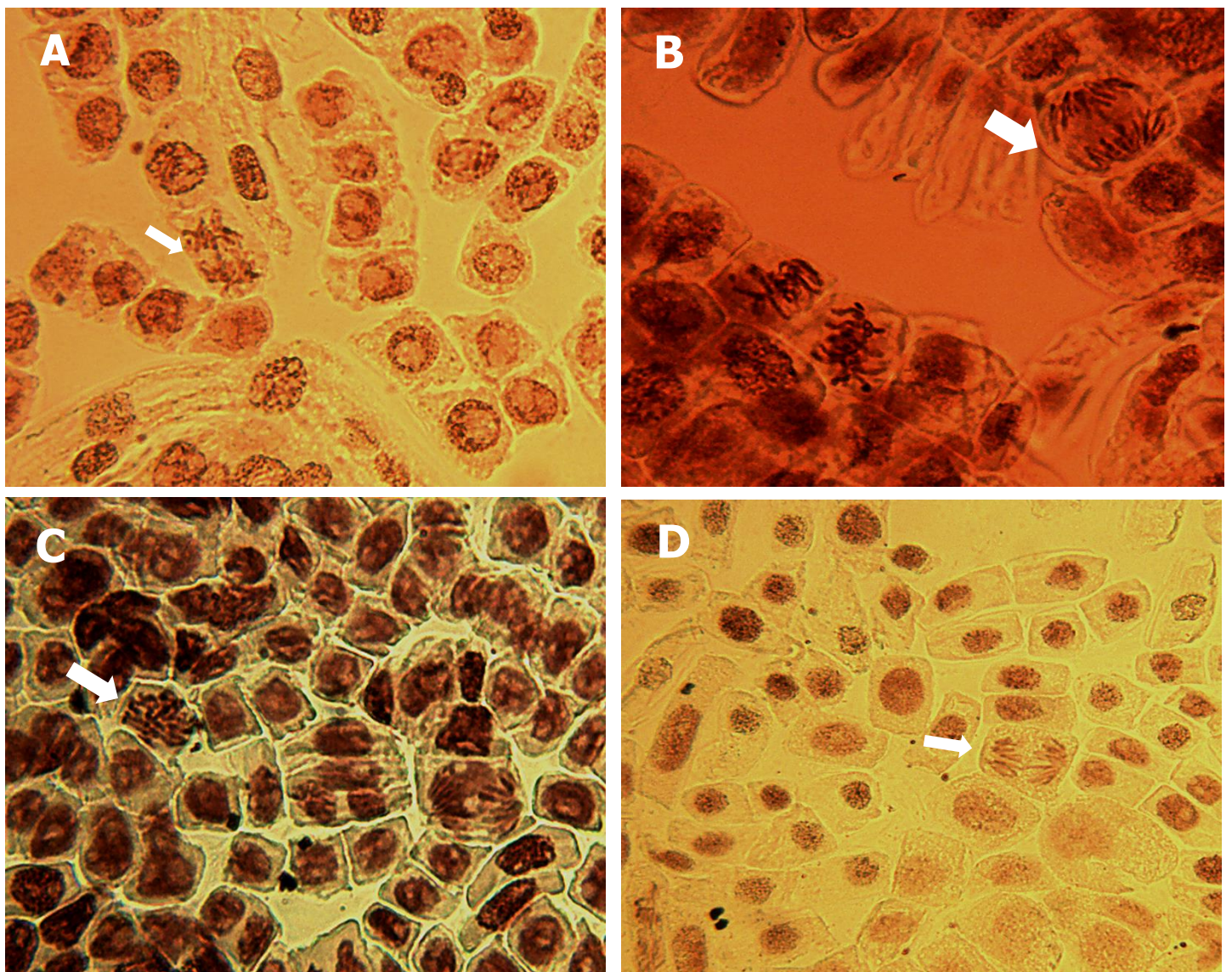


Figura 18. Resultados de Genotoxicidad. A, B y C. Detalle de Anafase puente. D. Metafase anómala con cromosomas rezagados y desordenados.

4.3.8.- Genotoxicidad de *A. australe*.

En E2 se analizaron las anomalías microscópicas, los porcentajes de cada fase de la mitosis para cada una de las concentraciones estudiadas de 150 g/L, 75 g/L, 37,5 g/L, y los índices mitóticos.

Concentraciones	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Citocinesis
150 g/L	89%	7%	1,5%	1%	1%	0,5%
75 g/L	86%	10%	1%	1,5%	1%	0,5%
37,5 g/L	84%	12%	2%	1%	0,5%	0,5%

Tabla 9. Porcentajes de cada fase de la mitosis, en función de las concentraciones probadas para las infusiones de *A. australe*.

Se contabilizaron un total de 2500 células contabilizadas por raíz, por cada bulbo, de cada concentración analizada. Las aberraciones cromosómicas se corresponden a un 1 % del total de células contabilizadas. Fueron encontradas metafases pegajosas y puentes anafase/telofase.

$$\text{Índice mitótico} = \left(\frac{\text{total de células en división}}{\text{total de células contabilizadas}} \right) \times 100$$

Concentraciones	Anomalías microscópicas	Índice mitótico	Tiempo de exposición	Número de células contadas
0 g/L	0%	20%	48 hs	2500
150 g/L	0,95%	11%	48 hs	2500
75 g/L	0,68%	14%	48 hs	2500
37,5 g/L	0,33%	16%	48 hs	2500

Tabla 10. Resumen de resultados obtenidos para las infusiones de *A. australe*.

Las concentraciones más elevadas mostraron mayor inhibición de la mitosis (IM=11% y 14% respectivamente) con respecto a los controles (IM=20%). Si bien no son concentraciones usuales en las que se utiliza *A. australe*, pueden considerarse genotóxicas, observándose efectos tóxicos dependientes de la concentración del extracto. El efecto del

extracto se manifiesta en la disminución del índice mitótico, el aumento del número de células en estadio de interfase y el número de anomalías microscópicas obtenidas para cada concentración.

Tabla ANOVA para % viabilidad por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6299,2	3	2099,73	271,81	0,0000
Intra grupos	123,6	16	7,725		
Total (Corr.)	6422,8	19			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Aberraciones entre un nivel de concentraciones y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Aberraciones por concentraciones

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0 g/L	5	0,6	X
25 g/L	5	9,8	X
50 g/L	5	16,2	X
100 g/L	5	47,8	X

En la tabla se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. Las diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de concentración se muestran con las diferencias en las X's.

Diferencias estimadas entre las medias.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 37,5	*	-9,2	5,03152
0 - 75	*	-15,6	5,03152
0 - 150	*	-47,2	5,03152
37,5 - 75	*	-6,4	5,03152
37,5 - 150	*	-38,0	5,03152
75 - 150	*	-31,6	5,03152

* indica una diferencia significativa.

Se muestran las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del

95,0% de confianza. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

En la figura 20, se observan los preparados analizados de los controles y las anomalías microscópicas relevadas en el presente análisis.

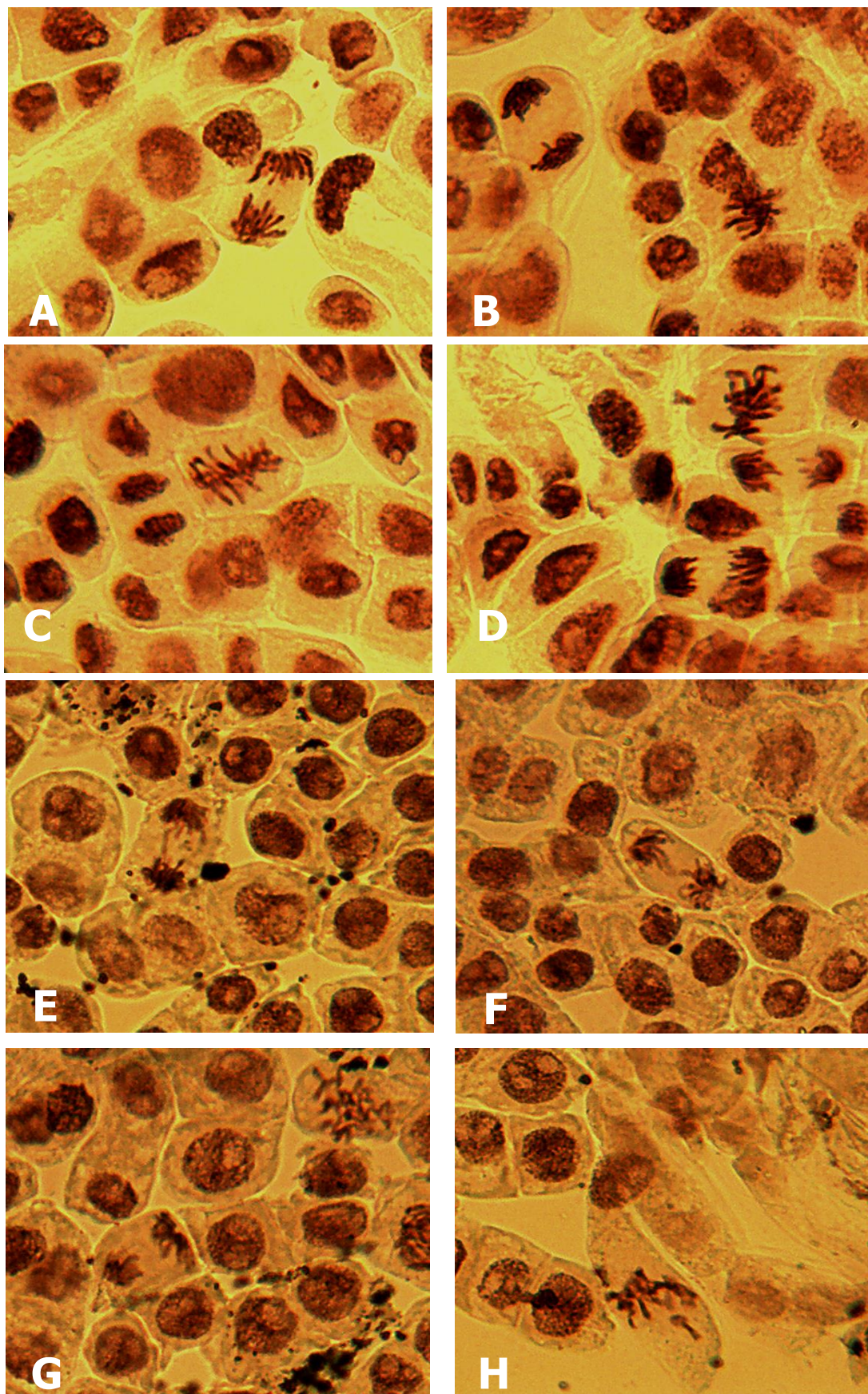


Figura 19. Preparados obtenidos en el estudio de la genotoxicidad de *A. australe*.
CONTROLES: A. Anafase. B. Telofase y metafase. C y D. Metafase y telofase. **GENOTOXICIDAD:** E y F. Detalle de Anafase puente. G y H. Metafase anómala con cromosomas rezagados y desordenados.

4.4.- Estudios químicos.

Los resultados se expresan con fotografías de las placas de TLC, donde se han sembrado los extractos de menor a mayor contenido alcohólico (de izquierda a derecha). Se colocaron los Rf sobre las corridas obtenidas, y al final se muestran en una tabla para facilitar su lectura.

Las fases móviles utilizadas para todas las experiencias fueron detalladas en materiales y métodos.

4.4.1.- Cromatografía en capa delgada de los extractos crudos

Para el análisis de TLC, se utilizaron los extractos crudos obtenidos como se menciona previamente.

Todos los experimentos se fotografiaron a la luz visible, UV 254nm y UV 365nm. Los Rf se calcularon en cm.

Se realizaron 2 tipos de corridas para cada tipo de material, una con una fase móvil polar (Sistema 1: fase orgánica de 10 partes de acetato de etilo / 1 parte de ácido acético / 1 una parte de agua), y otra con una fase móvil no polar (Sistema 2: 3 partes de acetato de etilo / 1 parte de cloroformo / 4 gotas de ácido acético).

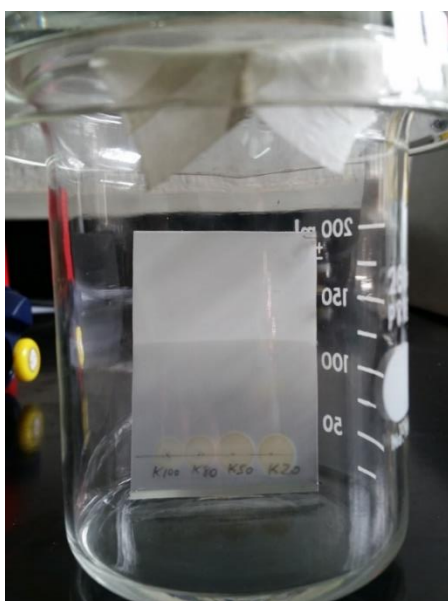


Figura 20. Diseño del experimento. Cromatografía en capa delgada.

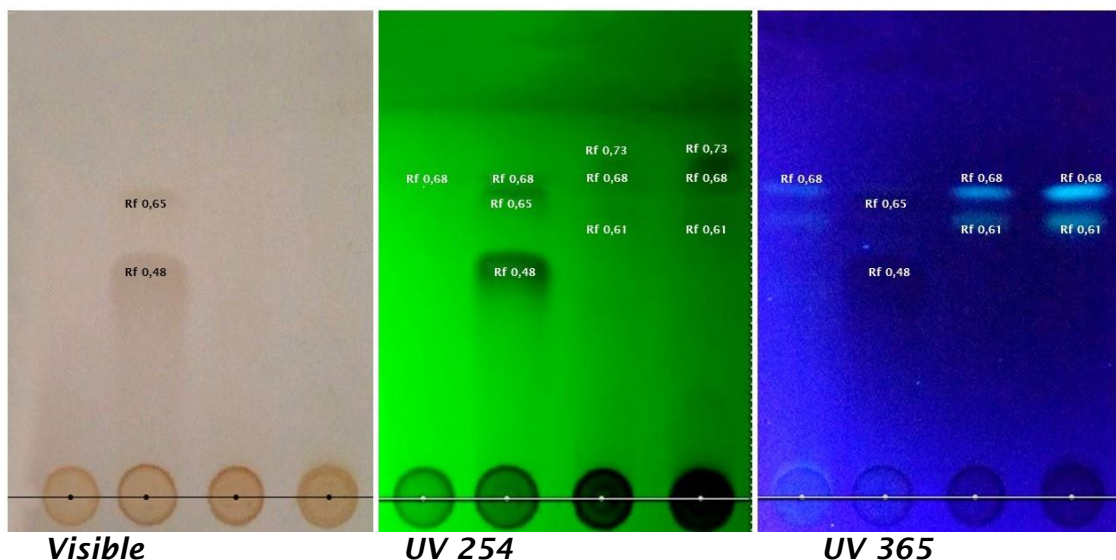


Figura 21. TLC de *P. hydropiperoides* en Sistema 1 (10 acetato de etilo / 1 ácido acético / 1 agua). Comparación del comportamiento de los distintos extractos hidroalcohólicos

Fracción n Rf	100			80			50			20		
	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm
0,73								X			X	
0,68		X	X		X			X	X		X	X
0,65				X	X	X						
0,61			X					X	X		X	X
0,48				X	X	X						

Tabla 11. Fracciones obtenidas de *P. hydropiperoides* en sistema 1 con los extractos hidroalcohólicos: 100= 100% agua; 80= 80% agua 20% alcohol; 50 = 50% agua 50% alcohol; 20= 20%agua 80%alcohol.

Al analizar los 4 extractos crudos de *P. hydropiperoides* frente al sistema 1 se observan 5 fracciones. El compuesto de Rf 0,65 fue extraída por todas las mezclas hidroalcohólicas. Únicamente el extracto 80, se encuentra enriquecido en la sustancia de Rf 0,48.

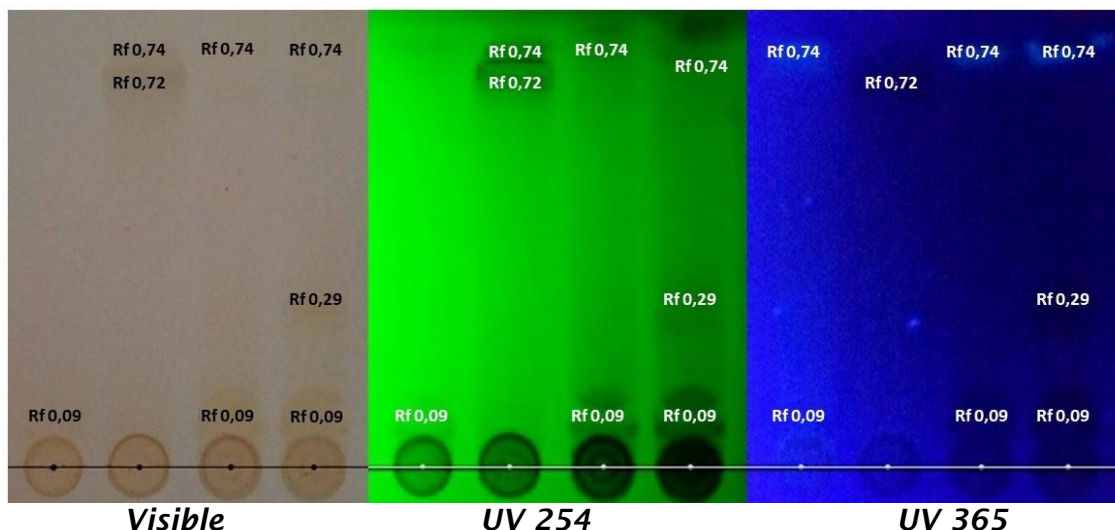


Figura 22. TLC de *P. hydropiperoides* en Sistema 2: 3 acetato de etilo / 1 cloroformo / 4 gotas de ácido acético. Comparación del comportamiento de los distintos extractos hidroalcohólicos.

Fracción n Rf	100			80			50			20		
	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm
0,74			X	X	X		X	X	X	X	X	X
0,72				X	X	X						
0,29									X	X	X	X
0,09	X	X	X				X	X	X	X	X	X

Tabla 12. Fracciones obtenidas de *P. hydropiperoides* en sistema 2 con los extractos hidroalcohólicos: 100= 100% agua; 80= 80% agua 20% alcohol; 50 = 50% agua 50% alcohol; 20= 20%agua 80%alcohol.

Al analizar los 4 extractos crudos de *P. hydropiperoides* en el sistema 2, se observan 4 fracciones. El compuesto de Rf 0,74 fue extraída por todas las mezclas hidroalcohólicas utilizadas. El extracto 80% agua, se encuentra enriquecido en el compuesto de Rf 0,72 y el 20% agua en la de Rf 0,29.

En los sistemas 1 y 2, salvo algunas excepciones, la mezcla hidroalcohólica correspondiente al 20 de agua y 80 de alcohol, resultó ser la más enriquecida en compuestos. Por lo que en base a estos resultados, se seleccionara ese extracto (20% agua) para realizar el fraccionamiento en columna.

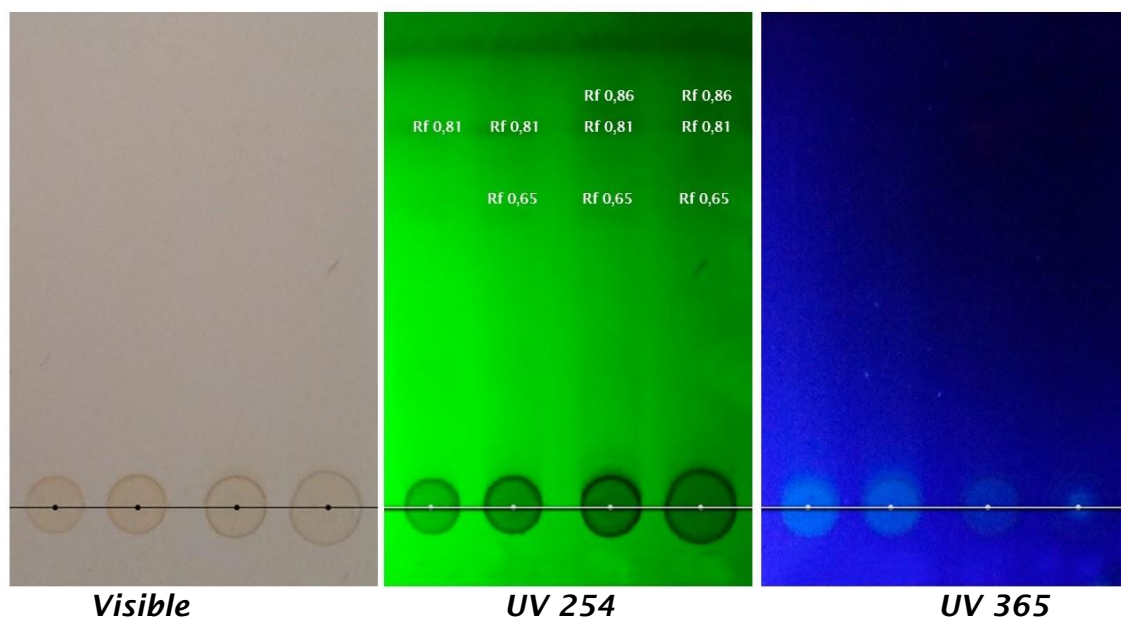


Figura 23. TLC de *A. australe* en Sistema 1 (10 acetato de etilo / 1 ácido acético / 1 agua).. Comparación del comportamiento de los distintos extractos hidroalcohólicos.

Fracción Rf	100			80			50			20		
	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm
0,86								X			x	
0,81		X			X			X			x	
0,65					x			x			x	

Tabla 13. Fracciones obtenidas de *A. australe* en sistema 1 con los extractos hidroalcohólicos:
100= 100% agua; 80= 80% agua 20% alcohol; 50 = 50% agua 50% alcohol; 20= 20%agua
80%alcohol.

Al analizar los 4 extractos crudos de *A. australe* frente al sistema 1, se observan 3 fracciones. El compuesto de Rf 0,81 que absorbe al UV 254nm, fue extraída por todos los extractos.

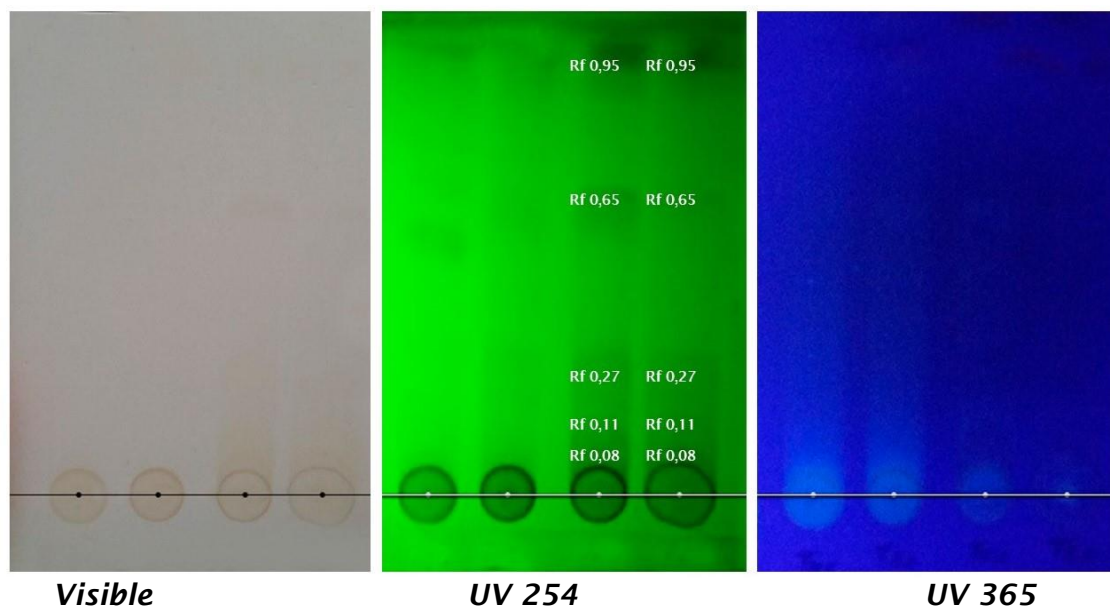


Figura 24. TLC de *A. australe* en Sistema 2 (3 acetato de etilo / 1 cloroformo / 4 gotas de ácido acético). Comparación del comportamiento de los distintos extractos hidroalcohólicos.

