

RIESGOS Y BENEFICIOS EN EL CONSUMO DE PLANTAS MEDICINALES

MEDICINAL HERBS: RISKS AND BENEFITS IN THEIR USES

MARTA ANA CARBALLO, C.M. CORTADA, A.B. GADANO

CIGETOX - Citogenética Humana y Genética Toxicológica. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB). Universidad de Buenos Aires. Argentina.
Autor para correspondencia: Marta Ana Carballo, CIGETOX - Citogenética Humana y Genética Toxicológica. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB). UBA. Junín 956 (1113). Buenos Aires. Argentina. Tel: (++5411) 5950-8707. Fax: (++5411) 5950-8694. e-mail: macarballo2003@yahoo.com.ar

RESUMEN

En los últimos años se ha vuelto a las plantas en busca de nuevos principios activos, ya que desde el comienzo de la medicina fueron ellas las que proveyeron las estructuras bases para numerosos medicamentos. Entre los principios activos de origen vegetal más utilizados en terapéutica se pueden citar *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae); *Lithraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae); *Styphnolobium japonicum* L Schott. (Fabaceae); *Prosopis alba* Gris (Mimosaceae); *Schkuhria pinnata* (Lam.) (Asteraceae); *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Solanaceae). En el presente trabajo se propone realizar un relevamiento de las hierbas medicinales, así como un screening a nivel genotóxico mediante el ensayo de Electroforesis de una sola Célula en las plantas mencionadas. En el *screening* realizado en este grupo de plantas medicinales argentinas, se determinó que cuatro de ellas, *Chenopodium multifidum* (paico); *Schkuhria pinnata* (canchalagua), *Solanum sisymbriifolium* (espino colorado) y *Lithraea molleoides* (Molle de beber), indujeron daño al ADN, induciendo roturas de cadena simple y doble. De esta forma se verifica la necesidad de regulación en el consumo masivo e indiscriminado de las plantas medicinales.

PALABRAS CLAVES: Plantas medicinales, etnomedicina, genotoxicidad, ensayo del cometa.

ABSTRACT

Herbal medicines have become a popular form of therapy. Patients who self-medicate with herbs for preventive and therapeutic purposes may assume that these products are safe because they are "natural", but some of their components can cause adverse effects or have the potential to interact with other drugs. Some common herbs in traditional Argentine medicine are: *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae); *Lithraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae); *Styphnolobium japonicum* L Schott. (Fabaceae); *Prosopis alba* Gris (Mimosaceae); *Schkuhria pinnata* (Lam.) (Asteraceae); *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Solanaceae).

In this review, we present the data obtained in the evaluation of the potential genotoxic effects of aqueous extracts by the Single Cell Gel Electrophoresis as a screening test. Our results show that four of the six plants evaluated induced double and single strand breaks in DNA. The ones that interact with the genetic material were: *Chenopodium multifidum* ("paico"); *Schkuhria pinnata* ("canchalagua"), *Solanum sisymbriifolium* ("espino colorado") and *Lithraea molleoides* ("Molle de beber"). Indiscriminate consumption of medicinal plants is not innocuous and their regulation is necessary.

KEYWORDS: Medicinal Herbs; Ethno-medicine: Geno-toxicity; Comet Assay.

Recepción: 06/05/05. Revisión: 25/08/05. Aprobación: 20/10/05.

1. RESEÑA HISTÓRICA

El uso de las plantas en medicina tiene una historia honorable, ya que en determinados momentos todos los medicamentos se obtenían de fuentes naturales. Este evento dio lugar al establecimiento de una relación muy cercana y productiva entre el hombre y su medio vegetal.

Los primeros herbolarios datan de la época de los asirios, los babilonios y los fenicios y constituyen una recopilación de los conocimientos de la época sobre las propiedades curativas de las plantas, comenzando la historia de la fitoterapia. Desde el año 3.000 a.C. hasta nuestros días, hay numerosas referencias y escritos como el famoso papiro egipcio de Ebers (cerca de 1.500 a.C.) que contiene muchas preparaciones medicamentosas a base de vegetales (Pahlov, 1979).

Homero, en una de sus obras, alaba la inmensa riqueza de las plantas de Egipto. En uno de sus relatos cuenta cómo Helena vierte en un tazón un jugo estimulante que da de beber a Telémaco, entristecido por los recuerdos de su padre. Describe la droga de forma tal que la podemos identificar con el jugo de la adormidera, planta de la que se obtiene el opio. En otros datos curiosos se sabe que Cleopatra utilizaba aloe barbado para potenciar su belleza, y hoy esta planta se ha revelado como el tratamiento adecuado para las quemaduras por radiación (Poletti, 1979).

La mayoría de las medicinas del reino vegetal que ahora usamos no fueron descubiertas por las ciencias de las sociedades modernas, sino por pruebas de ensayo y error practicadas durante milenios, por diferentes culturas. La arqueología nos informa que algunas de las drogas actuales más preciadas son herencia del pasado oscuro de la prehistoria.

Muchas de las plantas alimenticias eran conocidas también por sus propiedades medicinales y, al mismo tiempo, existían otras cuyos atributos terapéuticos las colocaban en gran estima. Los chamanes (profesionales

más antiguos de la evolución social) poseían el conocimiento milenario de diversas plantas psicotrópicas, algunas estimulantes como la coca o el tabaco; otras alucinógenas como el yagé o el yopo. Estas plantas se utilizaban para producir o acelerar los estados alternos de conciencia, por los cuales se puede curar y establecer contacto con el mundo sobrenatural (Font y Quer, 1983).

La medicina tradicional incluye tres tipos de personal (Gadano *et al.*, 2004):

- *Curanderos*. Estos individuos tienden a especializarse en el cuidado de un grupo de enfermedades, tales como el empacho (considerado como el agente causal de trastornos en el tracto digestivo), el mal aire (considerado como agente causal de muchos trastornos respiratorios) y el mal de ojo (considerado como la fuente de los trastornos que afectan a los niños). Entre éstos, se incluye también a los individuos que manejan información sobre laxantes y plantas abortivas.
- *Herboristas*. Proveen muchos de los materiales usados en la medicina tradicional. Se puede aclarar que ciertos curanderos actúan también como herboristas. En estos individuos se concentra el conocimiento sobre los posibles usos de las hierbas, así como sus efectos nocivos, siendo los encargados de proveerlas a la población.
- *Brujos*. Su relación con la salud en la comunidad es algunas veces tangencial, y en muchas comunidades son vistos como causantes de enfermedades y no como benefactores. No obstante, en algunos casos son consultados con la finalidad de desterrar hechizos que habrían sido llevados a cabo por colegas malignos.

Teniendo en cuenta el uso de las plantas medicinales, podemos decir que existen cuatro tipos generales de medicina. Ellas son: asiática, europea, indígena y neo-occidental. Tanto la asiática como la europea datan

de miles de años, se encuentran en la farmacopea y son por lo tanto más conocidas; en el caso de la indígena es distinto, ya que es transmitida oralmente (DeSmet, 1992).

En Asia las herboristerías más sistematizadas son las de India, China y Japón. Éstas siguen aún las ideas de diagnóstico y tratamiento utilizadas por milenios (Kanba *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1998). La mayoría de los remedios que se preparan son mezclas de plantas que contienen en algunos casos también partes de animales y minerales. Ha sido descrito que las formulaciones existentes contienen sustituyentes de los productos naturales, como ser sustancias tóxicas de origen vegetal, fármacos y metales pesados (Ko, 1998; Drew y Myers, 1997).

El desarrollo histórico de la herboristería europea llevó, a partir del siglo XIX, a la incorporación de las plantas a las farmacopeas de alopatía, naturopatía u homeopatía, y las bases de su acción terapéutica fueron estudiadas por químicos medicinales y farmacéuticos (De Smet, 1993 y 1997).

La herboristería indígena es muy diversa y se practica aún en sitios donde dichas culturas se encuentran intactas, sin embargo se halla en continua evolución debido al contacto con otras culturas aledañas. El conocimiento se puede encontrar en este caso acotado a los sanadores tradicionales o puede ser generalizado y con respecto a la formulación, existen variaciones regionales, las plantas seleccionadas pueden ser específicas, genéricas o inadvertidamente adulteradas. Usualmente, cuando una medicina es difundida como eficiente y segura, suele existir una base terapéutica aún no conocida detrás (Elvin-Lewis, 2001).

En cuanto a la herboristería neo-occidental, utiliza preparaciones de plantas únicas o mezclas, en variadas combinaciones, que han sido seleccionadas de formulaciones que se encuentran en antiguas farmacopeas o plantas medicinales de otras culturas, como por ejemplo la indígena. Pueden obtenerse tam-

bién formulaciones novedosas que no presentan fundamento en datos provenientes de herboristerías tradicionales, o representan una mezcla de plantas utilizadas en distintas medicinas alternativas (DeSmet, 1995).

El incremento en el uso de productos farmacéuticos ha dado por resultado la disminución del consumo de preparados tradicionales de la medicina popular. Sin embargo, en algunas áreas rurales, la medicina tradicional es aún utilizada en igual o mayor medida que las formulaciones farmacéuticas, y en algunos casos, como en las enfermedades menores, los tratamientos tradicionales sustituyen a la medicina académica.

En la actualidad hay individuos que prefieren llevar personalmente el control de su salud, no sólo en la prevención de enfermedades, sino también en el tratamiento de las mismas (fallas en los tratamientos alopáticos y efectos colaterales severos provocados por los mismos). Este comportamiento se presenta fundamentalmente en gran variedad de enfermedades crónicas, sin cura (cáncer, diabetes, artritis, entre otras) o enfermedades agudas que se tratan fácilmente en forma hogareña (resfrío, gripe) (Kincheloe, 1997). Se hace evidente que no han sido advertidos de los potenciales riesgos asociados al uso de hierbas o de las limitaciones en el diagnóstico (Shaw *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 1999).

2. ETNOMEDICINA

A pesar de los siglos de tradición, la fitoterapia –del griego *phyton* (planta), tratamiento de las enfermedades por plantas frescas, secas o sus extractos– ha evolucionado y ha ganado prestigio y eficacia, sobre todo en los últimos tiempos, acercándose cada vez más a las normas y usos que exige la medicina moderna (Poletti, 1979).

Como resultado de ello, actualmente se posee un mejor conocimiento de las propie-

dades medicinales, se ha incrementado su número, se han desentrañado científicamente secretos de sus principios activos y se han descrito con más precisión sus propiedades, contraindicaciones y efectos secundarios, lo que ha redundado en una más correcta sistematización de su uso y posología (Pahlov, 1979).

Debido a la mayor información sobre el potencial terapéutico del reino vegetal, se ha desarrollado la investigación de nuevos preparados obtenidos a partir de plantas en los que la selección de sus ingredientes se realiza en laboratorios. Esto ha significado el nacimiento de la nueva fitoterapia, en que la preparación y validación de las formulaciones a base de diversas especies vegetales las realizan profesionales especializados, capaces de satisfacer las necesidades que el usuario de la fitoterapia reclama en aspectos importantes como la prevención y la salud (Font y Quer, 1983).