Fracción n Rf	100			80			50			20		
	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Visible	UV 254 nm	UV 365 nm
0,95								X			X	
0,65								X			X	
0,27								X			X	
0,11								X			X	
0,08								X			X	

Tabla 14. Fracciones obtenidas de *A. australe* en sistema 1 con los extractos hidroalcohólicos:
100= 100% agua; 80= 80% agua 20% alcohol; 50 = 50% agua 50% alcohol; 20= 20% agua 80% alcohol.

Al analizar los 4 extractos crudos de *A. australe* frente al sistema 2, se observan 5 fracciones. Puede observarse como los extractos de mayor contenido alcohólico en la mezcla, son los más enriquecidos en componentes de distintos Rf.

En los sistemas 1 y 2, la mezcla hidroalcohólica correspondiente al 20 de agua y 80 de alcohol, resultó ser la más enriquecida. Por lo que se utilizará ese extracto para realizar el fraccionamiento en columna.

4.4.2.- Cromatografía en columna.

Para la separación mediante cromatografía de filtración por geles se utilizó una columna SEPHADEX LH20. La experiencia se realizó por

duplicado para ambas especies *P. hydropiperoides* y *A. australe*. Se sembraron soluciones saturadas de extracto seco al 80% de alcohol, a una concentración de 500 mg/ml en metanol para el extracto de *P. hydropiperoides* y de 915 mg/ml para el extracto de *A. australe* y luego agregado volumen constante de metanol, hasta atravesar la columna y la correspondiente separación de las fracciones.

Una vez sembrado el extracto, el volumen de metanol equivalente al de la columna fue descartado (110ml) y posteriormente fueron recolectadas las fracciones cada 25ml consecutivamente.



Figura 25. A. Columna sembrada. B y C. Fracciones obtenidas suspendidas en metanol.

Fueron seleccionados para ser separados, los extractos más enriquecidos que son los de mayor contenido alcohólico. Se obtuvieron un total de 8 fracciones para *P. hydropiperoides*, y 6 para *A. australe*. Las mismas fueron rotavaporadas, y llevadas a sequedad total. Posteriormente resuspendidas en 1ml de metanol cada una. Luego las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante TLC y HPLC.

4.4.2.1.- Rendimiento de la separación de extractos de *P. hydropiperoides*.

El extracto 20% agua y 80% alcohol de *P. hydropiperoides* fue separado en un total de 8 fracciones, obteniéndose los siguientes rendimientos promedio para ambas separaciones.

Fracciones	Peso seco en mg	Representación del total en %	Volumen utilizado de metanol
F1	48,8 mg	9,76 %	138 ml
F2	126,3 mg	25,26 %	25 ml
F3	19,15 mg	3,83 %	25 ml
F4	39,45 mg	7,89 %	25 ml
F5	9,85 mg	1,97 %	25 ml
F6	9,3 mg	1,86 %	25 ml
F7	8,45 mg	1,69 %	25 ml
F8	3,45 mg	0,69 %	25 ml

Tabla 15. Resumen de los rendimientos obtenidos para el extracto de *P. hydropiperoides*.

Se partió de una concentración de 500 mg/ml de metanol por cada columna de separación, ya que fue la concentración máxima lograda en metanol. El extracto de 80% alcohol de *P. hydropiperoides* resultó tener una solubilidad limitada en metanol.

Una vez obtenidas las fracciones, fueron redisueltas en 1ml de metanol y almacenadas en heladera hasta el momento de su utilización.

4.4.2.2.- Rendimiento de la separación de extractos de *A. australe*.

El extracto 80% alcohol de *A. australe* fue separado en un total de 8 fracciones, obteniéndose los siguientes rendimientos promedio para ambas separaciones.

Fracciones	Peso seco en mg	Representación del total en %	Volumen necesario de metanol
F1	134,15 mg	14,66 %	138 ml
F2	251,35 mg	27,46 %	25 ml
F3	22,3 mg	2,43 %	25 ml
F4	20,25 mg	2,21 %	25 ml
F5	17,05 mg	1,86 %	25 ml
F6	9,35 mg	1,02 %	25 ml

Tabla 16. Resumen de los rendimientos obtenidos para el extracto de *A. australe*.

Se partió de una concentración de 915 mg/ml de metanol por cada columna de separación, ya que fue la concentración máxima lograda en metanol. El extracto de 20% agua y 80% alcohol de *A. australe* resultó tener mejor solubilidad en metanol, lo que permitió elevar la concentración inicial respecto a *P. hydropiperoides*.

Una vez obtenidas las fracciones, fueron redisueltas en 1 ml de metanol y almacenadas en heladera hasta el momento de su utilización.

4.4.3.- Cromatografía en capa delgada de las fracciones obtenidas.

Una vez obtenidas las fracciones de los extractos de *P. hydropiperoides* y de *A. australe* por medio de cromatografía en columna, las mismas fueron analizadas por medio de cromatografía en capa delgada, en las mismas fases móviles que los extractos crudos.

Fueron reveladas físicamente a través de la luz UV (presentado en la misma imagen), y luego reveladas con NP/PEG con el fin de corroborar la presencia de flavonoides (presentado en 4.4.4.- Cromatografía en capa delgada de las fracciones reveladas con NP/PEG).

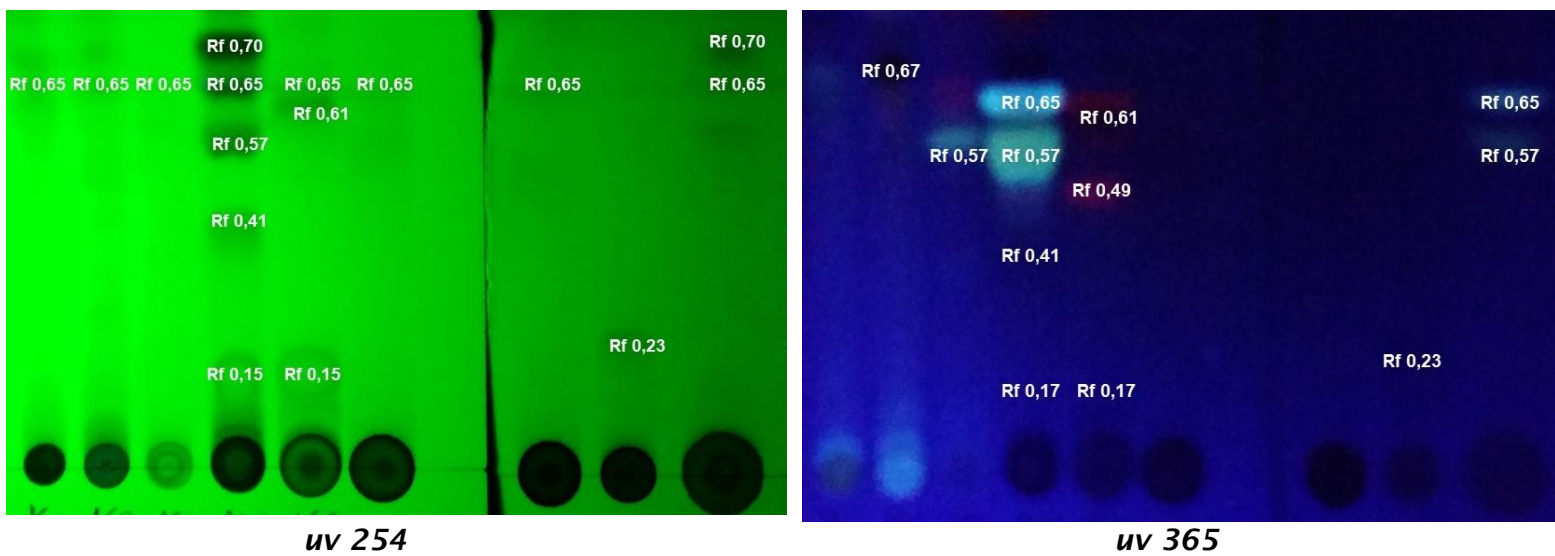


Figura 26. TLC en Sistema 1 (10 acetato de etilo / 1 ácido acético / 1 agua) de las fracciones obtenidas de *P. hydropiperoides*.

Rf	F1		F2		F3		F4		F5		F6		F7		F8	
	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm
0,70							X									
0,67				X												
0,65	X		X		X		X	X	X		X		X		X	
0,61									X	X						
0,57						X	X	X								
0,49										X						
0,41							X	X								
0,23															X	
0,15							X	X	X	X						

Tabla 17. Fracciones obtenidas de *P. hydropiperoides* en sistema 1 con las 8 fracciones.

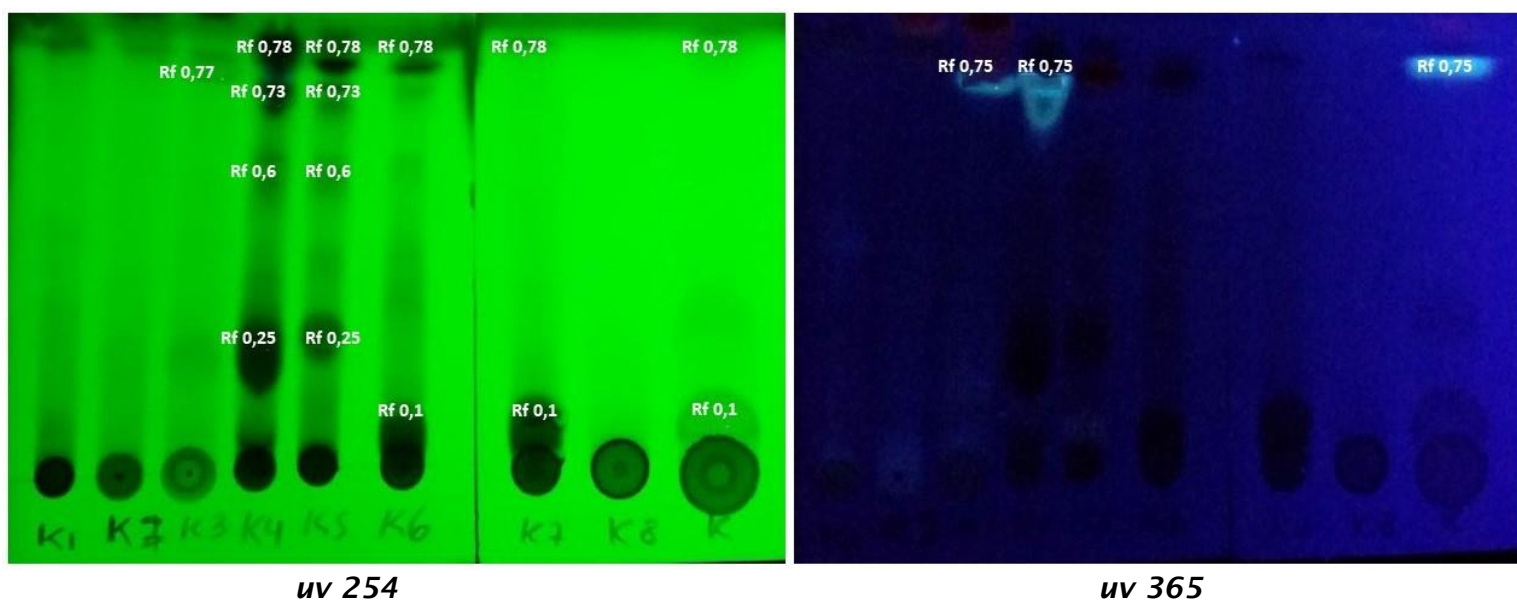


Figura 27. TLC en Sistema 2 (3 acetato de etilo / 1 cloroformo / 4 gotas de ácido acético) de las fracciones obtenidas de *P. hydropiperoides*

Rf	F1		F2		F3		F4		F5		F6		F7		F8	
	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm
0,78							X		X		X		X			
0,77					X											
0,75						X		X								
0,73							X		X							
0,6							X		X							
0,25							X		X							
0,1											X		X			

Tabla 18. Fracciones obtenidas de *P. hydropiperoides* en sistema 2 con las 8 fracciones.

En esta experiencia se han comparado las 8 Fracciones separadas de *P. hydropiperoides*, comparadas con el extracto crudo. El compuesto presente en el extracto crudo que absorbe al UV 365nm, está presente en las fracciones 3 y 4. Las fracciones 4 y 5 son las más enriquecidas.

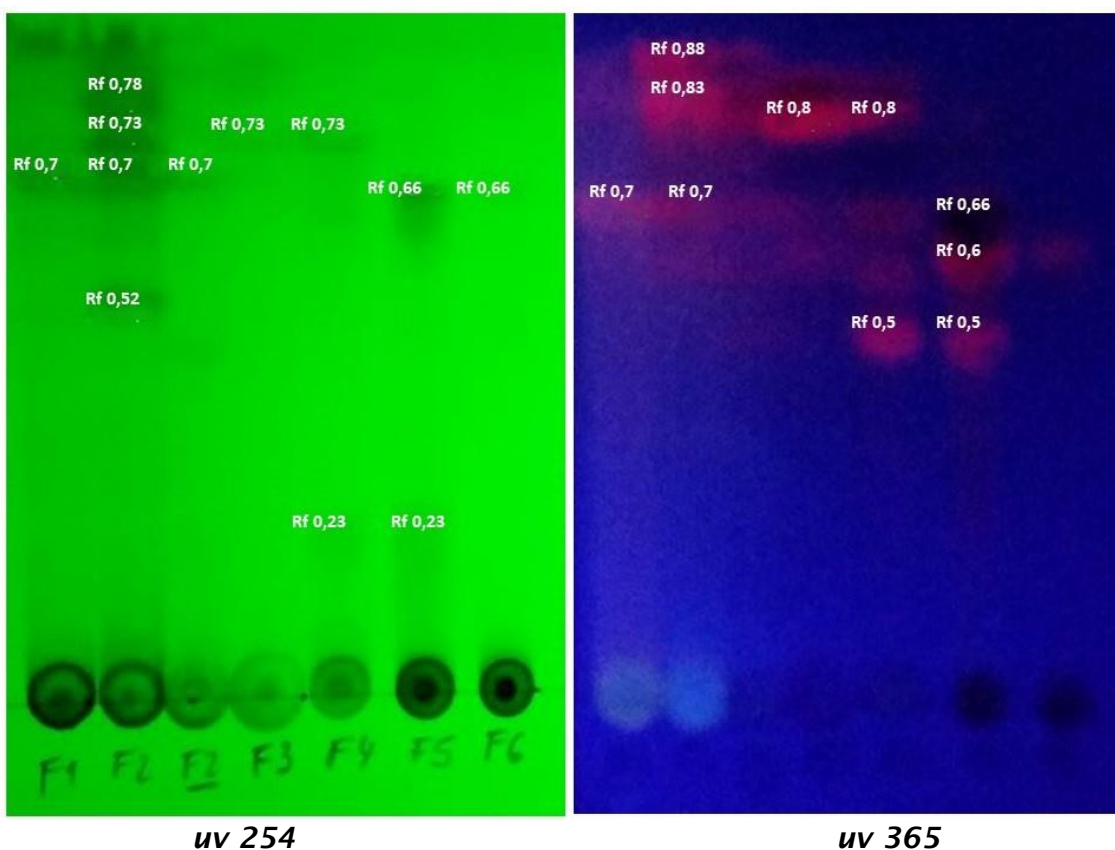


Figura 28: TLC en Sistema 1 (10 acetato de etilo / 1 ácido acético / 1 agua) de las fracciones obtenidas de *A. australe*.

Rf	F1		F2		F3		F4		F5		F6	
	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm
0,88				X								
0,83				X								
0,8								X		X		
0,73			X									
0,7			X		X		X					
0,66	X	X	X	X								
0,6									X		X	
0,52												
0,5			X									
0,23							X		X			

Tabla 19. Fracciones obtenidas de *A. australe* en sistema 1 con las 6 fracciones.

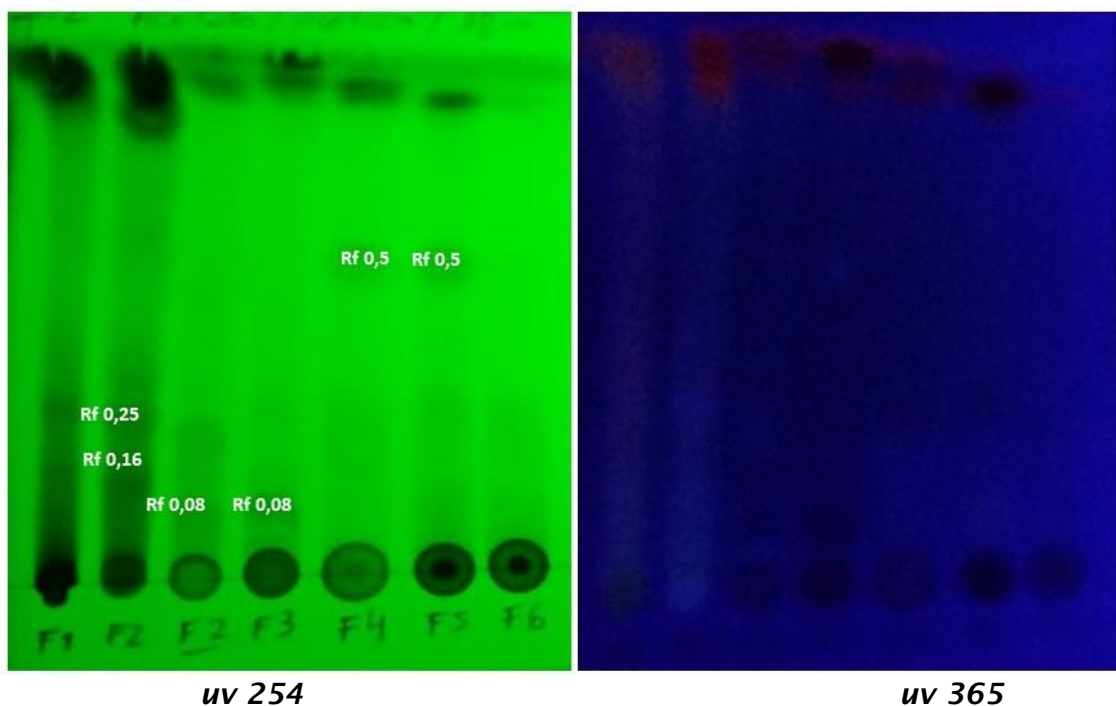


Figura 29: TLC en Sistema 2 (3 acetato de etilo / 1 cloroformo / 4 gotas de ácido acético) de las fracciones obtenidas de *A. australe*.

Rf	F1		F2		F3		F4		F5		F6	
	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm	UV 254 nm	UV 365 nm
0,5							X		X			
0,25			X									
0,16			X									
0,08					X							

Tabla 20: Fracciones obtenidas de *A. australe* en sistema 2 con las 6 fracciones.

En esta experiencia se han comparado las 6 Fracciones separadas de *A. australe* en el sistema 1 y 2. Se logran observar varios componentes presentes en la fracción 2, con diversos Rf en UV 254nm, como en UV 365nm.

4.4.4.- Cromatografía en capa delgada de las fracciones reveladas con NP/PEG.

Se revelaron con NP/PEG las fracciones obtenidas para los extractos de ambas especies, utilizando fases móviles polares y no polares.

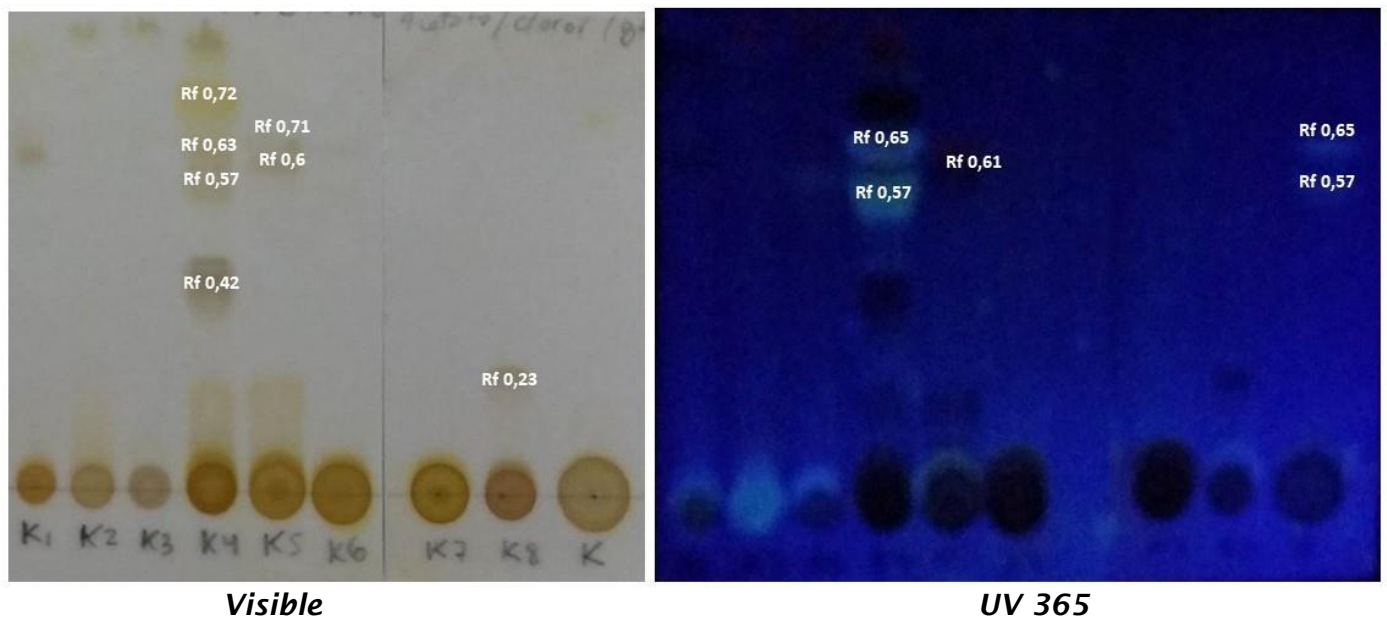


Figura 30: TLC en Sistema 1 (10 acetato de etilo / 1 ácido acético / 1 agua), de las ocho fracciones obtenidas de *P. hydropiperoides*, reveladas con NP/PEG.

Rf	F1		F2		F3		F4		F5		F6		F7		F8	
	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm
0,72							X									
0,71									X							
0,65								X								
0,63							X									
0,61									X							
0,6									X							
0,57							X	X								
0,42							X									
0,23															X	X

Tabla 21: Fracciones obtenidas en sistema 1, de las ocho fracciones obtenidas de *P. hydropiperoides*, reveladas con NP/PEG.