Un relevamiento de datos sobre el uso de medicinas alternativas realizado en los Estados Unidos entre 1990 y 1997 mostró que al menos un tercio de los pacientes usaba terapias no convencionales, y la mayoría las utilizaba en el tratamiento de patologías crónicas (Eisenberg *et al.*, 1997). A su vez, muchas hierbas medicinales son utilizadas con fines profilácticos para mantener o favorecer un estado de buena salud, o prevenir la ocurrencia de ciertas patologías. Muchas de estas hierbas son conocidas popularmente y promocionadas como seguras y eficaces. Debido a ello, no siempre es fácil entender, para los consumidores crónicos, el porqué estas prácticas pueden ser riesgosas.

La creencia del beneficio del uso de la herboristería por sobre las drogas que contienen un único ingrediente activo se suscribe a la noción que los compuestos activos primarios de las hierbas son sinergizados por compuestos secundarios, mientras que éstos mitigan simultáneamente los efectos colate-

rales producidos por los compuestos primarios (McPartland y Pruitt, 1999). Se presume también que la combinación de extractos de diferentes plantas podría prevenir el decaimiento gradual de la eficiencia que se observa en el uso de drogas únicas dadas durante largos períodos (Borchers *et al.*, 1997).

Los eventos dañinos farmacológicamente predecibles son, generalmente, dosis dependientes, y por tanto previsibles disminuyendo la dosis, o suspendiéndose el consumo en caso de presentar alergia. A su vez, el consumo crónico puede traer efectos retardados como carcinogénesis o teratogénesis. Los usuarios de preparados realizados con plantas medicinales deben considerar que estas medicinas son usualmente formuladas con materiales sin tratamiento (crudos), los cuales pueden contener un amplio rango de sustancias que pueden modificar sus características farmacocinéticas y farmacognósicas (Elvin-Lewis, 2001).

En las distintas regiones donde se utilizan estas preparaciones se busca establecer modos de control para disminuir los riesgos del consumo, al mismo tiempo que explicitar científicamente sus acciones terapéuticas. En algunas regiones (Asia) existe una gran dificultad para evitar la incorporación de hierbas potencialmente tóxicas o metales pesados, ya que no son considerados dañinos en el sitio de origen (Shaw *et al.*, 1997). En Europa, Alemania es líder en el proceso de regulación racional de las plantas medicinales (Benzi y Ceci, 1997) y Estados Unidos clasificó a varias plantas medicinales bajo el rótulo de "suplementos dietarios" (Murphy, 1999), quedando de este modo fuera de la evaluación de la FDA (Food and Drug Administration).

Las plantas contienen elementos activos que las protegen de los insectos, mohos y otros parásitos, así como de los rayos ultravioleta del sol. Muchos de estos componentes –ya sea de forma individual o en diferen-

tes combinaciones– poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el hombre (Wills *et al.*, 2000).

Estos principios son vitaminas, minerales, carbohidratos, microelementos y agentes curativos específicos, que ayudan al cuerpo en su lucha contra la infección. Las hierbas se usan mucho para aliviar la enfermedad e impedir que ésta vuelva. Desintoxican el organismo y apoyan al sistema inmunológico, ayudándole a mantener el equilibrio (Font y Quer, 1983).

Entre los principios vegetales más usados en terapéutica podemos citar: Las hormonas esteroides (progestágenos, corticosteroides, estrógenos y agentes anabólicos); atropina y efedrina y sus derivados semisintéticos; morfina y derivados hipnoanalgésicos; podofilotoxina y su derivado etopóxido; vincristina, vinblastina y taxol (anticancerígenos); derivados flavonoides del *Ginkgo biloba* (activador cerebral); *Ginseng*.

3. GENÉTICA TOXICOLÓGICA

Generalmente, la actividad farmacológica de las hierbas medicinales se asocia a la toxicidad de las mismas y el efecto tóxico inducido depende de la dosis consumida. Por esto resulta importante estudiar las plantas tóxicas como fuente de productos activos.

Una de las formas de evaluación de toxicidad está dada por su efecto sobre el patrimonio genético, nivel de análisis propio de la “genética toxicológica”, disciplina cuyos objetivos principales son, entre otros:

- Implementar ensayos y métodos para la evaluación del riesgo producido por agentes que se encuentran en el medio ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad del patrimonio genético.
- Elucidar la relación entre genotoxicidad e iniciación de un proceso neoplásico.

Para ello debe valerse de los denominados marcadores biológicos o biomarcadores que indican: exposición a sustancias tóxicas (en los planos molecular o celular), efectos adversos en la salud o susceptibilidad a distintos agentes. Estos biomarcadores representan cambios en el organismo, o en la célula, que pueden ser cuantificados en diferentes sistemas biológicos (NRC, 1987; NCR, 1991; Wogan, 1992). Se considera que un marcador de efecto biológico representa un evento que puede correlacionarse con el daño a la salud y tiene posibilidad predictiva (NCR, 1991).

Los compuestos químicos pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN, produciendo cambios que afectan el funcionamiento celular y que a largo plazo causan trastornos en la salud, particularmente transformaciones malignas. De ahí la importancia de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético mediante biomarcadores de efecto. Con este fin se utilizan determinaciones tales como las Aberraciones Cromosómicas (AC) (Preston *et al.*, 1981; Au *et al.*, 1998), el Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) (Taylor, 1958; Wolf *et al.*, 1974; Bender *et al.*, 1974; Painter, 1980; Shafer, 1982), Micronúcleos (Au *et al.*, 1998), Mutaciones Génicas a nivel del locus HPRT (Au *et al.*, 1998; Albertini *et al.*, 1998), síntesis de ADN no programada y electroforesis de una sola célula (ensayo del cometa) (Ashby, 1988; Carrano y Natarajan, 1988; Wogan, 1992), entre otros.