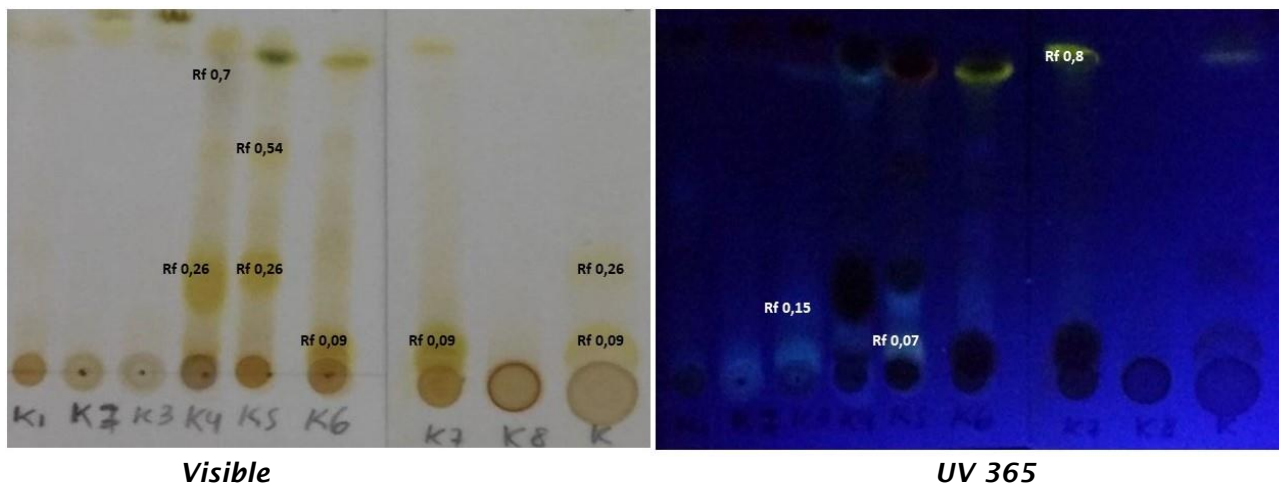


Figura 31: TLC en sistema 2, de las ocho fracciones obtenidas de *P. hydropiperoides*, reveladas con NP/PEG.

Rf	F1		F2		F3		F4		F5		F6		F7		F8		
	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	
0,8																	X
0,7							X										
0,54									X								
0,26							X		X								
0,15						X											
0,09											X		X				
0,07										X							

Tabla 22: Fracciones obtenidas en sistema 2, de las ocho fracciones obtenidas de *P. hydropiperoides*, reveladas con NP/PEG.

La coloración amarilla de la sustancia de Rf 0,8 presente en la fracción 7 observada a 365nm, es la reacción positiva a la presencia de flavonoides.

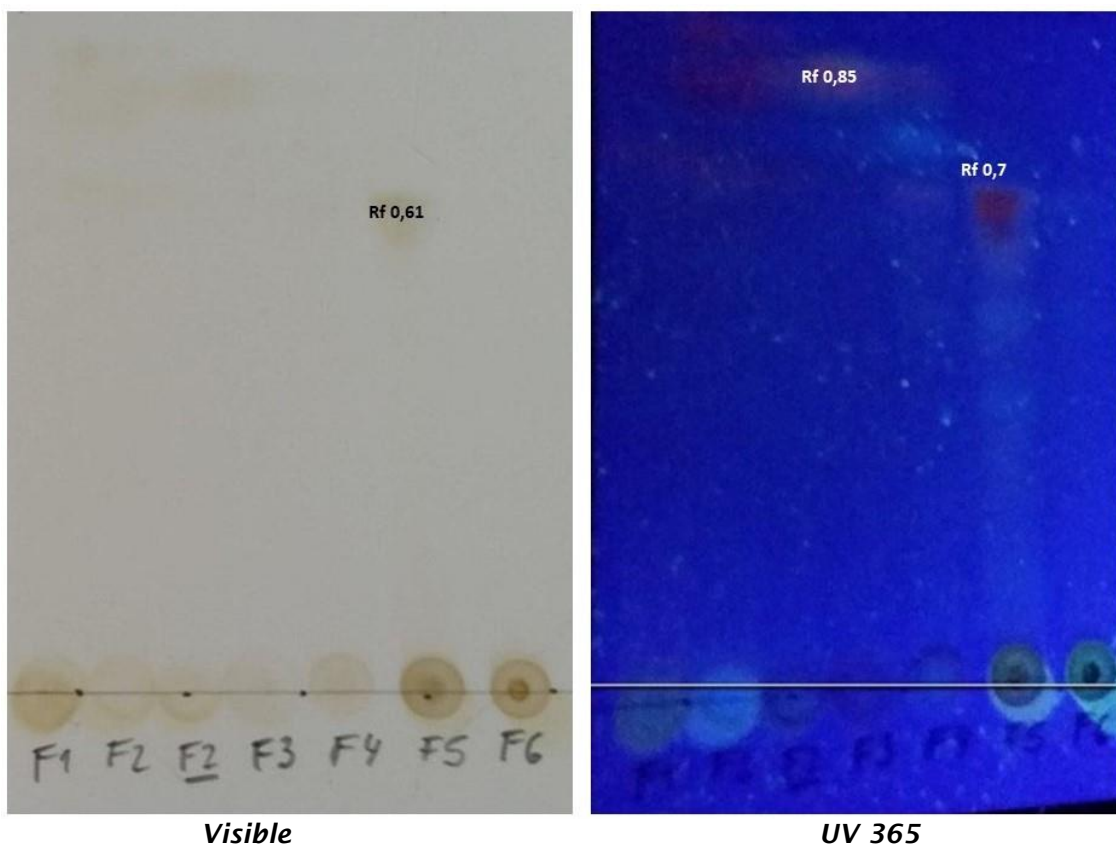


Figura 32: TLC en Sistema 1 (10 acetato de etilo / 1 ácido acético / 1 agua), de las seis fracciones obtenidas de *A. australe*, reveladas con NP/PEG.

Rf	F1		F2		F3		F4		F5		F6	
	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm	vis	UV 365 nm
0,85						X						
0,7										X		
0,61										X		

Tabla 23: Fracciones obtenidas en sistema 1, de las seis fracciones obtenidas de *A. australe*, reveladas con NP/PEG.

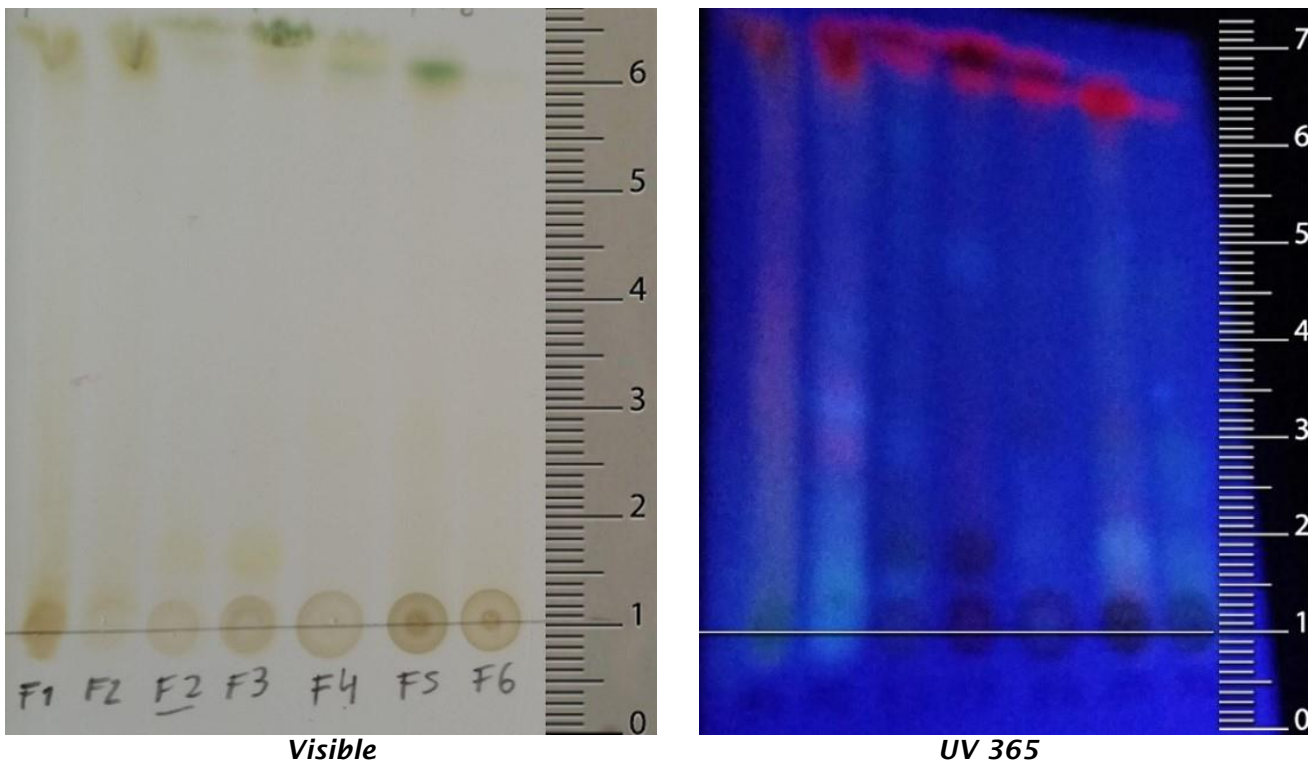


Figura 33: TLC en Sistema 2 (3 acetato de etilo / 1 cloroformo / 4 gotas de ácido acético), de las seis fracciones obtenidas de *A. australe*, reveladas con NP/PEG.

No se observan claros resultados para esta experiencia.

4.5.- Estudios biológicos.

Los estudios biológicos fueron llevados a cabo para los extractos crudos de ambas especies en simultáneo, y de sus fracciones. Como los extractos crudos se solubilizan en DMSO, se utiliza este como control al 0,5 %. Las fracciones se encontraban disueltas en metanol, por lo que el control para estos estudios fue metanol al 0,5 %.

4.5.1.- Efectos del extracto crudo de *P. hydropiperoides* sobre MCF-7.

Fueron probadas una serie de concentraciones de extracto de *P. hydropiperoides* desde 25µg/ml a 500µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

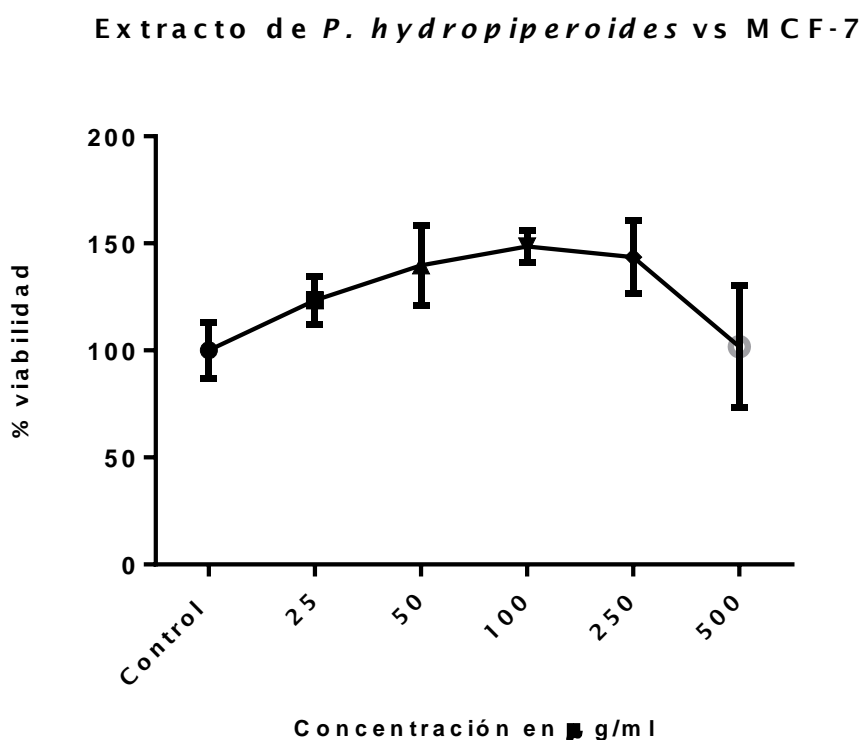


GRAFICO 4: Curva representando promedios y desvío standard de la Viabilidad media de MCF-7 en función de la concentración del extracto de *P. hydropiperoides* en dosis de 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml y 500 µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

Tabla ANOVA para % viabilidad por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14337,5	5	2867,51	10,34	0,0000
Intra grupos	8040,23	29	277,249		
Total (Corr.)	22377,8	34			

Pruebas de Múltiple Rangos para Viabilidad por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	10	100,0	X
500	5	101,721	X
25	5	123,309	X
50	5	139,793	XX
250	5	143,567	XX
100	5	148,573	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 25	*	-23,3086	18,6526
0 - 50	*	-39,7927	18,6526
0 - 100	*	-48,5725	18,6526
0 - 250	*	-43,5667	18,6526
0 - 500		-1,72077	18,6526
25 - 50		-16,4842	21,5381
25 - 100	*	-25,264	21,5381
25 - 250		-20,2581	21,5381
25 - 500	*	21,5878	21,5381
50 - 100		-8,77982	21,5381
50 - 250		-3,77395	21,5381
50 - 500	*	38,072	21,5381
100 - 250		5,00587	21,5381
100 - 500	*	46,8518	21,5381
250 - 500	*	41,8459	21,5381

* indica una diferencia significativa.

El análisis de la varianza muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre la media del porcentaje de viabilidad entre un nivel de concentración y otro, con un nivel del 95,0% ($p < 0,05$).

La prueba de múltiples rangos (LSD) muestra la mayor actividad observada en 100 $\mu\text{g/ml}$, además conforma grupos homogéneos con 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ y 250 $\mu\text{g/ml}$, y con menor actividad las dosis más elevadas 200 $\mu\text{g/ml}$ y 250 $\mu\text{g/ml}$.

Utilizando como base el modelo de regresión lineal, se realiza la comparación de modelos alternos, para encontrar el modelo adecuado

para describir la relación que existe entre la viabilidad de MCF-7 y la concentración del extracto de *P. hydropiperoides*.

Regresión Simple - viabilidad vs. concentración

Variable dependiente: viabilidad

Variable independiente: concentración

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Inversa-Y Cuadrado-X	0,3010	9,06%
Log-Y Cuadrado-X	-0,2654	7,05%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	-0,2490	6,20%
Cuadrado de X	-0,2340	5,48%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	0,2226	4,96%
Cuadrado Doble	-0,2087	4,36%
Raíz Cuadrada de X	0,1929	3,72%
Raíz Cuadrada Doble	0,1728	2,99%
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	0,1491	2,22%
Inversa de Y	0,1375	1,89%
Exponencial	-0,0904	0,82%
Raíz Cuadrada de Y	-0,0699	0,49%
Lineal	-0,0517	0,27%
Cuadrado de Y	-0,0224	0,05%

Esta tabla muestra los resultados de ajustar varios modelos curvilíneos a los datos. De los modelos ajustados, el modelo Y-inversa X-cuadrada es el que arroja el valor más alto de R-Cuadrada con 9,05754%. Este es 8,79032% mayor que el modelo lineal seleccionado.

Regresión Simple - Viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: Viabilidad

Variable independiente: Concentración

Inversa-Y Cuadrado-X: $Y = 1/(a + b \cdot X^2)$

Coefficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0,00824261	0,00039036	21,1154	0,0000
Pendiente	7,26005E-9	4,00462E-9	1,81292	0,0789

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,000013537	1	0,000013537	3,29	0,0789
Residuo	0,000135918	33	0,00000411873		
Total (Corr.)	0,000149455	34			

Coefficiente de Correlación = 0,300958

R-cuadrada = 9,05754 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 6,30171 por ciento

Error estándar del est. = 0,00202947

Error absoluto medio = 0,00159785

Estadístico Durbin-Watson = 0,992545 (P=0,0003)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,498757

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo Y-inversa X-cuadrada para describir la relación entre Viabilidad y Concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Viabilidad} = 1/(0,00824261 + 7,26005E-9*\text{Concentración}^2)$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es mayor o igual a 0,05, no hay una relación estadísticamente significativa entre viabilidad y concentración con un nivel de confianza del 95,0% ó más.

La viabilidad de MCF7 no se ve afectada en forma significativa por la presencia del extracto de *P. hydroperoides* con un nivel del 95% en dosis comprendidas entre 50µg/ml y 500µg/ml.

4.5.2.- Efectos del extracto crudo de *P. hydroperoides* sobre MG-63.

Fueron probadas una serie de concentraciones de extracto de *P. hydroperoides* desde 50µg/ml a 250µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

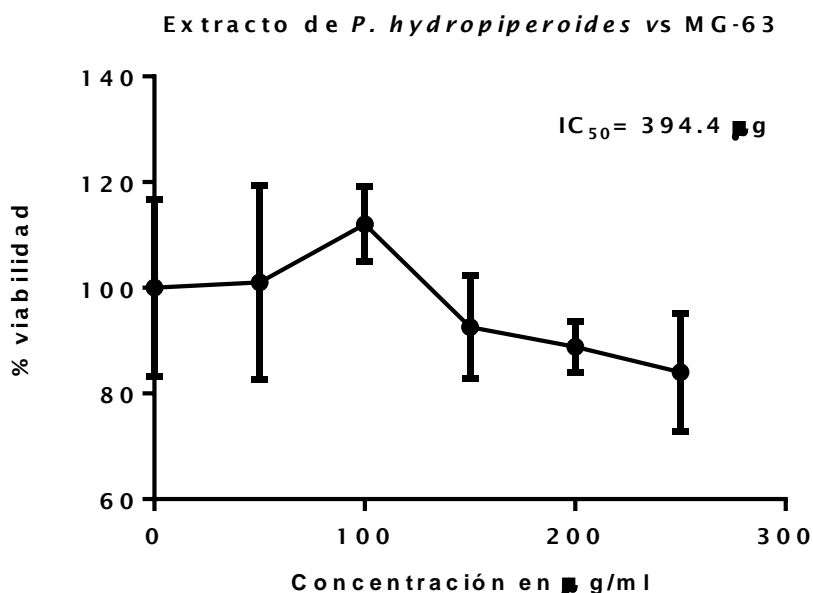


GRAFICO 5: Curva representando promedios y desvío standard de la Viabilidad media de MG-63 en función de la concentración de extracto de *P. hydroperoides* en dosis de 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml y 250 µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

Tabla ANOVA para % Viabilidad por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2554,62	5	510,924	2,95	0,0283
Intra grupos	5015,52	29	172,949		
Total (Corr.)	7570,14	34			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % Viabilidad entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para % Viabilidad por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
250	5	84,003	X
200	5	88,8141	XX
150	5	92,6328	XX
0	10	100,0	XX
50	5	101,236	XX
100	5	111,833	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 50		-1,23599	14,732
0 - 100		-11,8327	14,732
0 - 150		7,36721	14,732
0 - 200		11,1859	14,732
0 - 250	*	15,997	14,732
50 - 100		-10,5967	17,0111
50 - 150		8,6032	17,0111
50 - 200		12,4219	17,0111
50 - 250	*	17,233	17,0111
100 - 150	*	19,1999	17,0111
100 - 200	*	23,0187	17,0111
100 - 250	*	27,8297	17,0111
150 - 200		3,81872	17,0111
150 - 250		8,62978	17,0111
200 - 250		4,81106	17,0111

* indica una diferencia significativa.

Utilizando como base el modelo de regresión lineal, se realiza la comparación de modelos alternos, para encontrar el modelo adecuado para describir la relación que existe entre la viabilidad de MG-63 y la concentración del extracto de *P. hydropiperoides*.

Regresión Simple - % Viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: % Viabilidad

Variable independiente: Concentración

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Cuadrado Doble	-0,4753	22,59%
Cuadrado de X	-0,4702	22,11%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	-0,4665	21,76%

Log-Y Cuadrado-X	-0,4621	21,35%
Inversa-Y Cuadrado-X	0,4511	20,35%
Cuadrado de Y	-0,4173	17,42%
Lineal	-0,4080	16,65%
Raíz Cuadrada de Y	-0,4022	16,17%
Exponencial	-0,3956	15,65%
Inversa de Y	0,3805	14,48%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	-0,3243	10,52%
Raíz Cuadrada de X	-0,3139	9,85%
Raíz Cuadrada Doble	-0,3077	9,47%
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	-0,3009	9,05%
Inversa-Y Raíz Cuadrada-X	0,2856	8,16%

Esta tabla muestra los resultados de ajustar varios modelos curvilíneos a los datos. De los modelos ajustados, el modelo doble cuadrado es el que arroja el valor más alto de R-Cuadrada con 22,593%. Este es 5,9475% mayor que el modelo lineal seleccionado.

Regresión Simple - Viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: Viabilidad

Variable independiente: Concentración

Cuadrado Doble: $Y = \sqrt{a + b \cdot X^2}$

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	10828,0	589,747	18,3604	0,0000
Pendiente	-0,0619067	0,0199473	-3,10352	0,0039

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	6,54936E7	1	6,54936E7	9,63	0,0039
Residuo	2,24391E8	33	6,79972E6		
Total (Corr.)	2,89884E8	34			

Coefficiente de Correlación = -0,475321

R-cuadrada = 22,593 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 20,2474 por ciento

Error estándar del est. = 2607,63

Error absoluto medio = 2075,08

Estadístico Durbin-Watson = 0,974694 (P=0,0002)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,476892

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo doble cuadrado para describir la relación entre Viabilidad y Concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Viabilidad} = \sqrt{10828 - 0,0619067 \cdot \text{Concentración}^2}$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre Viabilidad y Concentración con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 22,593% de la variabilidad en Viabilidad. El coeficiente de correlación es igual a -

0,475321, indicando una relación relativamente débil entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 2607,63.

El error absoluto medio (MAE) de 2075,08 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0%.

Como puede observarse en el gráfico 5, la viabilidad de MG-63 se ve afectada levemente por la presencia del extracto de *P. hydropiperoides* ya que existe una correlación entre la viabilidad de MG-63 y la concentración de extracto, con un nivel de confianza del 95%. Pero esta correlación es poco significativa debido al Coeficiente de Correlación = - 0,475321 y además el valor alto de IC₅₀ calculado (394.4µg).

4.5.3.- Efectos del extracto de *P. hydropiperoides* sobre MDA-231.

Fueron probadas una serie de concentraciones de extracto de *P. hydropiperoides* desde 50µg/ml a 250µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

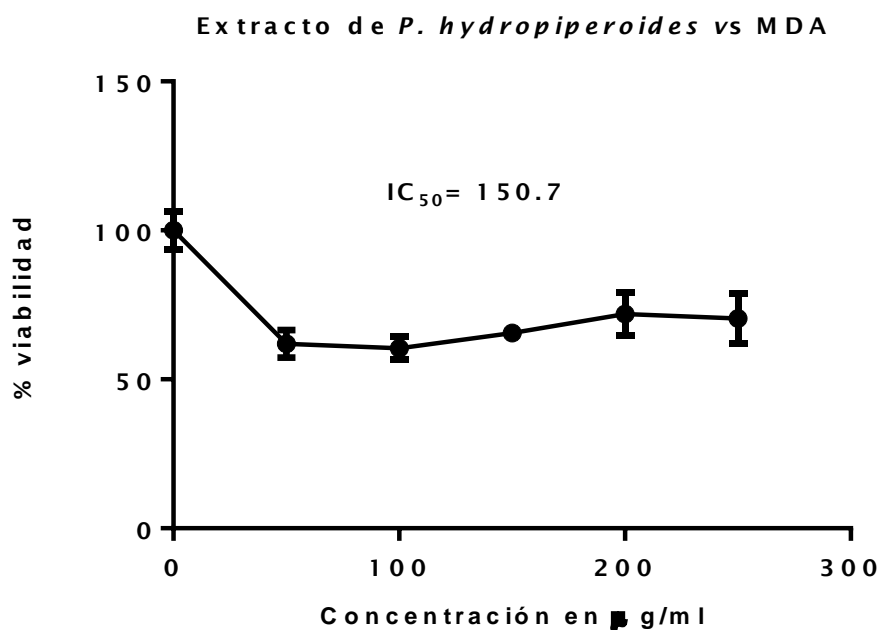


Gráfico 6: Curva representando promedios y desvío standard de la Viabilidad media de MDA en función de la concentración del extracto de *P. hydropiperoides* en dosis de 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml y 250 µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

Como puede observarse en el gráfico 6, la viabilidad de MDA se ve afectada en forma leve por la presencia del extracto de *P. hydropiperoides*. Aunque el valor calculado de IC_{50} es una dosis elevada, y el comportamiento de la viabilidad de MDA no parece verse afectado con el aumento de la dosis.