En estudios de genotoxicidad las técnicas de elección deben ser capaces de detectar tanto el daño como la reparación consecuente al material genético en células individuales. Uno de los ensayos que cumple con esta premisa es la electroforesis de una sola célula o ensayo del cometa.

3.1. Electroforesis de células individuales

Uno de los ensayos útiles para la detección de daño de simple y de doble cadena al ADN es la electroforesis de una sola célula (ensayo del cometa), que evalúa los niveles de daño y reparación al ADN en poblaciones celulares, sin la necesidad de trabajar con células en proliferación. Es un sistema potencialmente sensible para evidenciar la inducción de daño genético. Una gran ventaja de este método es la posibilidad de obtener información del daño inducido a células individuales. La mayoría de los métodos usados comúnmente para detectar el daño al material genético son capaces de dar una respuesta promedio. Mientras que, en poblaciones celulares heterogéneas, los valores promedios no son de utilidad para describir el efecto de una sustancia determinada. Esto es especialmente cierto en casos donde se encuentra diferente susceptibilidad en la respuesta a una droga (Angelis *et al.*, 1999).

El fundamento de la técnica consiste en lisis de las células de interés, embebidas en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, por medio de detergentes y altas concentraciones de sal. Posteriormente, el ADN liberado será sometido a la acción de un campo eléctrico a pH neutro (Östling y Johanson, 1984). En las células en las que exista incremento del daño al ADN se formarán pequeños fragmentos, los que, al someterse a una corriente eléctrica, tendrán la propiedad de penetrar en la malla de agarosa migrando, de esta manera, hacia el ánodo.

La capacidad del ADN de migrar hacia el ánodo dependerá del tamaño de los fragmentos generados por la lesión. Por medio de la coloración con bromuro de etidio (colorante con afinidad por el ADN), darán la imagen de pequeños cometas. El largo del cometa se incrementa con el daño inducido a la doble hélice del ADN.

El ensayo de electroforesis de una sola célula en condiciones alcalinas es una herra-

mienta muy promisoriosa en el estudio de daño inducido al ADN por agentes químicos en células de mamíferos (Singh *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 1989; Tice *et al.*, 2000; Fairbairn *et al.*, 1993). Se asume que la electroforesis en condiciones alcalinas detecta tanto roturas de cadena doble y simple, aunque la naturaleza y el mecanismo del ensayo no se encuentra totalmente clarificado (Collins, 1992). Diversos grupos de investigación han evaluado el ensayo de electroforesis de una sola célula, en muestras de linfocitos de poblaciones expuestas, utilizándolo como método de screening. Los estudios revelaron una considerable variación intra-individual. Esto se debe a la extremada sensibilidad de los linfocitos y sugiere una dificultad en la utilización de ADN proveniente de los mismos para la realización de biomonitoreos de poblaciones expuestas (Ross *et al.*, 1995).

El interés en el ensayo del cometa se ha incrementado notablemente en los últimos años, debido a que ha demostrado ser un método extremadamente sensible en la detección del daño al ADN a nivel celular. Este ensayo está siendo considerado por la literatura como un método rápido, para predecir el daño genotóxico de un agente en diseños experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Fairbairn, 1995; Monteith y Vanstone, 1995).

4. ETNOMEDICINA EN LA REPÚBLICA ARGENTINA

En la República Argentina existen más de 2.000 especies vegetales autóctonas que son utilizadas regionalmente como medicinales y que aún no han sido estudiadas científicamente. Las dos formas principales de consumo por la población de las plantas medicinales son: cocimiento e infusión. Ambas consisten en extracciones acuosas de los principios activos presentes en las plantas, radicando la diferencia entre ambos que en el caso del cocimiento se realiza una cocción,

mientras que en la infusión se adiciona agua en ebullición.

Entre las plantas medicinales argentinas de reconocida actividad farmacológica, podemos citar a las siguientes: *Chenopodium multifidum* L.; *Chenopodium ambrosioides* L.; *Lithraea molleoides*; *Stybnolobium japonicum*; *Schkhuria pinnata*; *Prosopis alba*; *Solanum sysimbriifolium*.

Chenopodium ambrosioides L. var. *anthelminticum* y el *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae) son un claro ejemplo de plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional, no sólo en nuestro país sino también en el resto de Latinoamérica. El nombre vulgar de estas hierbas es Paico (Argentina), Pazote, Apazote o Epazote (México) y Santa María (Brasil). Crecen en forma salvaje desde México, extendiéndose por toda América del Sur, hasta el sur de nuestro país.

En la literatura se encuentran referencias a los usos farmacológicos del Paico desde 1571, cuando Francisco Hernández refiere que el cocimiento de las raíces “*contiene las disenterías, quita las inflamaciones y arroja del vientre los animales nocivos*” (Hernández, 1571). Recién en 1712 Esteyneffer señaló la utilidad del “Apazote” o “Épazote” (Paico) en el tratamiento del resfrío, dolor de cabeza y reumatismo. Cabe aclarar que en la actualidad se siguen fabricando supositorios caseros, elaborados con jabón y hojas de Paico, con la finalidad de favorecer la evacuación intestinal (Ysunza, 1976).