Tabla ANOVA para % viabilidad por concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8746,83	5	1749,37	50,00	0,0000
Intra grupos	1014,66	29	34,9882		
Total (Corr.)	9761,49	34			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % viabilidad entre un nivel de concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para % viabilidad por concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100	5	60,422	X
50	5	61,9098	X
150	5	65,5534	XX
250	5	70,4418	X
200	5	71,9296	X
0	10	100,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 50	*	38,0902	6,62619
0 - 100	*	39,578	6,62619
0 - 150	*	34,4466	6,62619
0 - 200	*	28,0704	6,62619
0 - 250	*	29,5582	6,62619
50 - 100		1,48778	7,65127
50 - 150		-3,64354	7,65127
50 - 200	*	-10,0197	7,65127
50 - 250	*	-8,53196	7,65127
100 - 150		-5,13132	7,65127
100 - 200	*	-11,5075	7,65127
100 - 250	*	-10,0197	7,65127
150 - 200		-6,3762	7,65127
150 - 250		-4,88842	7,65127
200 - 250		1,48778	7,65127

* indica una diferencia significativa.

La prueba LSD, muestra la mayor actividad observada en las dosis 50 µg/ml, 100 µg/ml y 150 µg/ml (grupos homogéneos), y con menor actividad las dosis más elevadas 200 µg/ml y 250 µg/ml.

Utilizando como base el modelo de regresión lineal, se realiza la comparación de modelos alternos, para encontrar el modelo adecuado para describir la relación que existe entre la viabilidad de MDA y la concentración del extracto de *P. hydropiperoides*.

Regresión Simple - % viabilidad vs. concentración

Variable dependiente: % viabilidad

Variable independiente: concentración

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	-0,7620	58,06%
Raíz Cuadrada de X	-0,7386	54,55%
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	-0,7067	49,94%
Inversa-Y Raíz Cuadrada-X	0,6675	44,56%
Cuadrado de Y	-0,5835	34,05%
Lineal	-0,5535	30,64%
Raíz Cuadrada de Y	-0,5356	28,68%
Exponencial	-0,5159	26,61%
Inversa de Y	0,4721	22,29%
Cuadrado Doble	-0,3825	14,63%

Cuadrado de X	-0,3492	12,19%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	-0,3302	10,90%
Log-Y Cuadrado-X	-0,3099	9,60%
Inversa-Y Cuadrado-X	0,2661	7,08%

Esta tabla muestra los resultados de ajustar varios modelos curvilíneos a los datos. De los modelos ajustados, el modelo Y-cuadrada raíz cuadrada-X es el que arroja el valor más alto de R-Cuadrada con 58,0593%. Este es 27,4233% mayor que el modelo lineal seleccionado.

Regresión Simple - Viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: Viabilidad

Variable independiente: Concentración

Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X: $Y = \sqrt{a + b \cdot \sqrt{X}}$

Coefficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	8986,85	537,124	16,7314	0,0000
Pendiente	-350,726	51,8911	-6,75888	0,0000

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,52603E8	1	1,52603E8	45,68	0,0000
Residuo	1,10237E8	33	3,34052E6		
Total (Corr.)	2,62841E8	34			

Coefficiente de Correlación = -0,761967

R-cuadrada = 58,0593 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 56,7884 por ciento

Error estándar del est. = 1827,71

Error absoluto medio = 1477,85

Estadístico Durbin-Watson = 0,605782 (P=0,0000)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,694189

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo Y-cuadrada raíz cuadrada-X para describir la relación entre Viabilidad y Concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Viabilidad} = \sqrt{8986,85 - 350,726 \cdot \sqrt{\text{Concentración}}}$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre Viabilidad y Concentración con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 58,0593% de la variabilidad en Viabilidad después de transformar a una escala logarítmica para linearizar el modelo. El coeficiente de correlación es igual a -0,761967, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 1827,71.

El error absoluto medio (MAE) de 1477,85 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0%.

Debido a que no se han observado resultados positivos en estas experiencias, podemos concluir que el extracto 20% agua y 80% alcohol de *Polygonum hydropiperoides*, no tiene efectos significativos sobre la viabilidad de las células tumorales de MCF7, MG63 y MDA.

4.5.4.- Efectos del extracto de *A. australe* sobre MCF-7.

Fueron probadas una serie de concentraciones de extracto de *A. australe* desde 25µg/ml a 500µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

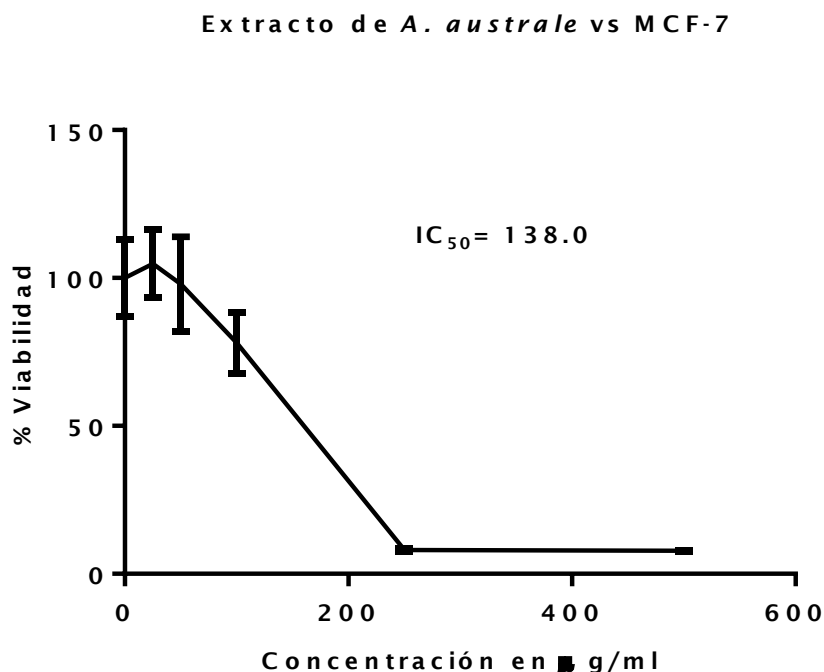


GRÁFICO 7: Curva representando promedios y desvío standard de la Viabilidad media de MCF-7 en función de la concentración del extracto de *A. australe* en dosis de 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, y 500 µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

Como puede observarse en el gráfico 7, la viabilidad de MCF-7 se ve afectada por la presencia del extracto de *A. australe*. Se ha obtenido un valor de $IC_{50} = 138,0 \mu\text{g}$ para el extracto.

Tabla ANOVA para % viabilidad por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	49401,7	5	9880,34	76,17	0,0000
Intra grupos	3502,22	27	129,712		
Total (Corr.)	52903,9	32			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % viabilidad entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para % viabilidad por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
500	4	7,77278	X
250	4	8,04165	X
100	5	78,0016	X
50	5	97,9859	X
0	10	100,0	X
25	5	104,849	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 25		-4,84943	12,7995
0 - 50		2,01408	12,7995
0 - 100	*	21,9984	12,7995
0 - 250	*	91,9583	13,825
0 - 500	*	92,2272	13,825
25 - 50		6,86351	14,7796
25 - 100	*	26,8479	14,7796
25 - 250	*	96,8078	15,6761
25 - 500	*	97,0767	15,6761
50 - 100	*	19,9844	14,7796
50 - 250	*	89,9443	15,6761
50 - 500	*	90,2131	15,6761
100 - 250	*	69,9599	15,6761
100 - 500	*	70,2288	15,6761
250 - 500		0,26887	16,5241

* indica una diferencia significativa.

La prueba LSD, muestra la mayor actividad observada en las dosis 500 y 250 $\mu\text{g/ml}$ (grupos homogéneos), y con menor actividad las dosis más bajas 25 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$. Comenzando un marcado descenso de la viabilidad desde la dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Utilizando como base el modelo de regresión lineal, se realiza la comparación de modelos alternos, para encontrar el modelo adecuado para describir la relación que existe entre la viabilidad de MCF-7 y la concentración del extracto de *A. australe*.

Regresión Simple - % viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: % viabilidad
Variable independiente: Concentración
Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Inversa de Y	0,9125	83,26%
Exponencial	-0,9121	83,19%
Raíz Cuadrada de Y	-0,9057	82,04%
Lineal	-0,8883	78,91%
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	-0,8780	77,08%
Raíz Cuadrada de X	-0,8741	76,41%
Inversa-Y Cuadrado-X	0,8295	68,80%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	-0,8250	68,06%
Cuadrado de Y	-0,8197	67,18%
Log-Y Cuadrado-X	-0,8187	67,02%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	-0,8055	64,88%
Cuadrado de X	-0,7819	61,13%
Cuadrado Doble	-0,7067	49,94%

Esta tabla muestra los resultados de ajustar varios modelos curvilíneos a los datos. De los modelos ajustados, el modelo inverso de Y es el que arroja el valor más alto de R-Cuadrada con 83,2575%. Este es 4,3459% mayor que el modelo lineal seleccionado.

Regresión Simple - Viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: Viabilidad
Variable independiente: Concentración
Inversa de Y: $Y = 1/(a + b \cdot X)$

Coefficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0,00577119	0,00452089	1,27656	0,2112
Pendiente	0,000281124	0,000022642	12,416	0,0000

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,0680142	1	0,0680142	154,16	0,0000
Residuo	0,0136771	31	0,000441198		
Total (Corr.)	0,0816914	32			

Coefficiente de Correlación = 0,912456
R-cuadrada = 83,2575 por ciento
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 82,7175 por ciento
Error estándar del est. = 0,0210047
Error absoluto medio = 0,0144118
Estadístico Durbin-Watson = 0,696715 (P=0,0000)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,640962

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo inversa de Y para describir la relación entre Viabilidad y Concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Viabilidad} = 1/(0,00577119 + 0,000281124 * \text{Concentración})$$

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 83,2575% de la variabilidad en Viabilidad. El coeficiente de correlación es igual a 0,912456, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,0210047.

El error absoluto medio (MAE) de 0,0144118 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0%.

Como puede observarse en el gráfico 7, la viabilidad de MCF-7 se ve afectada por la presencia del extracto de *A. australe* ya que existe una correlación entre la viabilidad de MCF-7 y la concentración de extracto, con un nivel de confianza del 95%. La correlación moderadamente fuerte entre las variables, con un Coeficiente de Correlación = 0,912456. Si bien es una actividad que podría considerarse moderada, dado que el IC₅₀ es alto (138 µg).

4.5.5.- Efectos del extracto de *A. australe* sobre MG-63.

Fueron probadas una serie de concentraciones de extracto de *A. australe* desde 5µg/ml a 100µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

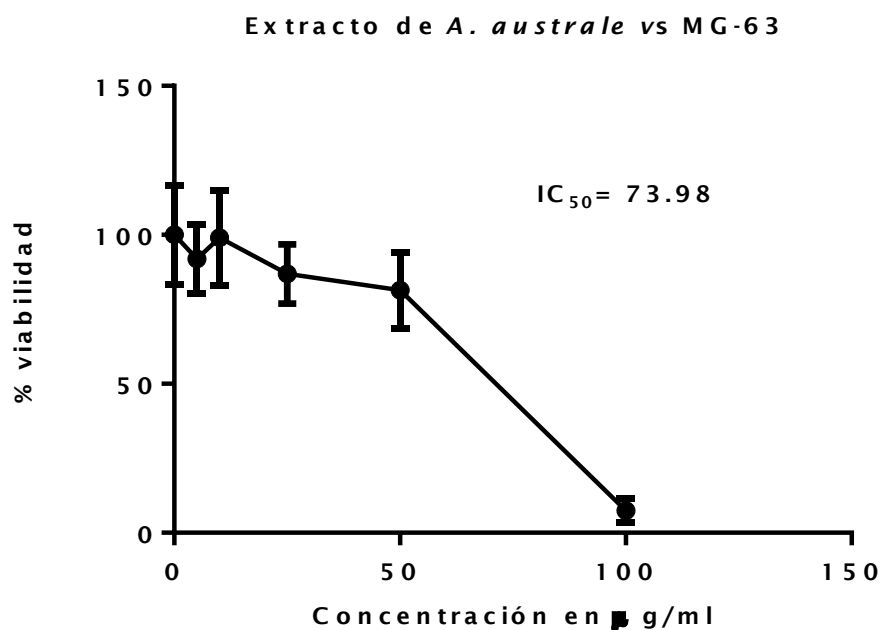


GRÁFICO 8: Curva representando promedios y desvío standard de la Viabilidad media de MG-63 en función de la concentración del extracto de *A. australe* en dosis de 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

Como puede observarse en el gráfico 8, la viabilidad de MG-63 se ve afectada por la presencia del extracto de *A. australe*.

Se ha obtenido un valor de $IC_{50} = 73,98 \mu\text{g}$ para el extracto, frente a MG-63. Lo cual muestra que existe actividad para esta línea, a una dosis incluso menor que la necesaria para MCF-7.

Tabla ANOVA para % viabilidad por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	21552,2	5	4310,44	22,41	0,0000
Intra grupos	5001,33	26	192,359		
Total (Corr.)	26553,5	31			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % viabilidad entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para % viabilidad por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100	3	7,48682	X
50	4	81,3583	X
25	5	86,9357	XX
5	5	91,9328	XX
10	5	98,9589	XX
0	10	100,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 5		8,06716	15,615
0 - 10		1,04107	15,615
0 - 25		13,0643	15,615
0 - 50	*	18,6417	16,8661
0 - 100	*	92,5132	18,7669
5 - 10		-7,02609	18,0306
5 - 25		4,99712	18,0306
5 - 50		10,5746	19,1244
5 - 100	*	84,446	20,82
10 - 25		12,0232	18,0306
10 - 50		17,6007	19,1244
10 - 100	*	91,4721	20,82
25 - 50		5,57746	19,1244
25 - 100	*	79,4489	20,82
50 - 100	*	73,8714	21,774

* indica una diferencia significativa.

La prueba LSD, muestra un nivel de actividad similar en todas las dosis (grupos homogéneos) excepto la dosis de 100 µg/ml que resulto la más activa.

Utilizando como base el modelo de regresión lineal, se realiza la comparación de modelos alternos, para encontrar el modelo adecuado para describir la relación que existe entre la viabilidad de MG-63 y la concentración del extracto de *A. australe*.

Regresión Simple - % viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: % viabilidad

Variable independiente: Concentración

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Log-Y Cuadrado-X	-0,9517	90,57%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	-0,9379	87,96%
Inversa-Y Cuadrado-X	0,9002	81,04%
Cuadrado de X	-0,8902	79,25%
Raíz Cuadrada de Y	-0,8673	75,22%
Exponencial	-0,8605	74,04%
Lineal	-0,8458	71,54%
Cuadrado de Y	-0,7498	56,22%

Cuadrado Doble	-0,7461	55,67%
Raíz Cuadrada de X	-0,7343	53,92%
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	-0,7057	49,80%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	-0,6918	47,86%

Esta tabla muestra los resultados de ajustar varios modelos curvilíneos a los datos. De los modelos ajustados, el modelo log-Y X-cuadrada es el que arroja el valor más alto de R-Cuadrada con 90,5652%. Este es 19,03% mayor que el modelo lineal seleccionado.

Regresión Simple - Viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: Viabilidad

Variable independiente: Concentración

Logarítmico-Y Cuadrado-X: $Y = \exp(a + b \cdot X^2)$

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	4,63497	0,0485244	95,5182	0,0000
Pendiente	-0,000257591	0,0000151795	-16,9697	0,0000

NOTA: intercepto = $\ln(a)$

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	17,7291	1	17,7291	287,97	0,0000
Residuo	1,84697	30	0,0615655		
Total (Corr.)	19,576	31			

Coefficiente de Correlación = -0,951657

R-cuadrada = 90,5652 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 90,2507 por ciento

Error estándar del est. = 0,248124

Error absoluto medio = 0,178445

Estadístico Durbin-Watson = 1,19851 (P=0,0051)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,366423

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo log-Y X-cuadrada para describir la relación entre Viabilidad y Concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Viabilidad} = \exp(4,63497 - 0,000257591 \cdot \text{Concentración}^2)$$

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 90,5652% de la variabilidad en Viabilidad. El coeficiente de correlación es igual a -0,951657, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,248124.

El error absoluto medio (MAE) de 0,178445 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el

valor-P es menor que 0,05, hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0%.

Como puede observarse en el gráfico 8, la viabilidad de MG-63 se ve afectada por la presencia del extracto de *A. australe* ya que existe una correlación moderadamente fuerte entre la viabilidad y la concentración del extracto, con un Coeficiente de Correlación = -0,951657 y un nivel de confianza del 95%. El IC₅₀ es 73,98 µg, por lo que el extracto presenta actividad.

4.5.6.- Efectos del extracto de *A. australe* sobre MDA-231.

Fueron probadas una serie de concentraciones de extracto de *A. australe* desde 5µg/ml a 100µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

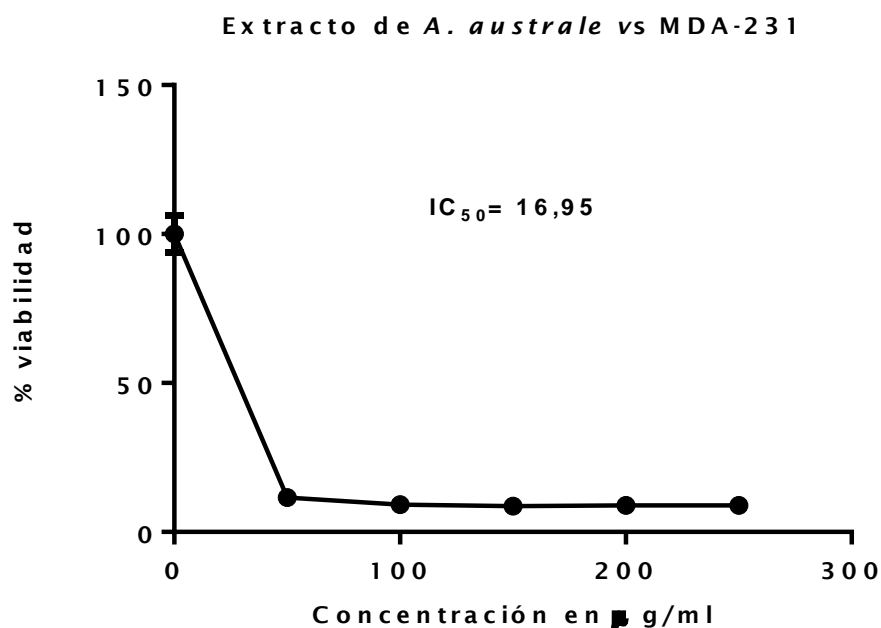


GRÁFICO 9: Curva representando promedios y desvío standard de la Viabilidad media de MDA en función de la concentración del extracto de *A. australe* en dosis de 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml y 250 µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

Como puede observarse en el gráfico 9, la viabilidad de MDA se ve afectada por la presencia del extracto de *A. australe*.

Se ha obtenido un valor de $IC_{50} = 16,95 \mu\text{g}$ para el extracto, frente a MDA. Lo cual muestra que existe una marcada actividad del extracto frente a esta línea, siendo más pronunciada que la observada incluso en MCF-7 y MG-63.

Tabla ANOVA para % viabilidad por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	47534,2	5	9506,83	467,94	0,0000
Intra grupos	365,696	18	20,3164		
Total (Corr.)	47899,8	23			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % viabilidad entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para % viabilidad por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
150	2	8,72932	X
200	3	8,90643	X
250	1	8,95704	X
100	4	9,22271	X
50	4	11,6138	X
0	10	100,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 50	*	88,3862	5,60233
0 - 100	*	90,7773	5,60233
0 - 150	*	91,2707	7,33517
0 - 200	*	91,0936	6,2337
0 - 250	*	91,043	9,93187
50 - 100		2,39107	6,69606
50 - 150		2,88447	8,20097
50 - 200		2,70735	7,23258
50 - 250		2,65675	10,5874
100 - 150		0,493396	8,20097
100 - 200		0,31628	7,23258
100 - 250		0,265675	10,5874
150 - 200		-0,177117	8,64458
150 - 250		-0,227721	11,5979
200 - 250		-0,0506047	10,9346

* indica una diferencia significativa.

La prueba LSD, muestra un nivel de actividad similar en todas las dosis (grupos homogéneos).

Utilizando como base el modelo de regresión lineal, se realiza la comparación de modelos alternos, para encontrar el modelo adecuado para describir la relación que existe entre la viabilidad de MDA y la concentración del extracto de *A. australe*.

Regresión Simple - % Viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: % Viabilidad

Variable independiente: Concentración

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Inversa-Y Raíz Cuadrada-X	0,9643	92,98%
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	-0,9430	88,92%
Raíz Cuadrada de X	-0,9242	85,42%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	-0,9108	82,96%
Inversa de Y	0,8557	73,22%
Exponencial	-0,8145	66,35%
Lineal	-0,7866	61,88%
Cuadrado de Y	-0,7717	59,56%
Inversa-Y Cuadrado-X	0,6635	44,02%
Log-Y Cuadrado-X	-0,6140	37,70%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	-0,5958	35,49%
Cuadrado de X	-0,5835	34,04%
Cuadrado Doble	-0,5696	32,44%

Esta tabla muestra los resultados de ajustar varios modelos curvilíneos a los datos. De los modelos ajustados, el modelo Y-inversa raíz cuadrada-X es el que arroja el valor más alto de R-Cuadrada con 92,9797%. Este es 31,1016% mayor que el modelo lineal seleccionado.

Regresión Simple - Viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: Viabilidad

Variable independiente: Concentración

Inversa-Y Raíz Cuadrada-X: $Y = 1/(a + b \cdot \sqrt{X})$

Coefficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0,0151876	0,00395652	3,83863	0,0009
Pendiente	0,00790914	0,00046334	17,0698	0,0000

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,0500276	1	0,0500276	291,38	0,0000
Residuo	0,00377724	22	0,000171693		
Total (Corr.)	0,0538048	23			

Coefficiente de Correlación = 0,96426

R-cuadrada = 92,9797 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 92,6606 por ciento

Error estándar del est. = 0,0131032
Error absoluto medio = 0,0103166
Estadístico Durbin-Watson = 0,525766 (P=0,0000)
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,625477

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo Y-inversa raíz cuadrada-X para describir la relación entre Viabilidad y Concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Viabilidad} = 1/(0,0151876 + 0,00790914*\text{sqrt}(\text{Concentración}))$$

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 92,9797% de la variabilidad en Viabilidad después de transformar a una escala de raíz cuadrada para linearizar el modelo. El coeficiente de correlación es igual a 0,96426, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,0131032.