Los principales usos folclóricos del Paico son como nervativo, antirreumático, antihelmíntico, sedante y agente analgésico (Okuyama *et al.*, 1993). También se han descripto sus propiedades como agente fungicida (Kishore *et al.*, 1993), laxante, abortivo y fundamentalmente como antihelmíntico (Auro de Ocampo y Jiménez, 1993; Riley, 1993). Entre las propiedades farmacológicas de la planta entera se ha descripto su utilidad para el tratamiento de parasitosis

en peces (Auro de Ocampo y Jiménez, 1993), así como el uso en el tratamiento de leishmaniasis cutáneas en la población rural de Brasil (Franca *et al.*, 1996).

El *Ch. ambrosioides* es una hierba aromática, anual o perenne, erguida o ascendente, fuertemente olorosa, de 40 cm a 1 mt de alto. El tallo puede ser simple o ramificado con hojas pecioladas, oblongas y lanceoladas de 3 a 10 cm. de largo por 1 a 5 cm de ancho. La inflorescencia es en forma de espigas con numerosas flores, dispuestas en panícula piramidal, con o sin hojas interpuestas. Es oriunda de América y ha sido utilizada con fines médicos y alimenticios por siglos por las diferentes culturas precolombinas (Viesca, 1984; Estrella, 1988; Girault, 1987). Ya en 1654 Cobo describió su aplicación en el tratamiento de cualquier tipo de tumor, aplicando las hojas en forma de emplasto. Por otro lado, se ha descripto que el cocimiento de Paico con mucha sal provocaría la desinflamación de las piernas en procesos gotosos (Girault, 1987).

El uso de *Ch. ambrosioides* var. *anthelminticum* es oficial en varios países del mundo. En los Estados Unidos estuvo incluido en la farmacopea hasta 1947 y en Francia fue introducido en el Codex Medicamentario en 1949 (Pousset, 1989). En la actualidad se encuentra en las farmacopeas de numerosos países, *verbigratia*: España, México, Portugal, Argentina, India, Italia y Turquía (Martindale, 1982).

Ch. multifidum es una hierba aromática, perenne, pubescente con hojas alternas, cortamente pecioladas, pinatisectas, las inferiores más largas que las superiores, de 4 cm de largo y hasta 1,5 cm de ancho. Generalmente después de fructificar, las ramas continúan creciendo y producen hojas espatuladas enteras. Las flores son muy pequeñas y se disponen en glomérulos sésiles, en las axilas de las hojas. El fruto encerrado totalmente por el cáliz es lenticular, blanco amarillento, con pelos vesiculosos adpresos,

cilíndricos amarillos y la semilla, vertical, es de color castaño brillante (Giusti, 1967; Gupta, 1995). Crece fundamentalmente en América del Sur, y se ha descrito distribuida biogeográficamente en Perú, Chile y Brasil a la Argentina, extendiéndose por toda la zona templada al norte de la provincia de Chubut, es una planta muy común de encontrar en suelos modificados (Gupta, 1995).

Lithraea molleoides Vell. Engl. (Anacardiaceae) (nombre vulgar: Molle de beber) es un árbol polígamo de follaje persistente y denso, con copa semiesférica o globosa, frondosa, cuya alzada oscila generalmente entre 5 y 8 m, excepcionalmente 12, de tronco entre 10 y 30 cm de diámetro, ramas delgadas, corteza persistente, ramas nuevas algo pubescentes. Hojas compuestas y alternas, color verde amarillento. Flores pequeñas, blanquecinas agrupadas en panojas axilares de 4 a 7 cm de largo (Toursarkissian, 1980). El molle de beber es una especie típica del monte serrano. Abunda a orillas de bosques, así como en el monte de las sierras, donde se distingue desde lejos por el tono bronceado de su copa, y puede ser considerado como figura importante de la flora serrana de Córdoba.

Hieronymus, G. (1882) sostiene que las hojas se usan como el té para el resfriado y también se le atribuyen propiedades venenosas. Los datos de la literatura establecen que la planta contiene una resina aromática, un aceite esencial y un principio oleoso con propiedades irritantes que aplicadas sobre la piel, determinan una erupción eczematosa acompañada a veces de fenómenos febriles (Domínguez, 1928). Sola (1942) refiere otro uso etnomédico de la planta reemplazando el azúcar del mate por algunas semillas de Molle, las cuales, según dicen, mejoran el gusto de la infusión. En medicina doméstica se emplea el cocimiento de cogollos para combatir las inflamaciones de las vías respiratorias y digestivas, proviniendo de tal uso el nombre común de “molle

de beber” o “molle de tomar”. Se asegura que el follaje de esta planta destila una fina lluvia, la cual determina una erupción que los naturales serranos conocen por “flechaduras”.

El origen de *Styphnolobium japonicum* L. Schott (Fabaceae) es en China y Corea, la planta posee un follaje caduco, tiene valor ornamental y se la utiliza en el arbolado urbano. El uso etnofarmacológico de esta planta es como antimicrobiano de uso externo.

La *Schkuhria pinnata* (Lam.) O.K. (Asteraceae); (Nombre vulgar: Canchalagua) es una herbácea anual de hasta 75 cm de altura. A nivel etnomédico se la utiliza en trastornos digestivos. Esta especie crece en sitios perturbados, como arvense y ruderal, en lugares donde la vegetación original ha sido derribada.

4.1. Screening genotóxico: Metodología

Tal como fuera mencionado con anterioridad, una de las metodologías de elección para realizar un screening de genotoxicidad es el ensayo de cometa (Singh *et al.*, 1988). Esta técnica utiliza como soporte portaobjetos, los cuales son cubiertos por una fina capa de 100 ml de agarosa de punto de fusión normal al 0,5% disuelta en buffer fosfato libre de calcio y magnesio. Posteriormente los preparados son cubiertos con cubreobjetos y llevados durante 10 minutos a 4°C hasta lograr la solidificación de la agarosa.

Para su desarrollo se toman alícuotas de células control y tratadas con la droga en estudio y se suspenden en buffer fosfato y agarosa de bajo punto de fusión al 0,5%. Posteriormente, se remueve el cubreobjeto y se coloca la suspensión celular sobre la primera capa de agarosa. Nuevamente se coloca el cubreobjetos para lograr una dispersión homogénea de la agarosa. Se incuba a 4°C hasta solidificación. A continuación se retira el cubreobjetos y se coloca una tercera

capa de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5%. Se incuban las laminillas hasta solidificación a 4°C durante 10 minutos y posteriormente se retira el cubreobjetos.

Una vez finalizada la preparación de los extendidos, se los somete a la acción de una solución de lisis en frío. Posteriormente, se colocan los preparados en una cuba de electroforesis horizontal, en la cual se incuban con buffer de corrida para lograr el desenrollamiento de la doble hebra de ADN. La electroforesis se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 20 minutos a 25 volts. Luego, los preparados son lavados con buffer de neutralización, para eliminar los restos de detergentes y álcalis que pudieran interferir con la coloración fluorescente. Posteriormente, se colorean con bromuro de etidio (todo el procedimiento descrito se lleva a cabo bajo luz amarilla, para evitar el daño adicional al ADN que se pueda generar durante el desarrollo de la metodología). El análisis microscópico de los preparados se realiza en un microscopio de epi-fluorescencia. El daño a la molécula de ADN se cuantifica midiendo el largo de 100 cometas sucesivos (50 cometas/preparado /concentración /preparación /individuo, realizando la cuantificación por duplicado) por medio de un ocular graduado.

Es de fundamental importancia la inclusión de controles positivos y negativos. Se recomienda que el control positivo sea peróxido de hidrógeno 50mM. Dicha sustancia es altamente oxidante e induce en el ADN roturas de cadena simple y doble y sitios álcali lábiles. El control negativo debe ser el diluyente utilizado en la preparación a evaluar.

Los resultados se deben analizar estableciendo la categoría de daño hallada en cada individuo por cada concentración ensayada. Se establecen cuatro categorías de daño, dependiendo del largo total del cometa: bajo (<20 mm); medio (20-40 mm), alto (40-80 mm) y células totalmente dañadas (>80mm).

Una vez establecido el porcentaje de células en cada categoría, se calcula el Índice de Daño (N), por cada individuo, por cada concentración ensayada.

$$N = N^{\circ}\text{cél Cat I} + 2xN^{\circ}\text{cél Cat II} + 3xN^{\circ}\text{cel Cat III} + 4xN^{\circ}\text{cél Cat IV}$$

Una vez calculado el Índice de daño (N), se procede al análisis exploratorio de los datos mediante el test de Varianza (ANOVA) de medidas repetidas (Anderson *et al.*, 1994; Graphpad instat) .

5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realiza un relevamiento sobre las plantas medicinales mencionadas como hierbas de uso frecuente en la República Argentina mediante la determinación del ensayo del cometa en linfocitos de sangre periférica, expuestos *in vitro* a diferentes concentraciones de los extractos acuosos de los productos naturales de interés .

En los resultados obtenidos en el ensayo del cometa se evidenció que cuatro de las seis especies evaluadas indujeron un incremento de roturas en la doble hélice del ADN. Esto sugiere la presencia de sustancias tóxicas en los extractos acuosos de esas plantas medicinales (*Ch. multifidum* 1 –infusión y cocimiento–; *L. molleoides*; *S. sysimbriifolium*, *S. pinnata*) (Figuras 1, 2).

Al analizar los resultados obtenidos en la evaluación de la infusión de *Ch. multifidum*, se observó una gran heterogeneidad en la respuesta, dependiendo de cada dador. Si observamos la Figura 1b, vemos que existe un efecto positivo, no llegando éste a ser estadísticamente significativo. Estas variaciones interindividuales, como ya fue mencionado, están influenciadas fundamentalmente por dos mecanismos: la diferente susceptibilidad individual y la extremada sensibili-

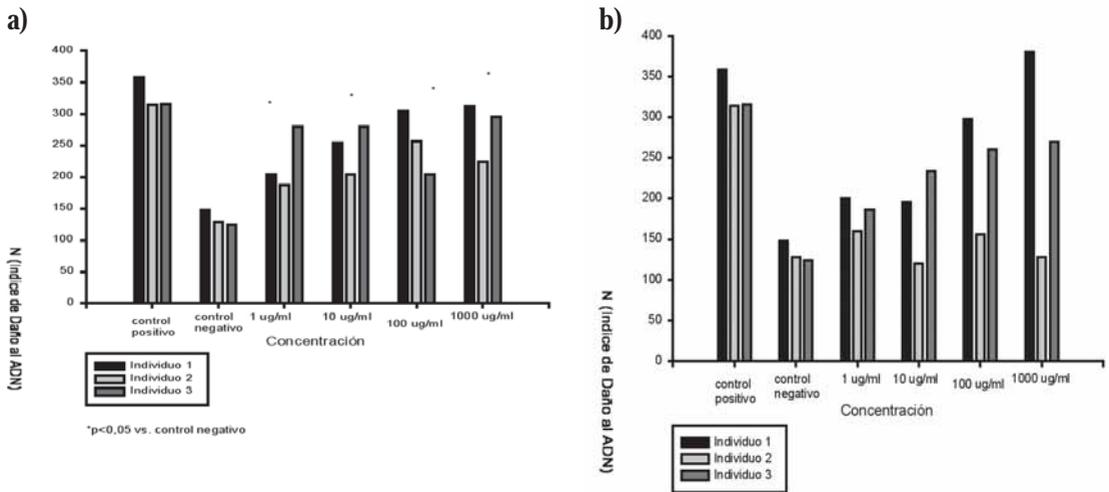


Figura 1. Índice de daño al ADN en tres dadores expuestos a *Chenopodium multifidum L.*, cuantificado mediante el ensayo del cometa. a) Cocimiento; b) Infusión.