El error absoluto medio (MAE) de 0,0103166 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0%.

La línea MDA resulto ser la línea más sensible al extracto crudo de *A. australe*, mientras que el extracto de *P. hydropiperoides* no demostró una importante actividad en ni una de las líneas celulares probadas.

Dado que las actividades resultaron ser pronunciadas, pero similares en todas las concentraciones probadas, se decidió repetir el ensayo utilizando dosis menores.

Extracto de *A. australe* vs MDA-231

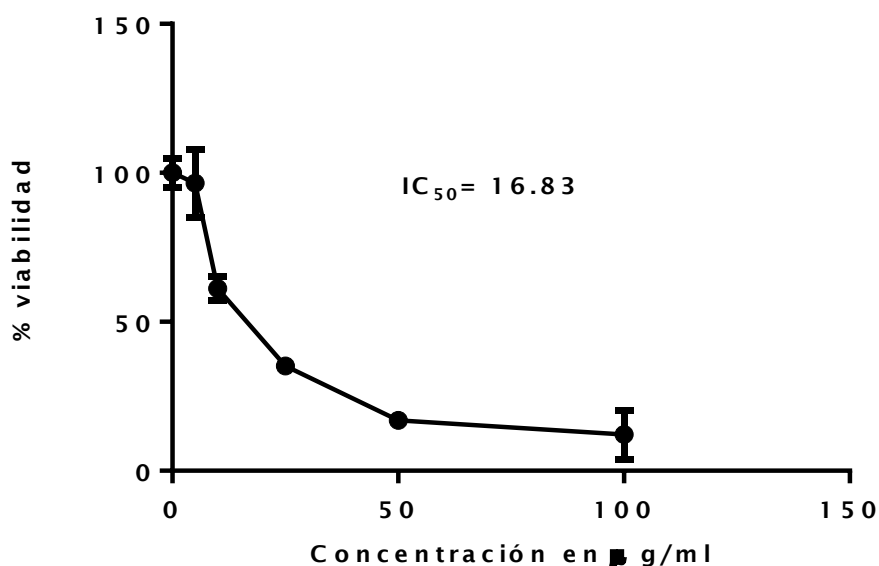


GRÁFICO 10: Curva representando promedios y desvío standard de la Viabilidad media de MDA en función de la concentración del extracto de *A. australe* en dosis de 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml. Utilizando como control el DMSO al 0,5 %.

En el gráfico 10 puede observarse la actividad del extracto, obteniéndose un IC_{50} cercano al de la experiencia anterior (16,83 µg/ml)

Tabla ANOVA para % viabilidad por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	52300,6	5	10460,1	125,34	0,0000
Intra grupos	3254,77	39	83,4557		
Total (Corr.)	55555,4	44			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % viabilidad entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para % viabilidad por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100	7	12,3224	X
50	7	14,5133	X
25	7	33,9404	X
5	6	73,1678	X
10	8	73,5497	X
0	10	100,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-----------	------	------------	-------------

0 - 5	*	26,8322	9,54207
0 - 10	*	26,4503	8,76495
0 - 25	*	66,0596	9,10613
0 - 50	*	85,4867	9,10613
0 - 100	*	87,6776	9,10613
5 - 10		-0,381889	9,97934
5 - 25	*	39,2274	10,2803
5 - 50	*	58,6545	10,2803
5 - 100	*	60,8454	10,2803
10 - 25	*	39,6093	9,56335
10 - 50	*	59,0364	9,56335
10 - 100	*	61,2273	9,56335
25 - 50	*	19,4271	9,87698
25 - 100	*	21,618	9,87698
50 - 100		2,1909	9,87698

* indica una diferencia significativa.

La prueba LSD, muestra diferencias entre los niveles de actividad conformando cuatro grupos (grupos homogéneos). Las dosis de 100 µg/ml y 50 µg/ml fueron las más activas, seguidas por 25 µg/ml. Mientras que 5 µg/ml y 10 µg/ml demostraron similar actividad, comparadas con el control.

Utilizando como base el modelo de regresión lineal, se realiza la comparación de modelos alternos, para encontrar el modelo adecuado para describir la relación que existe entre la viabilidad de MDA y la concentración del extracto de *A. australe*.

Regresión Simple - % viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: % viabilidad

Variable independiente: Concentración

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	-0,9451	89,32%
Raíz Cuadrada de X	-0,9285	86,22%
Exponencial	-0,9049	81,89%
Inversa de Y	0,9046	81,83%
Raíz Cuadrada de Y	-0,8736	76,33%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	-0,8666	75,10%
Lineal	-0,8284	68,62%
Inversa-Y Cuadrado-X	0,8224	67,64%
Log-Y Cuadrado-X	-0,7762	60,25%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	-0,7273	52,90%
Cuadrado de Y	-0,7271	52,87%
Cuadrado de X	-0,6707	44,99%
Cuadrado Doble	-0,5632	31,72%

Esta tabla muestra los resultados de ajustar varios modelos curvilíneos a los datos. De los modelos ajustados, el modelo log-Y raíz cuadrada-X es el que arroja el valor más alto de R-Cuadrada con 89,3202%.

Regresión Simple - Viabilidad vs. Concentración

Variable dependiente: Viabilidad

Variable independiente: Concentración

Log-Y Raíz Cuadrada-X: $Y = \exp(a + b \cdot \sqrt{X})$

Coeficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	4,73088	0,0689676	68,5957	0,0000
Pendiente	-0,240126	0,0126622	-18,9639	0,0000

NOTA: intercepto = $\ln(a)$

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	29,143	1	29,143	359,63	0,0000
Residuo	3,48454	43	0,0810359		
Total (Corr.)	32,6275	44			

Coefficiente de Correlación = -0,945094

R-cuadrada = 89,3202 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 89,0719 por ciento

Error estándar del est. = 0,284668

Error absoluto medio = 0,210598

Estadístico Durbin-Watson = 0,457427 (P=0,0000)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,743698

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo log-Y raíz cuadrada-X para describir la relación entre Viabilidad y Concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Viabilidad} = \exp(4,73088 - 0,240126 \cdot \sqrt{\text{Concentración}})$$

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 89,3202% de la variabilidad en Viabilidad. El coeficiente de correlación es igual a -0,945094, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,284668.

El error absoluto medio (MAE) de 0,210598 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0%.

Como puede observarse en el gráfico 10, la viabilidad de MDA se ve afectada por la presencia del extracto de *A. australe* ya que existe una correlación moderadamente fuerte entre la viabilidad y la concentración del extracto, con un Coeficiente de Correlación = -0,828385 y un nivel

de confianza del 95%. El IC_{50} es bajo (16,83 μ g), por lo que el extracto presenta una actividad importante a una dosis baja.

Por lo antes expuesto se decide probar las líneas celulares con las fracciones obtenidas del extracto de *A. australe*.

4.5.2.- Efecto de las fracciones de *A. australe* sobre las líneas celulares.

El efecto de las fracciones fue analizado sobre las mismas líneas celulares. Como las fracciones se encontraban solubilizadas en metanol, se utilizó como control el metanol al 0,5%. Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre la media de viabilidad entre una fracción a otra, la prueba de los múltiples rangos (LSD) para determinar las diferencias significativas entre las diferentes medias de viabilidad de cada fracción respecto a la media del control.

4.5.2.1.- Efectos de las 6 fracciones de *A. australe* sobre MCF-7.

Se analizaron las 6 fracciones obtenidas del extracto de *A. australe* frente a MCF-7 con el MTT, utilizando el metanol al 0,5% como control.

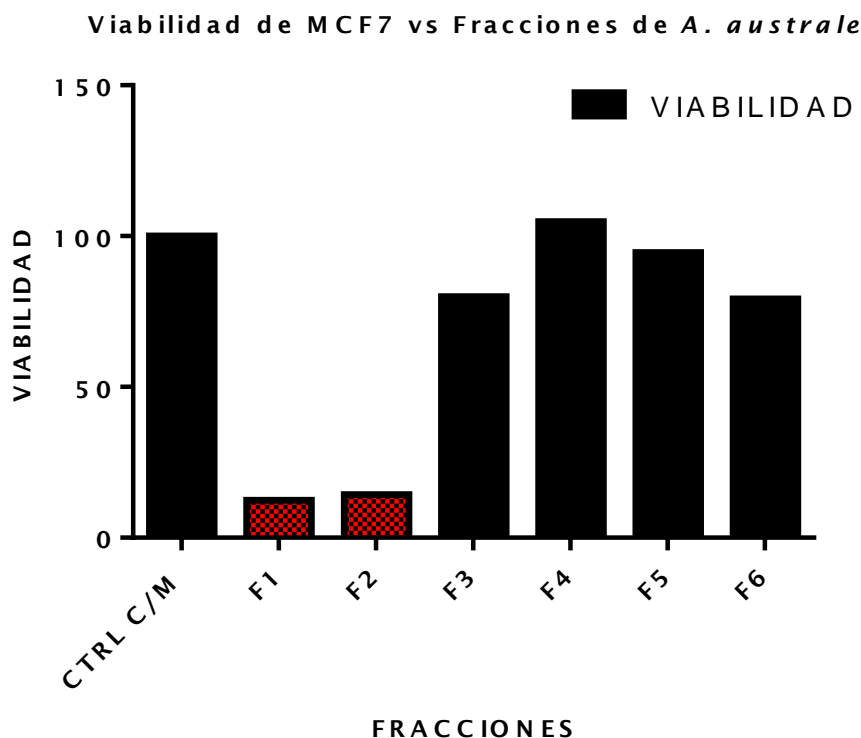


GRÁFICO 11: Viabilidad media de MCF-7 frente a las fracciones 1 a 6 del extracto de *A. australe*. Utilizando como control el metanol al 0,5 %.

Puede observarse como las fracciones activas frente a MCF-7 son las fracciones 1 y 2. Es decir, que la actividad observada del extracto crudo, podría deberse a dichas fracciones.

Tabla ANOVA para % viabilidad por Fracciones

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	39037,4	6	6506,23	136,04	0,0000
Intra grupos	1099,98	23	47,8252		
Total (Corr.)	40137,4	29			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % viabilidad entre un nivel de Fracciones y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para % viabilidad por Fracciones

Método: 95,0 porcentaje LSD

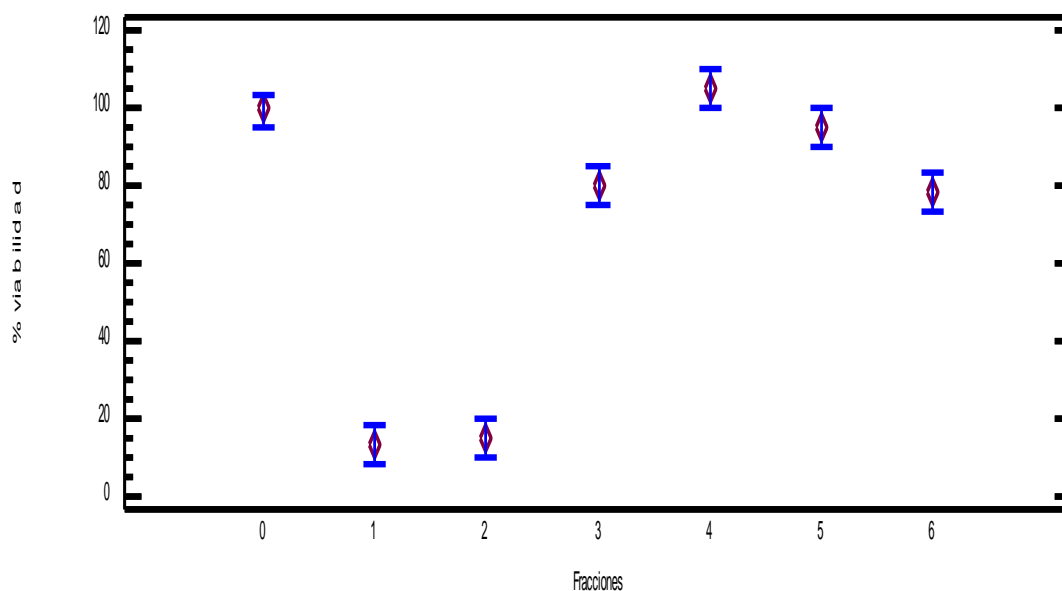
Fracciones	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	4	12,3958	X
2	4	14,3229	X
6	4	79,1667	X
3	4	79,9219	X

5	4	94,6094	X
0	6	100,035	XX
4	4	104,844	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 1	*	87,6394	9,23448
0 - 2	*	85,7123	9,23448
0 - 3	*	20,1134	9,23448
0 - 4		-4,80851	9,23448
0 - 5		5,42586	9,23448
0 - 6	*	20,8686	9,23448
1 - 2		-1,92708	10,1159
1 - 3	*	-67,526	10,1159
1 - 4	*	-92,4479	10,1159
1 - 5	*	-82,2135	10,1159
1 - 6	*	-66,7708	10,1159
2 - 3	*	-65,599	10,1159
2 - 4	*	-90,5208	10,1159
2 - 5	*	-80,2865	10,1159
2 - 6	*	-64,8438	10,1159
3 - 4	*	-24,9219	10,1159
3 - 5	*	-14,6875	10,1159
3 - 6		0,755208	10,1159
4 - 5	*	10,2344	10,1159
4 - 6	*	25,6771	10,1159
5 - 6	*	15,4427	10,1159

* indica una diferencia significativa.

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Del análisis estadístico se observa que además de la actividad observada para las fracciones 1 y 2, se relacionan con un nivel mucho menor de actividad las fracciones 3 y 6 (grupos homogéneos) y por otro lado no

mostraron ser efectivas las fracciones 4 y 5 (grupos homogéneos con el control). Con un nivel de 95%.

4.5.2.2.- Efectos de las 6 fracciones de *A. australe* sobre MG-63.

Se analizaron las 6 fracciones obtenidas del extracto de *A. australe* frente a MG-63 con el MTT, utilizando el metanol al 0,5% como control.

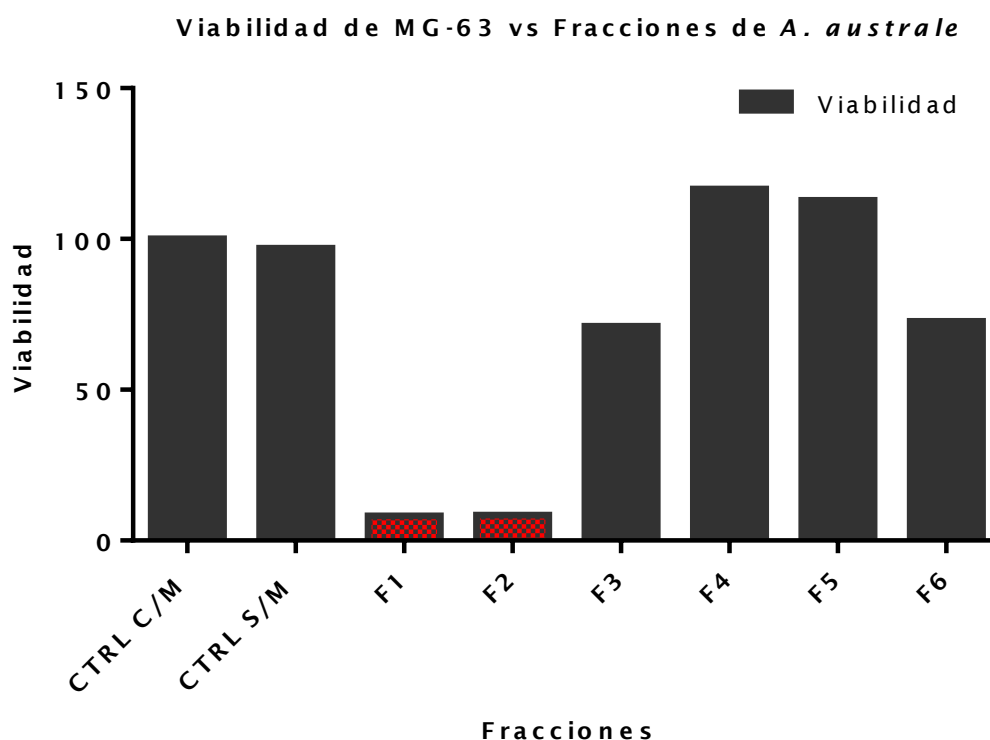


GRÁFICO 12: Viabilidad media de MG-63 frente a las fracciones del extracto de *A. australe*. Utilizando como control el metanol al 0,5 %.

Puede observarse como las fracciones activas frente a MG-63 son las fracciones 1 y 2. Es decir, que la actividad observada del extracto crudo, podría deberse a dichas fracciones. Efecto similar al obtenido con MCF7.

Tabla ANOVA para % viabilidad por Fracciones

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	51910,3	6	8651,71	43,28	0,0000
Intra grupos	4397,75	22	199,898		

Total (Corr.)	56308,0	28			
---------------	---------	----	--	--	--

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % viabilidad entre un nivel de Fracciones y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para % viabilidad por Fracciones

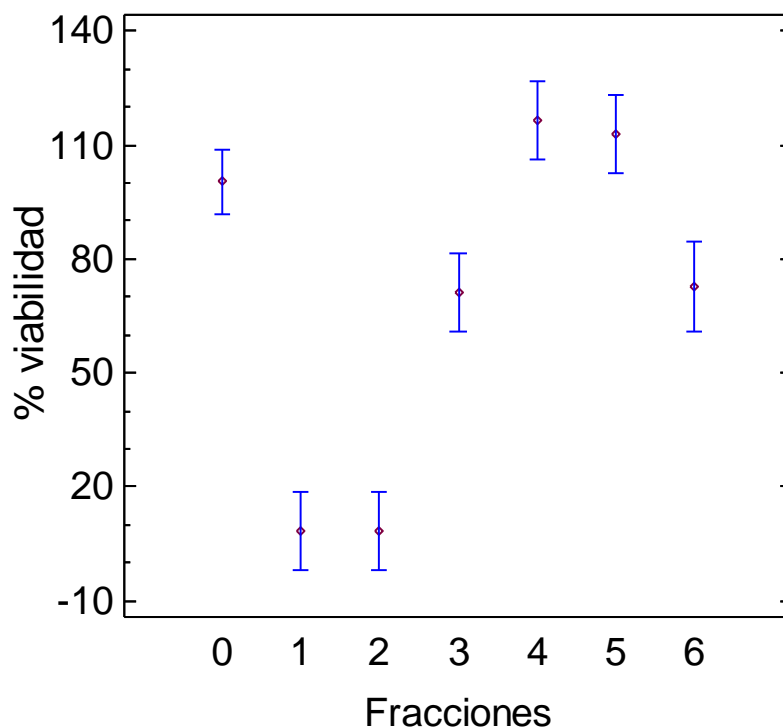
Método: 95,0 porcentaje LSD

Fracciones	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	4	8,14928	X
2	4	8,492	X
3	4	71,1158	X
6	3	72,7342	X
0	6	100,47	X
5	4	112,776	X
4	4	116,584	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 1	*	92,3204	18,927
0 - 2	*	91,9777	18,927
0 - 3	*	29,3539	18,927
0 - 4		-16,1145	18,927
0 - 5		-12,3064	18,927
0 - 6	*	27,7355	20,7335
1 - 2		-0,342727	20,7335
1 - 3	*	-62,9665	20,7335
1 - 4	*	-108,435	20,7335
1 - 5	*	-104,627	20,7335
1 - 6	*	-64,5849	22,3947
2 - 3	*	-62,6238	20,7335
2 - 4	*	-108,092	20,7335
2 - 5	*	-104,284	20,7335
2 - 6	*	-64,2422	22,3947
3 - 4	*	-45,4684	20,7335
3 - 5	*	-41,6603	20,7335
3 - 6		-1,61843	22,3947
4 - 5		3,80807	20,7335
4 - 6	*	43,85	22,3947
5 - 6	*	40,0419	22,3947

* indica una diferencia significativa.

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Del análisis estadístico se observa que además de la actividad observada para las fracciones 1 y 2, se relacionan con un nivel mucho menor de actividad las fracciones 3 y 6 (grupos homogéneos) y por otro lado no mostraron ser efectivas las fracciones 4 y 5 (grupos homogéneos con el control). Con un nivel de 95%. Resultado similar al obtenido con MCF7.

4.5.2.3.- Efectos de las 6 fracciones de *A. australe* sobre MDA-231.

Se analizaron las 6 fracciones obtenidas del extracto de *A. australe* frente a MG-63 con el MTT, utilizando el metanol al 0,5% como control.

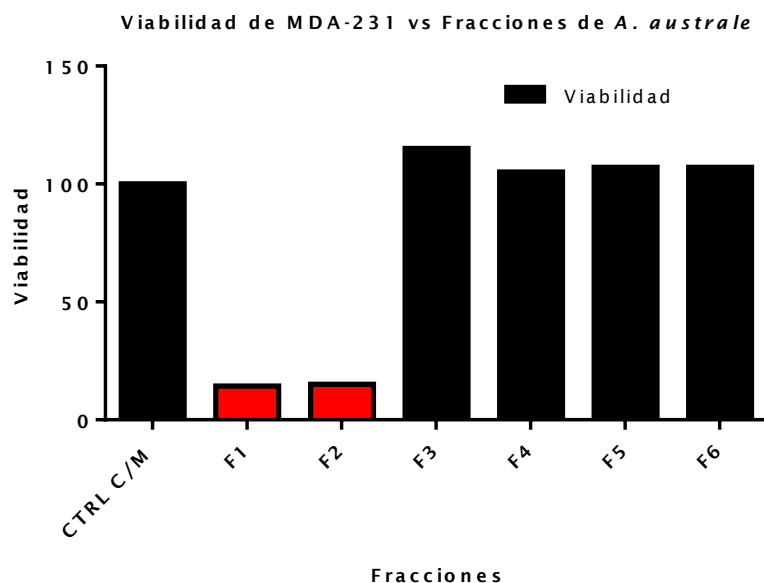


GRÁFICO 13: Viabilidad media de MDA-231 frente a las fracciones del extracto de *A. australe*. Utilizando como control el metanol al 0,5 %.

Puede observarse como las fracciones activas frente a MG-63 son las fracciones 1 y 2. Es decir, que la actividad observada del extracto crudo, podría deberse a dichas fracciones. Efecto similar al obtenido con las líneas anteriores.