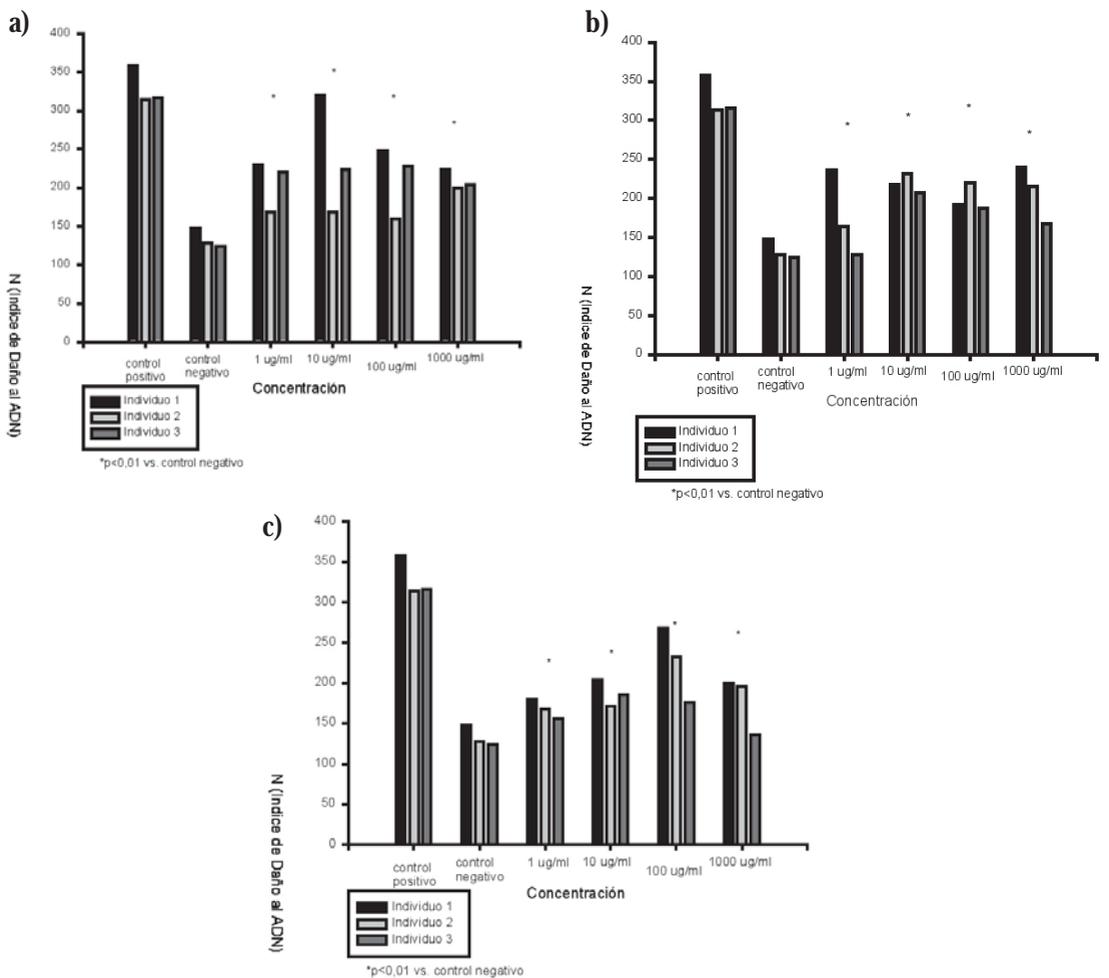


Figura 2. Electroforesis de una sola célula en linfocitos de sangre periférica de tres dadores expuestos a a) *Lithraea molleoides*; b) *Schkuhria pinnata*; c) *Solanum sylimbrifolium*.

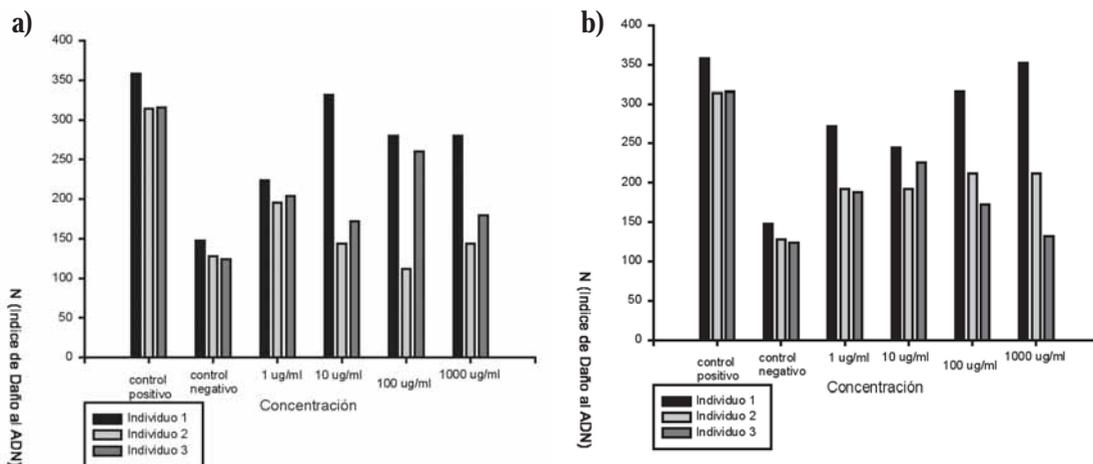


Figura 3. Índice de daño al ADN en tres dadores cuantificado mediante el ensayo del cometa. a) *Prosopis alba*; b) *Styphnolobium japonicum*.

dad de los linfocitos como sistema de ensayo (Angelis *et al.*, 1999; Tice y Strauss, 1995).