Tabla ANOVA para % viabilidad por Fracciones

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	50006,5	6	8334,41	203,43	0,0000
Intra grupos	942,3	23	40,9696		
Total (Corr.)	50948,8	29			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % viabilidad entre un nivel de Fracciones y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para % viabilidad por Fracciones

Método: 95,0 porcentaje LSD

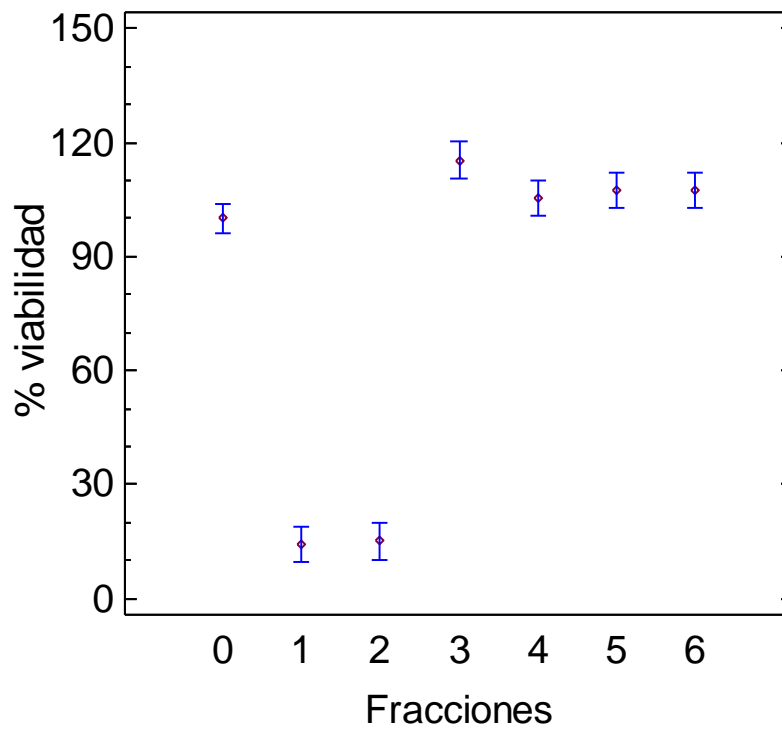
Fracciones	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	4	14,2668	X
2	4	14,9892	X
0	6	100,0	X
4	4	105,285	X
5	4	107,272	XX
6	4	107,272	XX
3	4	115,435	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-----------	------	------------	-------------

0 - 1	*	85,7332	8,54702
0 - 2	*	85,0108	8,54702
0 - 3	*	-15,4346	8,54702
0 - 4		-5,28534	8,54702
0 - 5		-7,27185	8,54702
0 - 6		-7,27185	8,54702
1 - 2		-0,722369	9,36279
1 - 3	*	-101,168	9,36279
1 - 4	*	-91,0185	9,36279
1 - 5	*	-93,0051	9,36279
1 - 6	*	-93,0051	9,36279
2 - 3	*	-100,445	9,36279
2 - 4	*	-90,2962	9,36279
2 - 5	*	-92,2827	9,36279
2 - 6	*	-92,2827	9,36279
3 - 4	*	10,1493	9,36279
3 - 5		8,16277	9,36279
3 - 6		8,16277	9,36279
4 - 5		-1,98652	9,36279
4 - 6		-1,98652	9,36279
5 - 6		-7,50001E-9	9,36279

* indica una diferencia significativa.

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Del análisis estadístico se observa que además de la actividad observada para las fracciones 1 y 2 (grupos homogéneos), las demás fracciones no

mostraron diferencias significativas con los controles (grupos homogéneos). Con un nivel de 95%. Resultado similar al obtenido con las demás líneas.

4.5.3.- Efectos de diluciones de la fracción 1 y 2 de *A. australe* sobre las líneas celulares.

Una vez reconocidas las fracciones activas, se procedió a realizar pruebas con diluciones seriadas frente a las líneas celulares. Las pruebas fueron realizadas por duplicado.

4.5.3.1.- Efectos de diluciones de la fracción 1 y 2 de *A. australe* sobre MCF-7.

La viabilidad de MCF-7 fue probada frente a las fracciones 1 y 2 diluidas.

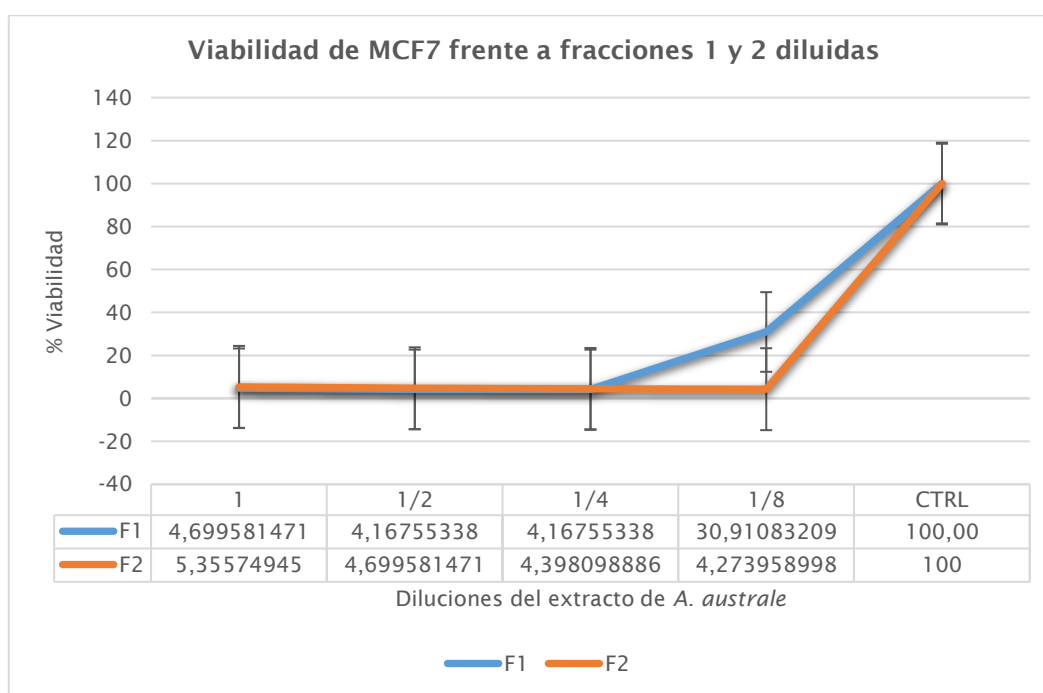


GRÁFICO 14: Viabilidad media de MCF-7 frente a las fracciones 1 y 2 (F1 y F2) puras (1) y diluidas (1/2; 1/4; 1/8), de *A. australe*. Utilizando metanol 0,5% como control.

Como se puede observar en el gráfico 14, la fracción 2 del extracto continúa siendo activa a lo largo de las 3 diluciones probadas. La fracción 1 sin embargo pierde efectividad en la dilución 1/8.

4.5.3.2.- Efectos de diluciones de la fracción 1 y 2 de *A. australe* sobre MG-63.

La viabilidad de MG-63 fue probada frente a las fracciones 1 y 2 diluidas.

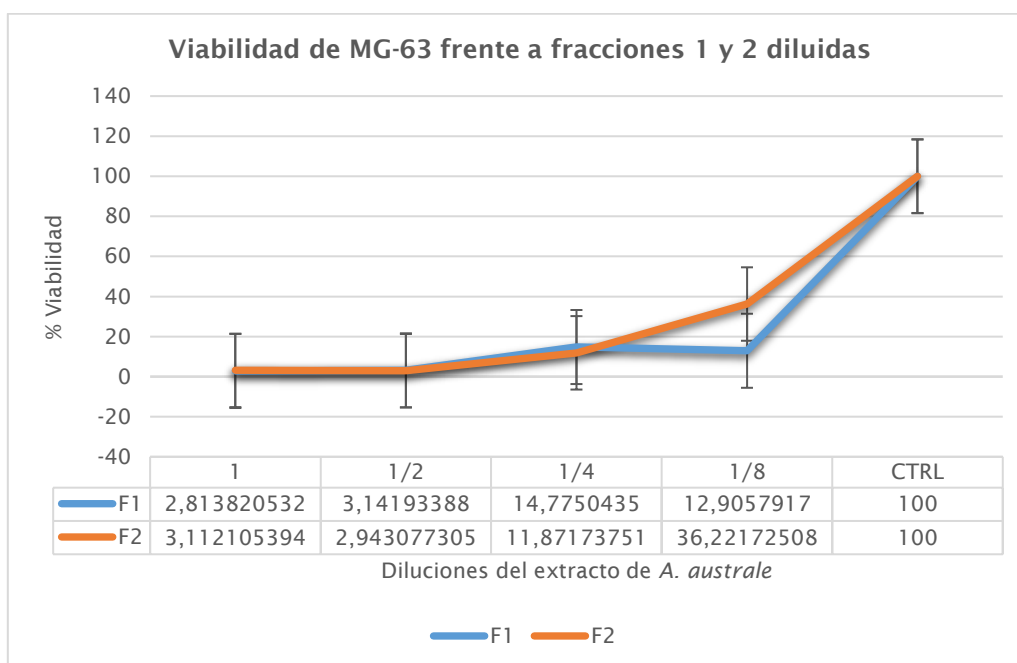


GRÁFICO 15: Viabilidad media de MG-63 frente a las fracciones 1 y 2 (F1 y F2) puras (1) y diluidas (1/2; 1/4; 1/8), de *A. australe*. Utilizando metanol 0,5% como control.

Como se puede observar en el gráfico 15, las fracciones presentan con comportamiento similar. La fracción 2 del extracto comienza a perder efectividad a partir de la dilución 1/4, la fracción 1 se comporta de manera similar, únicamente que es igualmente activa en las diluciones 1/4 y 1/8.

4.5.3.3.- Efectos de diluciones de la fracción 1 y 2 de *A. australe* sobre MDA-231.

La viabilidad de MDA-231 fue probada frente a las fracciones 1 y 2 diluidas.

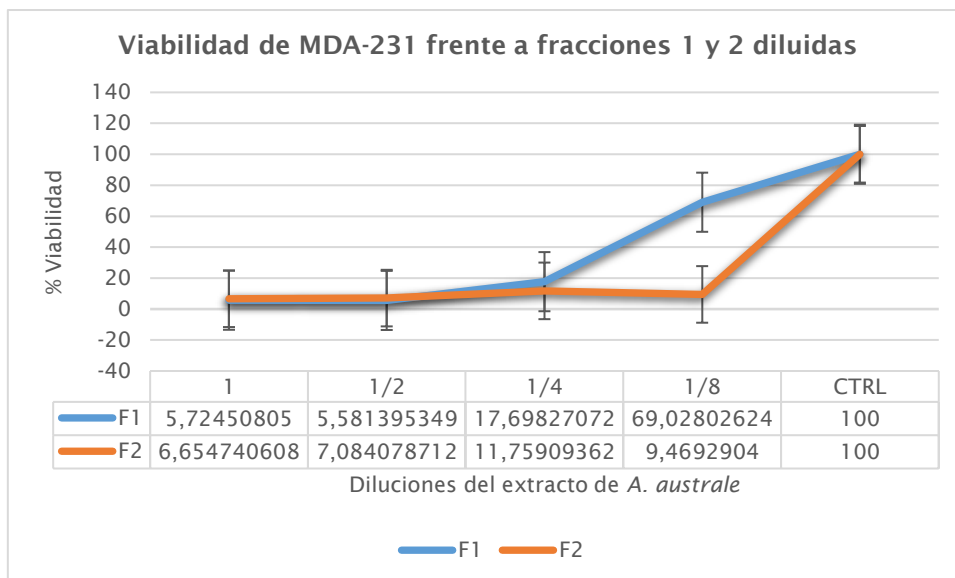


GRÁFICO 16: Viabilidad media de MDA frente a las fracciones 1 y 2 (F1 y F2) puras (1) y diluidas (1/2; 1/4; 1/8), de *A. australe*. Utilizando metanol 0,5% como control.

Como se puede observarse en el gráfico 16, la fracción 1 comienza a perder efectividad a partir de la dilución 1/8. Sin embargo, la fracción 2 continúa manteniendo un buen nivel de efectividad a lo largo de todas las diluciones probadas. Probablemente esta fracción sea la mayor responsable de la actividad del extracto frente a MDA.

4.5.4.- Estimación de proliferación relativa.

El porcentaje de inhibición de la proliferación se calculó en base a los datos obtenidos de la viabilidad.

$$\frac{(\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia de la muestra})}{\text{Absorbancia del control}} \times 100 = \% \text{ de inhibición de la proliferación}$$

Considerando que la absorbancia de los cristales de formazan medidas en el espectrofotómetro es directamente proporcional a las células tumorales vivas, en comparación con los controles, se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 24: Estimación relativa de la inhibición de la proliferación de la línea MCF7 frente a los extractos probados de *P. hydropiperoides* y de *A. australe*.

Extracto crudo de droga vegetal en µg/ml	% de inhibición de la proliferación obtenida para <i>P. hydropiperoides</i>	% de inhibición de la proliferación obtenida para <i>A. australe</i>
500	-1,72%	93,78%
250	-38,89%	92,90%
200	-33,30%	91,46%
150	-35,51%	46,21%
100	-38,06%	12,01%
50	-24,23%	-4,45%
25	-25,15%	-4,85%

Tabla 25: Estimación relativa de la inhibición de la proliferación de la línea MG-63 frente a los extractos probados de *P. hydropiperoides* y de *A. australe*.

Extracto crudo de droga vegetal en µg/ml	% de inhibición de la proliferación obtenida para <i>P. hydropiperoides</i>	% de inhibición de la proliferación obtenida para <i>A. australe</i>
250	12,76%	85,16%
200	11,95%	96,57%
150	10,60%	96,31%
100	-10,18%	92,51%
50	-5,87%	18,64%
25	-	13,06%
10	-	1,04%
5	-	8,07%

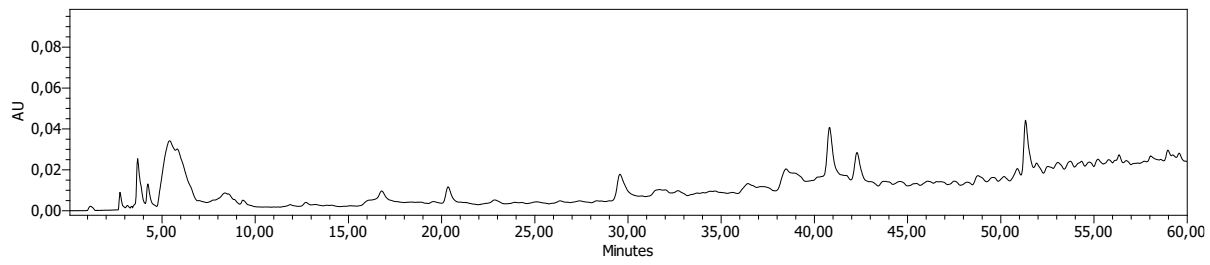
Tabla 26: Estimación relativa de la inhibición de la proliferación de la línea MDA-231 frente a los extractos probados de *P. hydropiperoides* y de *A. australe*.

Extracto crudo de droga vegetal en µg/ml	% de inhibición de la proliferación obtenida para <i>P. hydropiperoides</i>	% de inhibición de la proliferación obtenida para <i>A. australe</i>
250	29,56%	98,21%
200	28,07%	94,66%
150	34,45%	96,51%
100	39,58%	92,62%
50	38,09%	90,71%
25	-	65,70%
10	-	14,09%
5	-	33,65%

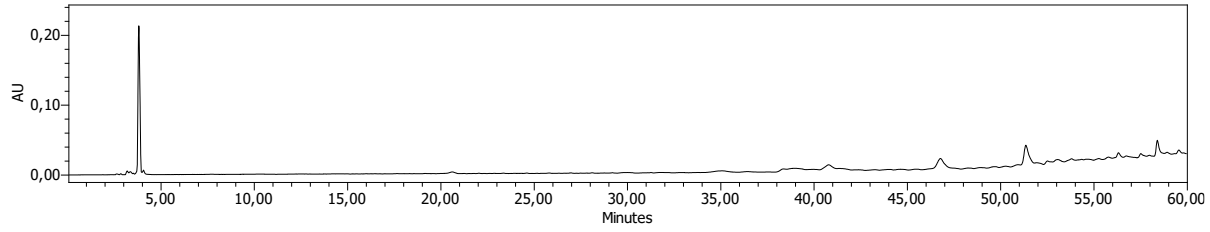
4.6.- Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) del extracto crudo de *A. australe* y de sus fracciones.

Una vez realizado el estudio biológico, se procedió a analizar por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia el extracto de *A. australe* (80% de alcohol y 20% de agua) y el de sus seis fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna (detallado en Materiales y métodos 3.6.3)

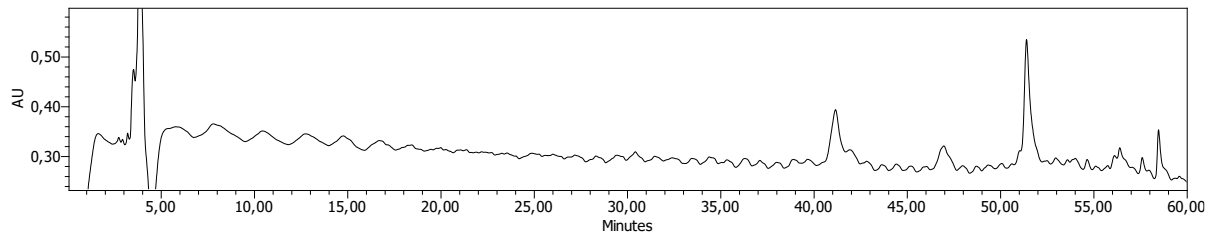
Dado que el extracto de *P. hydropiperoides* no demostró actividad significativa en las líneas celulares probadas, este no fue analizado mediante cromatografía líquida de alta eficiencia.



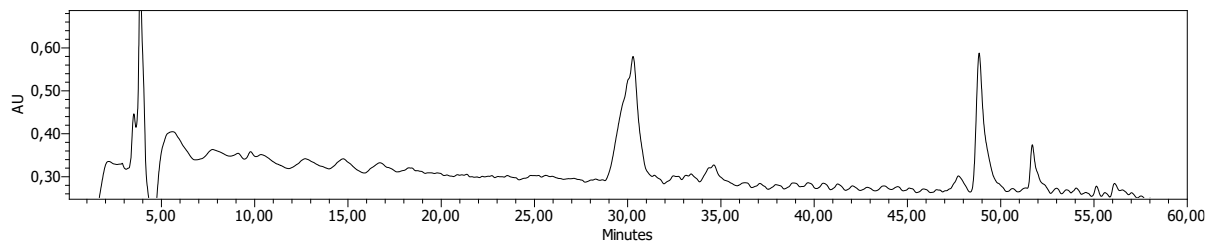
A



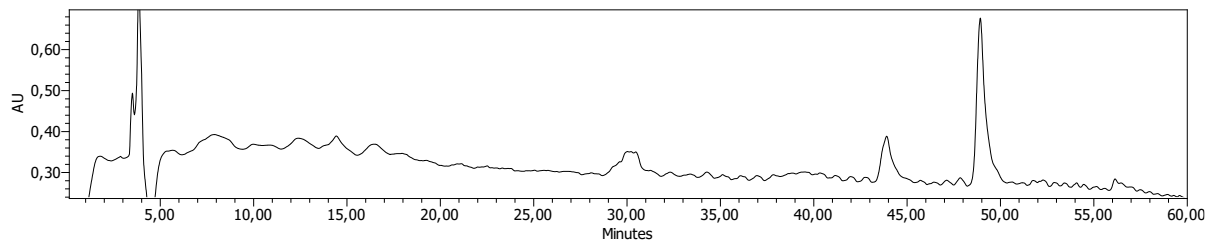
B



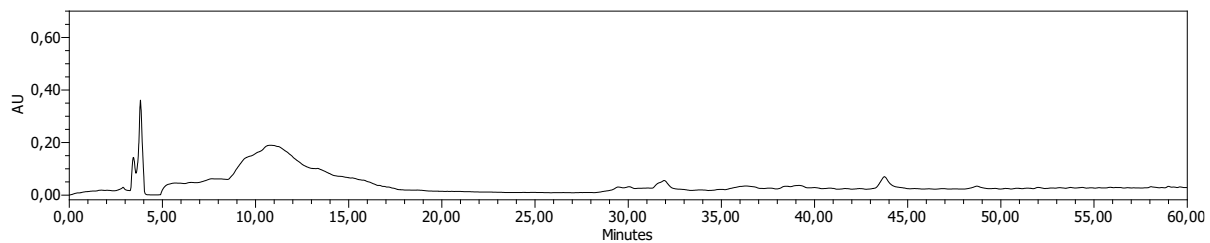
C



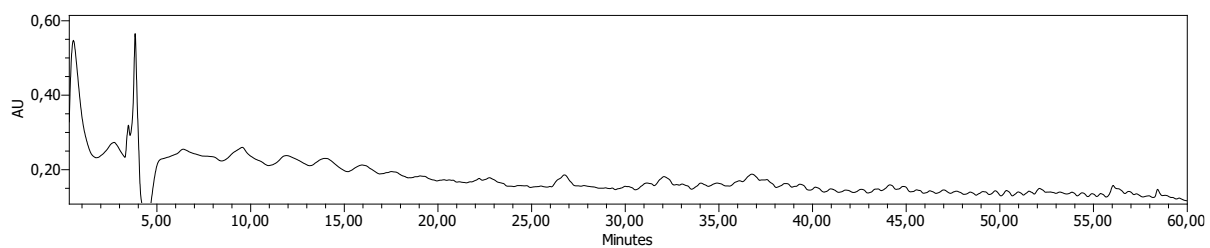
D



E



F



G

GRÁFICO 17: Cromatogramas extraídos en Max Plot de extracto y fracciones obtenidas de *A. australe*. A. Extracto 20% agua 80% alcohol de *A. australe* (extracto crudo). B. Fraccion 1. C. Fraccion 2. D. Fraccion 3. E. Fraccion 4. F. Fraccion 5. y G. Fraccion 6.

Como puede observarse comparando los cromatogramas, las fracciones más activas que fueron las fracciones 1 y 2 con el extracto crudo (cromatogramas A, B y C) las mismas comparten picos con un tiempo de retención entre 51-52 min, de diferente intensidad. La fracción 2 principalmente presenta un pico mas pronunciado en este intervalo. La fracción 1 y el extracto crudo lo presentan en menor intensidad.

Probablemente la actividad observada podría estar relacionada con estos picos.

Las fracciones 3, 4, 5 y 6 no comparten este pico, pero si se encuentran enriquecidas en otros componentes con otros tiempos de retención. Pero las mismas no demostraron ser activas frente a las líneas celulares probadas.

5.- Discusión

5.1.- Pureza de las drogas vegetales comercializadas bajo la denominación de “Katai” y “Tapekue” en la Ciudad de Posadas.

Las especies seleccionadas para la realización del presente trabajo, son utilizadas ampliamente en la región para el tratamiento del cáncer sin discriminar entre las diferentes variedades de la enfermedad.

Las mismas son comercializadas debido a sus propiedades medicinales como agentes anticancerígenos, y a su fácil adquisición. Las drogas vegetales comercializadas bajo la denominación vulgar de “katái” y “tapekué” fue abordado inicialmente con el análisis de pureza.

El “tapekué” (*A. australe*) se comercializa con un alto grado de pureza, donde la droga vegetal está conformada por las partes aéreas de la planta, tallos, hojas, flores, frutos y semillas. Sin embargo, el “katái” (*P. hydropiperoides*) fue encontrado adulterado (aunque en pequeñas cantidades) con *P. punctatum* también conocido popularmente como “katái”. Esto pudo deberse a la similitud que presentan ambas especies en cuanto a su exomorfología, además de compartir el mismo ecosistema, entre otras.

5.2.- Situación actual de la comercialización de *P. hydropiperoides* y *A. australe*.

El presente trabajo realiza un aporte etnobotánico con respecto a la situación actual de la comercialización y uso de ambas especies del género *Polygonum*. De acuerdo a este resultado, se decidió incluir el *P. punctatum* en el estudio de genotoxicidad, ya que se comprobó que también era consumido indistintamente al igual que *P. hydropiperoides*.

5.3.- Farmacobotánica de las especies seleccionadas.

P. hydropiperoides Mich. es una especie Americana, distribuida desde el sur de Estados Unidos, hasta el centro de Argentina. En nuestro país se pueden encontrar 2 variedades de la especie: *P. hydropiperoides* var. *hydropiperoides* y *P. hydropiperoides* var. *setaceum*, diferenciándose esta última de la variedad típica, por poseer ocreas que recubre los nudos, con el margen provisto de setas conspicuas, las que frecuentemente igualan la longitud de la ocrea. Así mismo sus aquenios son siempre trígonos de caras cóncavas (Cialdella, 1989). Ambas variedades son consumidas indistintamente, encontrándose formando parte de drogas vegetales comercializadas y a su vez asociadas con *P. punctatum*. En el presente trabajo la variedad más abundante encontrada fue *P. hydropiperoides* var. *setaceum*. En cuanto a *A. australe* coincide con la descripción de tricomas de cubierta pluricelulares uniseriados y tricomas glandulares capitados (Martins, L. R., et al, 2006; Barroso, G., et al, 1991).

5.4.- Extracciones, rendimientos y aspectos generales.

El método extractivo seleccionado fue la maceración según Farmacopea Nacional Argentina Sexta Edición, ya que es más exhaustivo que la infusión, no interviene la temperatura (ya que no se conoce la naturaleza de la/las moléculas activas) y es similar a las formas de utilizar estas especies en la medicina popular.

El aspecto final del extracto de *A. australe* estaría ligado al rendimiento obtenido del mismo. Presento un aspecto pegajoso, de difícil manipulación, de un aroma fuerte pero no desagradable. Probablemente los solventes seleccionados para la extracción (las diferentes mezclas hidroalcohólicas) hayan extraído sustancias ergásticas muy afines al solvente. De acuerdo con Melo de Pinna y Menezes (2000, 2002 y 2004) varios autores apuntan a las *Asteraceae* como una de las principales familias donde se encuentran conductos secretores en las hojas, en la corteza y en la médula del tallo y se sugieren que estos conductos se originan en la endodermis. Estos conductos secretores generalmente

contienen sustancias lipofílicas de origen terpénico, además de otros componentes.

En cuanto a *P. hydropiperoides* el extracto se logró de un excelente aspecto (similar al azúcar moreno) de fácil manipulación, cristalino. El rendimiento en si fue menor al de *A. australe*, pero esto podría deberse a lo anteriormente expuesto sobre la misma.

5.5.- Evaluación de la genotoxicidad de las especies seleccionadas.

Para evaluar la genotoxicidad de las especies fue seleccionado el test de *Allium cepa* (Fiskesjo, G. 1993 y 1994; Andrioli, *et al*, 2006) ya que se consideró el más apropiado para el trabajo. Es sencillo, económico y ofrece resultados confiables. Es un modelo experimental preliminar, intermedio entre *in vitro* e *in vivo* que permite evaluar la genotoxicidad de mezclas complejas, mediante un protocolo modificado (Rank et al, 1993).

Las concentraciones usadas en los ensayos para las especies vegetales probadas, fueron superiores a las utilizadas en medicina popular. Este hecho surge del primero ensayo donde se prueban las concentraciones a los fines de determinar la concentración 50 y luego repetir el ensayo y evaluar la genotoxicidad. Resulta que las concentraciones necesarias para lograr detener el crecimiento de las raíces en un 50% en comparación con los controles, resulto ser una concentración alta. Por lo que la genotoxicidad fue evaluada en concentraciones incluso más altas.

Podría decirse en términos generales, que las especies no presentan efectos tóxicos en las concentraciones utilizadas en medicina popular, donde que el rango de concentraciones es variable y difícil de estandarizar pero oscila entre 5 y 15 g/L por lo general, considerando los resultados obtenidos en cuanto al uso popular establecido para las especies. Los efectos genotóxicos fueron observados en *A. australe* a la concentración de 37,5g/L y para *P. punctatum* a 25 g/L, la toxicidad

general fue manifestada en *P. hydropiperoides* a partir de 25 g/L. En el caso de *P. punctatum* los resultados concuerdan con Pastori, T. (2015) donde demostraron que las infusiones y los extractos de hojas de *P. punctatum* presentaron reducción en los valores de índices mitóticos en las concentraciones utilizadas en relación al control expuesto en agua destilada. Se identificaron alteraciones cromosómicas en la división celular, tales como puentes anafásicos, en todas las concentraciones de infusiones y extractos indicando así que *P. punctatum* posee actividad genotóxica.

Podría plantearse y proyectarse una continuidad en el estudio donde se analice la genotoxicidad en concentraciones inferiores a las planteadas en el presente trabajo, aunque sea menos factible encontrar biomarcadores de genotoxicidad en estas concentraciones (Mudry y Carballo, 2006), pero serviría de respaldo y apoyaría la hipótesis formulada de que ambas especies no presentan efectos genotóxicos a las concentraciones usuales en la medicina popular.

Dada la naturaleza de los objetivos del presente estudio, el resultado obtenido en esta instancia reafirma el potencial como fitofarmacológico, de *A. australe*, dado que podría no presentar efectos tóxicos. También reafirma los datos etnofarmacológicos relevados para esta especie en trabajos anteriores y lo que se conoce empíricamente del uso que se le atribuye a la misma.

Otra posible continuidad en este aspecto, sería ensayar la genotoxicidad de las fracciones 1 y 2 del extracto de *A. australe*, que han demostrado ser activas, utilizando el mismo modelo de *Allium cepa*, o bien un modelo alternativo.

5.6.- Análisis químicos y metabolitos secundarios de interés.

En relación a los aspectos químicos analizados en el presente estudio, los extractos fueron planteados como mezclas hidroalcohólicas tales como los realizados por Mirandola L, (2002); Shimizu, M. (1987) y

Bonella, A. (2011); para pruebas biológicas y análisis fitoquímicos. Finalmente, se recurrió a seleccionar uno de los extractos, que sean más representativos en términos de metabolitos disueltos, para cada especie. Las TLC de los extractos corresponden a análisis preliminares de la composición química, pero podemos destacar que se observa que los extractos más enriquecidos eran los extractos de mayor contenido alcohólico. Esta extracción podría verse modificada si el sistema de solventes y el método de extracción hubieran sido de otra naturaleza, pero los resultados obtenidos hasta el momento podrían ser de utilidad para mejorar los procesos y encaminar a enriquecer los extractos naturales en función de los contenidos requeridos para obtener un efecto antitumoral.

También se plantea una continuidad en esta etapa, el análisis del extracto crudo de *A. australe* y de las fracciones obtenidas 1 y 2, a los fines de identificar la identidad de la/las moléculas responsables del pico observado entre 51 y 52 minutos, por medio de HPLC acoplado a detector de Masa.

5.7.- Actividades biológicas observadas.

Numerosas especies del género *Polygonum* presentan diferentes utilidades medicinales relacionadas al cáncer, algunas recientemente estudiadas como los efectos antitumorales *in vivo* de *P. viscosum* (Alam, M. *et al*, 2014); propiedades antioxidantes en *P. aviculare*, *P. cuspidatum*, *P. multiflorum* y *P. orientale* (Cai, Y. *et al*, 2004); efectos anticancerígenos de *P. bistorta* (Pillai Manoharan, K. *et al*, 2007); efectos analgésicos en *P. punctatum* (Rondina, Rubén *et al*, 2008). Finalmente, la especie *P. hydropiperoides* que hasta el momento no había sido probado sobre líneas cancerígenas, no demostró actividad sobre las líneas tumorales probadas. Por lo que si presenta alguna utilidad frente a este tipo de patología, su actividad no estaría ligada a interferir la fisiología del tumor en forma directa. No se descarta hasta el momento, en que presente alguna utilidad farmacéutica ligada posiblemente a

mitigar los síntomas asociados a la fisiopatología de la enfermedad en si, tal como antitérmico, analgésico, antiinflamatorio, etc. Propiedades similares importantes han sido reportadas para el caso de *P. hydropiper*, habiendo incluso formas farmacéuticas orales comercializadas en Brasil para el tratamiento de las hemorroides (como ser el caso de IMESCARD®).

La variedad de *P. hydropiperoides* recolectada para la realización del presente trabajo es la var. *setaceum*, podría plantearse también la diferencia en cuanto a su actividad antitumoral frente a la otra variedad también citada para la zona que es la var. *hydropiperoides*. Ambas variedades crecen en ambientes similares y en forma simultánea.

Para *A. australe* existen antecedentes en cuanto a su utilidad como antimicrobiano frente a cepas de *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *B. cereus* (Bonella, A. F. *et al*; 2011), inhibidor de la enzima aldosa reductasa (Shimizu, M. *et al*; 1987), también se ha aislado y descrito el acanthostral, un germacrolido (lactona sesquiterpenica) con actividad antineoplásica (Matsunaga, K. *et al*, 1996). También la especie *A. hispidum* ha sido estudiada como planta anticancerígena utilizada en la etnomedicina (Tariq, A. *et al*, 2017).

En cuanto a la actividad observada en *A. australe* en el presente trabajo, si bien se observa una marcada toxicidad del extracto para con las líneas tumorales probadas, y más aún para las primeras fracciones de la partición del extracto, cabe destacar que las mismas (tanto en cantidad de mg de peso seco, como de fracciones presentes en la TLC figura 29) son más enriquecidas que las fracciones 3, 4, 5 y 6. Aunque dados los principios de la cromatografía en columna planteada para el presente trabajo, las fracciones 1 y 2 presentan una mezcla de compuestos de bajo peso molecular, lo que les permitió eluir en un tiempo menor que los componentes disueltos en las demás fracciones.

El hecho de que la actividad de las fracciones de *A. australe* frente a las 3 líneas celulares tumorales, sea similar para las fracciones 1 y 2,

incluso en diluciones seriadas (la fracción 2 fue activa y sostenida considerablemente a lo largo de todas las diluciones probadas, principalmente para MDA), evidencia que los componentes activos de las fracciones presentan similar mecanismo de acción para intervenir la fisiología tumoral.

Resulta de gran importancia al comparar los perfiles de HPLC obtenidos en el grafico 17, la comparación de los picos de las fracciones comparadas con el extracto crudo. Dado que la actividad observada podría estar relacionada con la/las sustancias que presentan un tiempo de retención comprendido entre 51 y 52 minutos.

Es una propuesta que surge del presente estudio, el análisis y elucidación molecular de la/las sustancias presentes en el mencionado pico.

5.8.- Comparación de los resultados obtenidos, con especies de la misma familia, del mismo género o diferentes; con actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares tumorales.

En comparación con el extracto de metanol de las partes aéreas de la planta camerunesa *Polygonum limbatum* Meisn (Kuethe, V. et al, 2013) donde se observó actividad antiproliferativa contra la leucemia THP-1 (IC₅₀ de 10 µg / ml) y líneas celulares MCF-7 (IC₅₀ de 20 µg / ml), donde los constituyentes activos de la planta fueron flavonoides identificados como cardamomin (32), (6)-oligohomoisoflavanone,(S) - (2) - pinostrobin, 20,40-dihidroxi-30,60-dimetoxicalcon (33), (2S) - (2) -5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavanona, y (2S) - (2) -5,7-dimetoxiflavanona, los compuestos 32 y 33 también indujeron una inhibición significativa de la proliferación de las células THP-1 de la leucemia (IC₅₀ por debajo de 4 µg / ml); los extractos de *P. hydropiperoides* probados en el presente estudio no demostraron ese nivel de actividad frente a MCF-7, tampoco para MG-63 (IC₅₀ de 394,4 µg / ml), y MDA-MD-231 (IC₅₀ de 150.7 µg / ml).

A su vez el extracto de metanol de las raíces de *Acanthospermum hispidum* DC, recogido en Nigeria, donde se encontró que era activo contra el carcinoma de pulmón de tamaño caucásico humano línea celular COR-L23, con un IC₅₀ de 8.87 µg / mL, los resultados obtenidos en el presente trabajo destacan la actividad de *A. australe* frente a MDA-MD-231 con un IC₅₀ de 16.83 µg / mL. Si bien las líneas celulares tumorales son diferentes, *A. hispidum* ha sido fuente de varios sesquiterpenos bioactivos, tales como hispidunolides A y B, guaianólidos, melampólidos y acantospermal B, la citotoxicidad de Los constituyentes de las muestras no han sido reportados (Kuete, V. et al, 2013).

Tabla 27: Comparación de los resultados obtenidos con otras especies con actividad antiproliferativa.

Especie vegetal / Órgano utilizado	Familia	Extracto	Línea celular tumoral	IC ₅₀ µg/m L	Autores
<i>Acanthospermum hispidum</i> DC / raíces	<i>Asteraceae</i>	Metanólico	Carcinoma de pulmón COR-L23	8.87	Kuete, V., Viertel, K., & Efferth, T. (2013).
<i>Polygonum limbatum meisn</i> / Partes aéreas	<i>Polygonaceae</i>	Metanólico	Leucemia THP-1	10	Kuete, V., Viertel, K., & Efferth, T. (2013).
			MCF-7	20	
<i>Polygonum bistorta</i> L. / Planta entera	<i>Polygonaceae</i>	metanol-agua (40:60 v / v)	carcinoma hepático (HCCLM3)	86.5 - 126.8	Intisar, A., Zhang, L., Luo, H., Kiazolu, J. B., Zhang, R., & Zhang, W. (2013).
<i>Polygonum bistorta</i> L. / Planta entera	<i>Polygonaceae</i>	Hexano	P388	<10	Pillai Manoharan, K., Yang, D., Hsu, A., & Tan Kwong Huat, B. (2007).
			HepG2	80.6	
			J82	>100	
			HL60	17.8	
			MCF7	72.0	

			LL2	62.4	
<i>Caesalpinia sappan</i>	<i>Fabaceae</i>	Metanólico	HeLa A549 LLC	15.5 41.4 8.20	Ueda, J. Y., Tezuka, Y., et al (2002).
<i>Hydnophytum formicarum</i>	<i>Rubiaceae</i>	Metanólico	HeLa A549 LLC	11.3 1.03 65.6	Ueda, J. Y., Tezuka, Y., et al (2002).
<i>Coscinium fenestratum</i>	<i>Menispermaceae</i>	Metanólico	HeLa A549 LLC	30.1 5.32 1.65	Ueda, J. Y., Tezuka, Y., et al (2002).
<i>Ononis hirta / Partes aéreas</i>	<i>Fabaceae</i>	Etanolico	MCF-7 Hep-2	17 19	Talib, W., & Manasneh, A. (2010).
<i>Ononis sicula / Partes aéreas</i>	<i>Fabaceae</i>	Etanolico	MCF-7 Hep-2	40 53	Talib, W., & Manasneh, A. (2010).
<i>Verbascum sinaiticum / Flores</i>	<i>Scrophulariaceae</i>	Etanolico	MCF-7 Hep-2	40 66	Talib, W., & Manasneh, A. (2010).
<i>Inula viscosa/ Flores</i>	<i>Astereaceae</i>	Etanolico	MCF-7 Hep-2	30 67	Talib, W., & Manasneh, A. (2010).
<i>Salvia pinardi/ Partes aéreas</i>	<i>Lamiaceae</i>	Etanolico	MCF-7 Hep-2	38 70	Talib, W., & Manasneh, A. (2010).
<i>Acanthospermum austale / Partes aéreas</i>	<i>Asteraceae</i>	Etanol/Agua 80-20 v/v	MCF-7 MG-63 MDA-MD-231	138 73.98 16.95	Altamirano C. (2019)
<i>Polygonum hydropiperoides var. setaceum / Partes aéreas</i>	<i>Polygonaceae</i>	Etanol/Agua 80-20 v/v	MCF-7 MG-63 MDA-MD-231	>100 394.4 150.7	Altamirano C. (2019)

En la tabla 27, se muestran los resultados obtenidos comparados con los que se obtuvieron en especies de la misma familia y mismo género (Kuete, V. et al, 2013; Pillai Manoharan, K. et al, 2007; Intisar, A., et al. 2013), además de especies no emparentadas (Ueda, J. Y., Tezuka, Y., et al. 2002; Talib, W., & Manasneh, A. 2010). Donde pueden relacionarse

los resultados del presente estudio, con los obtenidos con *A. hispidum* frente a COR-L23 (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$ =8.87) por Kuete, V. et al, 2013.

5.9.- Comparación del modelo celular experimental utilizado, frente a otras alternativas probables.

En relación a la complejidad del modelo seleccionado para la realización de las pruebas biológicas, los resultados obtenidos se encuadran en un modelo celular bidimensional monocultivo (Gráfico 18), pudiendo no extrapolarse los resultados a los modelos celulares de mayor complejidad, hasta alcanzar las pruebas *in vivo*.

Por lo que una posible continuidad del presente trabajo se basaría en la realización de pruebas de citotoxicidad y viabilidad celular tumoral en modelos tridimensionales (Friedrich, J. et al, 2009): tales como los esferoides homo o heterotípicos (Pansa *et al*, 2016); líquido sobrelapante (“liquid overlay”); la gota colgante (“hanging droop”); incluso el ensayo de cicatrización de heridas (“wound healing assay”) (Dorst, N. *et al*, 2014; Lamberti, M. *et al*, 2014; Valcarcel, M. *et al*, 2008). Los modelos tridimensionales y en particular, los esferoides de co-cultivo reflejan la organización natural de las células en los tejidos mucho mejor que los cultivos de células 2D como lo indican las diferencias en la fisiología celular, además de representar de manera más aproximada el comportamiento fisiopatológico del microambiente tumoral, donde intervienen además de las células tumorales propiamente dichas, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales, etc.

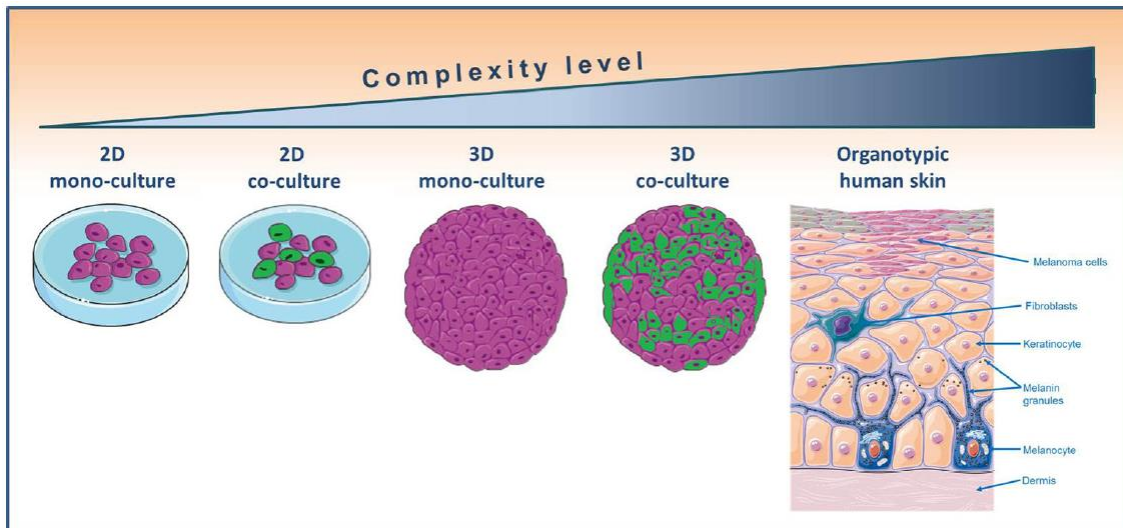


GRÁFICO 18. Grafico comparativo de niveles de complejidad 2D y 3D, en ensayos con líneas tumorales. (Vera, R. et al, 2015)

6.- Conclusiones.

- Las especies *Acanthospermum australe* (Loefl) Kunze (Asteraceae) y *Polygonum hydropiperoides* Michaux (Polygonaceae) a las que se le atribuyen de manera empírica propiedades antineoplásicas, son comercializadas en los centros de distribución locales y se encuentran en el campo de la Ciudad de Posadas. *A. australe* no presenta inconvenientes en cuanto a su identidad, no así *P. hydropiperoides*, que es frecuentemente confundida con *P. punctatum*.
- Los caracteres de valor diagnósticos que podrían utilizarse para el reconocimiento de las drogas vegetales podrían ser para *P. hydropiperoides* las ócreas características, frutos lenticulares o triquetos. Además de estomas anisocíticos y mesófilo con 1-2 estratos de empalizada. En tanto para *A. australe* los frutos con cerdas ganchudas rígidas, estomas anisocíticos, tricomas pluricelulares uniseriados y glandulares capitados.
- *P. punctatum* y *A. australe* presentan efectos genotóxicos, aunque son manifestados a concentraciones muy altas, inusuales en tratamientos empíricos.
- *P. hydropiperoides* presenta efectos tóxicos a nivel general, aunque a concentraciones muy altas, inusuales en tratamientos empíricos.
- Los extractos de mayor contenido alcohólico presentaron mayor cantidad de metabolitos secundarios extraídos.
- Únicamente el extracto de *A. australe* demostró tener actividad frente a las líneas celulares tumorales ensayadas.

- La línea MDA el fenotipo de cáncer triple negativo (debido a la falta de expresión de receptores de estrógenos, progesterona y factores de crecimiento) característico por poseer una elevada agresividad clínica, resultó ser el más sensible al extracto de *A. australe*.
- Las fracciones 1 y 2 obtenidas del extracto de *A. australe*, son las responsables de la actividad observada del extracto crudo. También son las fracciones más enriquecidas en metabolitos, principalmente la 2.
- La actividad observada del extracto de *A. australe* estaría relacionada con el pico con un tiempo de retención comprendido entre 51 y 51 minutos, obtenido en el cromatograma de la fracción 2 principalmente, aunque presente también en el extracto crudo también, y en fracción 1 pero en menor cantidad.

7.- Bibliografía.

- Alam, M. B., Sajid, I., Rashid, Z., Islam, M. M., & Karmaker, B. K. (2014). Evaluation of antitumor effects of the aerial parts of *Polygonum viscosum* linn. *Glob J Pharmacol*, 8(1), 47-52.
- Amat, A. G. (1983). Taxones de Compuestas Bonaerenses críticos para la investigación farmacológica. *Acta Farm. Bonaerense*, 2(1), 23-36.
- Amat, Aníbal Gumersindo, y Marta Ester Yajía. *Farmacobotánica y farmacognosia en Argentina 1980-1998*. La Plata: Ediciones Científicas Americanas, 2000.
- Andrioli, N. B., Wulff, A. F., & Mudry, M. D. (2006). *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad de metronidazol. *Theoria*, 15(2).
- Ashidi JS, Houghton PJ, Hylands PJ, Efferth T. Ethnobotanical survey and cytotoxicity testing of plants of South-western Nigeria used to treat cancer, with isolation of cytotoxic constituents from *Cajanus cajan* Millsp. leaves. *J Ethnopharmacol* 2010;128:501_12.
- Aubin J.E. 1998. Bone stem cells. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 30: 73-82.
- Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences*, 78(5), 431-441.
- Barboza GE, Cantero JJ, Pacciaroni A, Ariza Espinar L: Medicinal Plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*. 2009;34(1-2): 7-365. 2.
- Barboza, Gloria E, Juan J. Cantero, Adriana Pacciaroni, y Luis Ariza Espinar. «Medicinal Plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora.» *Kurtziana*, 2009: Tomo 34 (1-2): 7-365.
- Barroso, G. M., Peixoto, A. L., Costa, C. G., Ichaso, C. L. F., Guimarães, E. F., & Lima, H. C. (1991). *Sistemática de angiospermas do Brasil*, v. 2, Viçosa. Impr. Univ. UFV.
- Bing Hu, Hong-Mei An, Ke-Ping Shen, Hai-Yan Song, and Shan Deng. *Polygonum cuspidatum* Extract Induces Anoikis in Hepatocarcinoma Cells Associated with Generation of Reactive Oxygen Species and Downregulation of Focal Adhesion Kinase. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2012* (2012), Article ID 607675, 9 pages.
- Bonella, A. F., Natalli, V. D., Camizão, L. M., Vieira, F. A., & Belinelo, V. J. (2011). Estudo fitoquímico e atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Acanthospermum australe* (Loerfl.) Kuntze. *Enciclopédia Biosfera*, Goiânia, 7(13), 1329-1335.

- Bonilla-Sepúlveda, O. A., Matute-Turízo, G., & Severiche, C. (2015). Clasificación en subtipos intrínsecos de los carcinomas de mama analizados en un centro de patología de Medellín en el año 2011. *CES Medicina*, 29(1), 35-45.
- Brooks, S. C., Locke, E. R., & Soule, H. D. (1973). Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, 248(17), 6251-6253.
- Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, 67(12), 2141-2153.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74(17), 2157-2184.
- Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro*, 14(11), 911-915.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., & Reeves Jr, W. J. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(3), 661-674.
- Canzoneri, R. (2016). Estudio del rol funcional del gen RHBDD2 en líneas celulares de cáncer de mama (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Médicas).
- CIALDELLA, A. M. (1989). Revisión de las especies argentinas de *Polygonum* sl (Polygonaceae). *Darwiniana*, 179-246.
- Comsa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer research*, 35(6), 3147-3154.
- Dorst, N., Oberringer, M., Grässer, U., Pohlemann, T., & Metzger, W. (2014). Analysis of cellular composition of co-culture spheroids. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 196(5), 303-311. edición. BIOS Scientific Publishers, E. U. A. 256pp.
- Farmacopea Nacional Argentina VI edición. 1978.
- Fiskesjö, G. (1994). *Allium test* II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 9(3), 235-241.
- Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature protocols*, 4(3), 309.

- Hall, M. G., Wilks, M. F., Provan, W. M., Eksborg, S., & Lumholtz, B. (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC (2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1, 3-cyclohexanedione) and mesotrione, inhibitors of 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) following a single dose to healthy male volunteers. *British journal of clinical pharmacology*, 52(2), 169-177.
- Heinrich, M., & Teoh, H. L. (2004). Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer’s disease from local Caucasian knowledge. *Journal of ethnopharmacology*, 92(2-3), 147-162.
- Heremans, H., Billiau, A., Cassiman, J. J., Mulier, J. C., & De Somer, P. (1978). In vitro cultivation of human tumor tissues II. Morphological and virological characterization of three cell lines. *Oncology*, 35(6), 246-252.
- Horwitz, K. B., Costlow, M. E., & McGuire, W. L. (1975). MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids*, 26(6), 785-795.
- Hu, B., An, H. M., Shen, K. P., Song, H. Y., & Deng, S. (2012). *Polygonum cuspidatum* extract induces anoikis in hepatocarcinoma cells associated with generation of reactive oxygen species and downregulation of focal adhesion kinase. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”. (2014). *Manual de Practicas de Cultivos en Tejidos*. Área de Investigación. Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Instituto Nacional del Cáncer. *Estadísticas. Análisis de la situación del Cáncer en Argentina. Incidencia*. Buenos Aires: Ministerio de Salud Pública, 2012.
- Intisar, A., Zhang, L., Luo, H., Kiazolu, J. B., Zhang, R., & Zhang, W. (2013). Anticancer constituents and cytotoxic activity of methanol-water extract of *Polygonum bistorta* L. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(1), 53-59.
- Keil, DJ, MA Luckow y DJ Pinkava. . “Los estudios cromosómicos en Asteraceae de los Estados Unidos, México, las Antillas y América del Sur”. *Amer. Journal Botanical*. 1988. 75: 652-668.
- Korulkin, D. Y., & Muzychkina, R. A. (2015). Metabolites of *Polygonum* L. Plants Having Antitumor Properties. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 9(7), 705-708.
- Kuete, V., Viertel, K., & Efferth, T. (2013). Antiproliferative potential of African medicinal plants. In *Medicinal Plant Research in Africa* (pp. 711-724). Elsevier.

- Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega,.
- Lajter, I., Zupkó, I., Molnár, J., Jakab, G., Balogh, L., Vasas, A., & Hohmann, J. (2013). Antiproliferative activity of *Polygonaceae* species from the Carpathian Basin against human cancer cell lines. *Phytotherapy Research*, 27(1), 77-85.
- Lamberti, M. J., Pansa, M. F., Vera, R. E., Vittar, N. B. R., & Rivarola, V. A. (2014). Photodynamic therapy potentiates the paracrine endothelial stimulation by colorectal cancer. *Laser Physics*, 24(11), 115602.
- Laza Loaces D., Rodríguez Luis I. y Sardiña Cabrera G. «Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de Plantas Medicinales.» *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2003: 8-(3).
- León, I. E. (2015). Metalofármacos de cobre, platino y vanadio (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).
- Levenson, A. S., & Jordan, V. C. (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer research*, 57(15), 3071-3078.
- Lewin B. 2007. Genes IX. 6 ed. New York: Oxford University. 892pp.
- Lötsch, J., & Geisslinger, G. (2001). Morphine-6-glucuronide. *Clinical pharmacokinetics*, 40(7), 485-499.
- Martínez-Carpio, P. A., Mur, C., Rosel, P., & Navarro, M. A. (1999). Constitutive and regulated secretion of epidermal growth factor and transforming growth factor- β 1 in MDA-MB-231 breast cancer cell line in 11-day cultures. *Cellular signalling*, 11(10), 753-757.
- Martins, L. R. R., Mourão, K. S. M., Albiero, A. L. M., Cortez, D. A. G., Dias-Filho, B. P., & Nakamura, C. V. (2006). Estudo morfoanatômico preliminar do caule e da folha de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze (Asteraceae-Heliantheae). *Rev Bras Farmacogn*, 16, 42-52.
- Matsunaga, K., Saitoh, M., & Ohizumi, Y. (1996). Acanthostrin, a novel antineoplastic cis, cis, cis-germacronalide from *Acanthospermum australe*. *Tetrahedron letters*, 37(9), 1455-1456.
- Matsunaga, K., Saitoh, M., & Ohizumi, Y. (1996). Acanthostrin, a novel antineoplastic cis, cis, cis-germacronalide from *Acanthospermum australe*. *Tetrahedron letters*, 37(9), 1455-1456.
- McDonald F., Ford C.H., Casson A.G. 2004. *Molecular Biology of cancer*. 2^a
- Melo-de-Pinna, G. F. D. (2004). Leaf anatomy of *Richtera Kuntze* (Mutisieae, Asteraceae). *Acta botanica brasiliica*, 18(3), 591-600.

- MELO-DE-PINNA, G. F., & MENEZES, N. L. (2002). Vegetative organ anatomy of *lanthopappus corymbosus* Roque & Hind (Asteraceae-Mutisieae). *Brazilian Journal of Botany*, 25(4), 505-514.
- Metcalf, C. R., & Chalk, L. (1950). *Anatomy of the Dicotyledons*. At The Clarendon Press, Oxford; London.
- Mirandola, L., Justo, G. Z., & Queiroz, M. L. (2002). Modulation by *Acanthospermum australe* extracts of the tumor induced hematopoietic changes in mice. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 24(2), 275-288.
- Mitchell, G., Bartlett, D. W., Fraser, T. E. M., Hawkes, T. R., Holt, D. C., Townson, J. K., & Wichert, R. A. (2001). Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 57(2), 120-128.
- Mohseny A.B., Hogendoorn P.C., Cleton-Jansen A.M. 2012. Osteosarcoma models: from cell lines to zebrafish. *Sarcoma*. 2012:417271. doi:10.1155/2012/417271.
- Mohseny A.B., Machado I., Cai Y., Schaefer K.L., Serra M., Hogendoorn P.C., Llombart-Bosch A., Cleton-Jansen A.M. 2011. Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Lab Invest*. 91: 1195-205.
- Mudry, M. D., & Carballo, M. A. (2006). *Genética Toxicológica, De los Cuatro Vientos Editorial*. Buenos Aires, Argentina.
- Mundy, C., & Kirkpatrick, P. (2004). Tiotropium bromide. *Natural reviews Drug Discovery*, 3 (8), 643-644.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports*, 17(3), 215-234.
- Okouneva, T., Hill, B. T., Wilson, L., & Jordan, M. A. (2003). The Effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics1. *Molecular cancer therapeutics*, 2(5), 427-436.
- Oliveira, F. D., Akisue, G., & Akisue, M. K. (1991). *Farmacognosia*.
- Pansa, M. F., Lamberti, M. J., Cogno, I. S., Correa, S. G., Vittar, N. B. R., & Rivarola, V. A. (2016). Contribution of resident and recruited macrophages to the photodynamic intervention of colorectal tumor microenvironment. *Tumor Biology*, 37(1), 541-552.
- Pastori, T., KUHN, A., Tedesco, M., Hoffmann, C. E., Neves, L. A. S., Canto-Dorow, T. S., & Tedesco, S. B. (2015). Genotoxic and antiproliferative action of *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 17(2), 186-194.

- Pillai Manoharan, K., Yang, D., Hsu, A., & Tan Kwong Huat, B. (2007). Evaluation of *Polygonum bistorta* for anticancer potential using selected cancer cell lines. *Medicinal chemistry*, 3(2), 121-126.
- Pinna, G. F. D. A. M., & Menezes, N. L. D. (2000). Anatomia dos órgãos vegetativos dos gêneros *Richterago* Kuntze e *lanthopappus* (Less.) Roque & DJN Hind (Mutisieae-Asteraceae).
- Prouillet, C., Mazière, J. C., Mazière, C., Wattel, A., Brazier, M., & Kamel, S. (2004). Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochemical Pharmacology*, 67(7), 1307-1313.
- Rank, J., & Nielsen, M. H. (1993). A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*, 118(1), 49-53.
- Rondina, R. V., Bandoni, A. L., & Coussio, J. D. (2008). Especies medicinales argentinas con potencial actividad analgésica. *Dominguezia*, 24(1), 47-69.
- Schlaepfer L, Mendoza-Espinosa JA. Las Plantas Medicinales en la Lucha Contra el Cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2010;41(4):18-27.
- SHIMIZU, M., HORIE, S., ARISAWA, M., HAYASHI, T., SUZUKI, S., YOSHIZAKI, M., ... & UENO, H. (1987). Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. I. Isolation and identification of lens aldose reductase inhibitor from "tapecué," *Acanthospermum australe* OK. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 35(3), 1234-1237.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409-1416.
- TALIB, W., & MAHASNEH, A. (2010). Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Scientia pharmaceutica*, 78(1), 33-46.
- Tariq, A., Sadia, S., Pan, K., Ullah, I., Mussarat, S., Sun, F., ... & Xiong, Q. (2017). A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. *Phytotherapy Research*, 31(2), 202-264.
- Thangiah, A. S., & Ngule, M. C. (2013). Preliminary phytochemical screening of methanolic-aqua extract of *Acanthospermum australe* leaves. *International Journal of Bioassays*, 2(11), 1434-1439.
- Ueda, J. Y., Tezuka, Y., Banskota, A. H., Le Tran, Q., Tran, Q. K., Harimaya, Y., ... & Kadota, S. (2002). Antiproliferative activity of Vietnamese medicinal plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(6), 753-760.

- Valcárcel, M., Arteta, B., Jaureguibeitia, A., Lopategi, A., Martínez, I., Mendoza, L., Muruzabal, F., Salado, C. & Vidal-Vanaclocha, F. (2008). Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *Journal of translational medicine*, 6(1), 57.
- Van Agtmael, M. A., Eggelte, T. A., & van Boxtel, C. J. (1999). Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. *Trends in Pharmacological sciences*, 20(5), 199-205.
- Vera, R. E., Lamberti, M. J., Rivarola, V. A., & Vittar, N. B. R. (2015). Developing strategies to predict photodynamic therapy outcome: the role of melanoma microenvironment. *Tumor Biology*, 36(12), 9127-9136.
- Wagner H, Willer F, Samtleben R, Boos G. Search for the antiprostatic principle of stinging nettle (*Urtica dioica*) roots. *Phytomedicine* 1994; 1: 213-224.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.
- Yu, D., Suzuki, M., Xie, L., Morris-Natschke, S. L., & Lee, K. H. (2003). Recent progress in the development of coumarin derivatives as potent anti-HIV agents. *Medicinal research reviews*, 23(3), 322-345.
- Zarlavsky, G. E. (2014). *Histología Vegetal: técnicas simples y complejas*. Sociedad Argentina de Botánica: Buenos Aires.

7.1- Bibliografía adicional.

- Abu-Dahab, R., & Afifi, F. (2007). Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). *Scientia Pharmaceutica*, 75(3), 121-146.
- Adati, R. T. (2006). *Estudo biofarmacognóstico de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze Asteraceae* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Arunasree, K. M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17(8-9), 581-588.
- Aşkin Çelik, T., & Aslantürk, Ö. S. (2010). Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with *Allium test*. *Journal of BioMed Research*, 2010.
- Ayaz, M., Junaid, M., Ullah, F., Sadiq, A., Khan, M. A., Ahmad, W., ... & Ahmad, S. (2015). Comparative chemical profiling, cholinesterase inhibitions and anti-radicals properties of essential oils from *Polygonum hydropiper* L: A

Preliminary anti-Alzheimer's study. *Lipids in health and disease*, 14(1), 141.

Ayaz, M., Junaid, M., Ullah, F., Sadiq, A., Subhan, F., Khan, M. A., ... & Ahmad, S. (2016). Molecularly characterized solvent extracts and saponins from *Polygonum hydropiper* L. show high anti-angiogenic, anti-tumor, brine shrimp, and fibroblast NIH/3T3 cell line cytotoxicity. *Frontiers in pharmacology*, 7, 74.

Bouyahya, A., Bakri, Y., Khay, E. O., Edaoudi, F., Talbaoui, A., Et-Touys, A., ... & Dakka, N. (2017). Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: a review. *Asian Pac J Trop Dis*, 7(1), 57-64.

Cano., M. 2002, Alteraciones De Los Índices De Fases Y Mitótico En Meristemos De *Allium Cepa*, Inducidas Por Extractos De *Lepidium meyenii* Walp "Maca" Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma.

Chen, H. S., Liu, Y., Lin, L. Q., Zhao, J. L., Zhang, C. P., Jin, J. C., ... & Shen, B. Z. (2011). Anti-proliferative effect of an extract of the root of *Polygonum multiflorum* Thunb. on MCF-7 human breast cancer cells and the possible mechanisms. *Molecular medicine reports*, 4(6), 1313-1319.

David Amiel Peña y José Amiel Pérez. Metodologías utilizadas en la investigación de plantas antitumorales: descripción y comentarios.

Fiskesjö, G. (1993). *Allium test* I: a 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 8, 461-470

Flora of North América. (FNA) Vol. 21 : 37-38.

Freyre, S; Estrada, M.; Bolaños, H. (2009). Estudio preliminar de la citotoxicidad y la genotoxicidad de un extracto de origen vegetal conocido como palmo rosado en células meristemáticas de *Allium cepa*. ISSN 0124-4361 / Vol. 5 /Nº 12.

Friedman M, Brandon DL. Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. *J Agric Food Chem*. 2001;49(3):1069-1086.

Ghazali, M., Alfazari, M., Al-Naqeb, G., Krishnan Selvarajan, K., Hazizul Hasan, M., & Adam, A. (2014). Apoptosis induction by *Polygonum minus* is related to antioxidant capacity, alterations in expression of apoptotic-related genes, and S-phase cell cycle arrest in HepG2 cell line. *BioMed research international*, 2014.

Greenwell, M., & Rahman, P. K. S. M. (2015). Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 6(10), 4103.

- Helman J. Farmacotecnia. Teoría y Práctica. Ed. Continental. México. 1980; T.III. Cap.3.
- Husein, A. I., Ali-Shtayeh, M. S., Jondi, W. J., Zatar, N. A. A., Abu-Reidah, I. M., & Jamous, R. M. (2014). In vitro antioxidant and antitumor activities of six selected plants used in the Traditional Arabic Palestinian herbal medicine. *Pharmaceutical biology*, 52(10), 1249-1255.
- J-A Shin, J-H Shim, J-G Jeon, K-H Choi, E-S Choi, N-P Cho and S-D Cho. Apoptotic effect of *Polygonum Cuspidatum* in oral cancer cells through the regulation of specificity protein 1. *Oral Diseases* Volume 17, Issue 2, pages 162–170, March 2011.
- Jaimes, G *et. al.* (2006). Principio activo citotoxico de *Espeletia killipii* Cuatr. sobre células tumorales y su toxicidad frente a células normales humanas. *Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(2): 140-145.
- Kennedy AR. The Evidence for Soybean Products as Cancer Preventive Agents. *J Nutr.* 1995;125(3):733S-743S.
- Lee, K. H. (1999). Novel antitumor agents from higher plants. *Medicinal research reviews*, 19(6), 569-596.
- López-Sáez JF & Fernández E. 1965. Mitotic partial index and phase indices. *Experientia* 21: 591-592.
- Machado-Santelli GM. 2000. Cell cycle progression in normal and tumoral cell cultures. *BIOCELL*: 25 abst. S1
- Malkowicz SB, Mckenna WG, Vaughn DJ, Wan XS, Propert KJ, Rockwell K, Marks SH y cols. Effects of Bowman-Birk Inhibitor Concentrate (BBIC) in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia. *Prostate*. 2001;48:16-28.
- Márquez, A., Borri, K., Dobrecky, J., Gurni, A.A. and Wagner, M.L. (1999). New aspects in quality control of "paloamargo" (*Aeschrium crenata* Vell. - Simaroubaceae-). *Acta Hort.* 503, 111-115.
- Muñoz-Solarte, D. M., & Guerrero-Pepinosa, N. (2013). *Allium test* para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de *Allium cepa*. *Memorias*, 11(19), 83-86.
- Okano, M., Fukumiya, N., Aratani, T., Juichi, M. and Lee, K. (1974). Antitumor agents, 74. Bruceanol-A and -B, two new antileukemic quassinoids from *Brucea antidysenterica*. *Journal of Natural Products*, 48 (6), 972-975.
- Oyedare BM, Bakare, AA, Akinboro A. Genotoxicity assessment of water extracts of *Ocimum gratissimum*, *Morinda lucida* and *Citrus medica* using the *Allium cepa* assay *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2009; 8. ISSN 0717-7917.

- Patel, P. R., Raval, B. P., Karanth, H. A., & Patel, V. R. (2010). Potent antitumor activity of *Rubia cordifolia*. *International Journal of Phytomedicine*, 2(1).
- Pezzuto, J. M. (1997). Plant-derived anticancer agents. *Biochemical pharmacology*, 53(2), 121-133.
- Polonsky, J., Bhatnagar, S. and Moretti, C. (1984). 15-deacetylsergeolide, a potent antileukemic quassinoid from *Picrolemma pseudo coffea*. *Journal of Natural Products*. 47 (6), 994-996.
- Pratumvinit, B., Srisapoomi, T., Worawattananon, P., Opartkiattikul, N., Jiratchariyakul, W., & Kummalue, T. (2009). In vitro antineoplastic effect of *Ficus hispida* L. plant against breast cancer cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(4), 255-261.
- Quires C, Epperson A., Hu J., Holle M.: Physiological studies and determination of chromosome number in Maca, *Lepidium meyenii*, *Economic Botany* 1996, 50: 216-223.
- Ragonese, A.E. y Milano, V.A. (1984). Vegetales y sustancias tóxicas de la flora argentina. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, 2da. Edición, Tomo II, Fascículo 8-2. Editorial ACME S.A.C.I., Buenos Aires, 190.
- Sánchez, E. and Comin, J. (1971). Two new 2-carbolide alkaloids from *Aescchrion crenata*. *Phytochemistry*, 10 (9), 2155-2159.
- Shilpa Satheesh L, Murugan K. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2011;49:366-374.
- Siriwatanametanon, N., Fiebich, B. L., Efferth, T., Prieto, J. M., & Heinrich, M. (2010). Traditionally used Thai medicinal plants: in vitro anti-inflammatory, anticancer and antioxidant activities. *Journal of ethnopharmacology*, 130(2), 196-207.
- Stoll, G. (1989). *Protección natural de cultivos en las zonas tropicales*. Editorial Científica Josef Margraf, Berlin. 184 pp.
- Tauchert M., Efficacy and safety of *Crataegus* extract WS 1442 in comparison to placebo in patients with chronic stebel heart insufficiency at NYHA III. *Am Heart Journal* 2002; 143 (5): 910-915.
- Tao, J., Wei, Y., & Hu, T. (2015). Flavonoids of *Polygonum hydropiper* L. attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury via suppressing phosphorylation in MAPKs pathways. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 25.
- Toursarkissian, M. (1980). *Plantas Medicinales de la Argentina. Sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica*. Editorial Sur, Buenos Aires.

- Varma, A., Padh, H., & Shrivastava, N. (2009). Andrographolide: a new plant-derived antineoplastic entity on horizon. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 95.
- Vitagliano, J.C. and Comin, J. (1972). Quassinoids from *Aeschrion crenata*. Phytochemistry 11 (2), 807-810.
- Wei Peng, Rongxin Qin, Xiaoli Li, Hong Zhou Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb.et Zucc.: A review. Journal of Ethnopharmacology. Volume 148, Issue 3, 30 July 2013, Pages 729–745.
- Wong JH, Ng TB. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2006;38(2):234–243.
- Ye XJ, Ng TB. Antitumor and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activities of a Hemagglutinin and a Protease Inhibitor from Mini-Black Soybean. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011;ID 851396. doi:10.1155/2011/851396.
- Yuet Ping, K., Darah, I., Yusuf, U. K., Yeng, C., & Sasidharan, S. (2012). Genotoxicity of Euphorbia hirta: an *Allium cepa* assay. Molecules, 17(7), 7782-7791.
- Zhao, S. M., Kuang, B., Fan, J. T., Yan, H., Xu, W. Y., & Tan, N. H. (2011). Antitumor cyclic hexapeptides from Rubia plants: history, chemistry, and mechanism (2005–2011). CHIMIA International Journal for Chemistry, 65(12), 952-956.

7.2.- Publicaciones surgidas del presente trabajo.

- Altamirano, C. G., & Yajía, M. E. (2017). "Improntas" reveladora de caracteres micrográficos epidérmicos con aplicación en el control de calidad de plantas medicinales. Dominguezia, 33(2), 33-36. <http://www.dominguezia.org/volumen/articulos/33203.pdf>
- XII Simposio Argentino de Farmacobotanica y I Jornada de la enseñanza de la Farmacobotanica. Dominguezia, 33(1). Libro de resúmenes. <http://www.dominguezia.org/volumen/articulos/3310.pdf>
- Altamirano C. G. "Evaluacion de la Genotoxicidad y Toxicidad general de extractos acuosos de *Acanthospermum australe* Loeßl. Kuntze (Asteraceae)". Artículo en revisión. Revista Dominguezia, 2019.
- Florentin, A.; Altamirano C., G. (2019). Evaluation of the genotoxicity of aqueous extracts of leaves and stems of *Dolichandra unguis-cati* (L.)

L.G. Lohmann (Bignoniaceae) using the *Allium cepa* test. Pharm
Pharmacol Int J. 2019;7(4):171–173.
<https://medcraveonline.com/PPIJ/PPIJ-07-00248.pdf>

Altamirano C. G., Aguilar Pozzer, M., J., Rebatta, J., Semckzuk, R. "Evaluación de la genotoxicidad de extractos acuosos de *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae)". Artículo en revisión, REVISTA FITOS. Rio de Janeiro Brasil. 2019