Otros ejemplos de heterogeneidad en la respuesta se observaron en los resultados obtenidos con *P. alba* y *S. japonicum*, donde se evidencia que el individuo 1 es extremadamente sensible frente al agregado de un agente externo (Figura 3).

La cuantificación de las roturas de la cadena ADN en algunas ocasiones es utilizada como una medida de genotoxicidad, no sólo porque ellas *per se* puedan causar la muerte celular, sino por que probablemente este tipo de lesiones sean los precursores de las aberraciones cromosómicas (Natarajan *et al.*, 1980; Tice y Strauss, 1995).

De esta manera la electroforesis de una sola célula resulta ser un buen candidato como método de screening para la detección de daño a la molécula de ADN, sirviendo como primera aproximación, en forma rápida y sencilla del potencial genotóxico de una sustancia analizada que debe ser corroborada mediante su evaluación con otros biomarcadores de efecto genotóxico.

Aunque las plantas medicinales tienen propiedades terapéuticas, algunas de ellas pueden poseer compuestos con propiedades no sólo mutagénicas, sino también carcinogénicas. Ejemplos de éstos son la quercetina y la rutina o algunos constituyentes de especies exóticas (Hocman, 1989).

Los ensayos de screening en mutagenicidad, en una primera instancia, son utilizados como ensayos cualitativos sobre potenciales mutágenos. En una evaluación mutagénica los resultados positivos pueden ser utilizados de diferentes maneras. Entre ellas, la de mayor aplicación durante los últimos 20 años ha sido la de tomarlos como una evidencia de peso para predecir carcinogenicidad de compuestos. Si bien la identificación de carcinógenos es importante, la evaluación de mutagenicidad no es un simple componente de este proceso, sino que es de fundamental ayuda en el asesoramiento de riesgo/beneficio frente a la exposición de diversas sustancias (Dearfield, 1995).

En el presente trabajo se observó una heterogeneidad sustancial en la distribución

de la migración del ADN frente al agregado de los extractos. Esto indica un número variable de roturas de cadena simple y sitios álcali-lábiles. Esta gran variación intercelular no podría haber sido detectada si el ensayo sólo identificara daño al material genético en poblaciones celulares (Singh *et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que los extractos acuosos evaluados no son inocentes frente a una evaluación toxicogenética de screening. Por consiguiente, es necesario considerar el posible potencial tóxico de estas plantas medicinales y establecer una metodología para la protección de la población expuesta. Se necesitan obtener respuestas en el ámbito de la salud pública para regular el consumo masivo e indiscriminado de las plantas medicinales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTINI RJ, NICKLAS J, SKOPEK T, RECIO L, O'NEILL P (1998) Genetic instability in human T-lymphocytes. *Mutation Research* 400:380-389.
- ANDERSON D, YU TW, PHILIPS BJ, SCHMEZE R (1994) The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutation Research* 307:261-271.
- ANGELIS KJ, DUSINSKA M, COLLINS AR (1999) Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis* 20(10):2133-8.
- ASHBY J (1988) Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals. *Mutation Research* 204:542-551.
- AU W, CAJAS-SALAZAR N, SALAMA S (1998) Factors contributing to discrepancies in population monitoring studies. *Mutation Research* 400:467-478.
- AURO DE OCAMPO A, JIMENEZ EM (1993) Herbal medicine in the treatment of fish diseases in Mexico. *Veterinaria Mexicana* 24(4): 291-295.
- BENDER MA, GRIGGS HG, BEFORD JS (1974) Recombinational DNA repair and sister-chromatid exchanges. *Mutation Research* 24:117-125.
- BENZI G, CECI A (1997) Herbal medicines in European regulation. *Pharmaceutical Research* 33, 355-362.
- BORCHERS AT, HACKMAN RM, KEEN CL, STERN JS, GERSHWIN ME (1997) Complementary medicine, a review of immunomodulatory effects of Chinese herbal medicines. *American Journal of Clinical Nutrition* 66: 1302-1312.
- CARRANO AV, NATARAJAN AT (1988) Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research* 204: 379-406.
- COLLINS AR (1992), Workshop on single cell gel electrophoresis (the comet assay) held as part of the UKEMS/DNA repair network joint meeting. Swansea, March. *Mutagenesis*. 7(5): 357-358.
- DEARFIELD KL (1995) Information requirements and regulatory approaches for heritable genetic risk assessment and risk communication. *Mutation Research* 350:35-40.
- DESMET PAGM (1992) Drugs used in non-orthodox medicine. In: Dukes, M.N.G. (Ed.), *Side Effects of Drugs*, 12th. Elsevier, Amsterdam, pp. 1209-1232.
- DESMET PAGM (1993) An introduction to herbal pharmacoepidemiology. *Journal of Ethnopharmacology* 38, 197-208.
- DESMET PAGM (1995) Health risks of herbal remedies. *Drug Safety* 13, 81-93.
- DESMET PAGM (1997) The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs* 54, 801-840.
- DOMÍNGUEZ JA (1928) Contribuciones a la Materia Médica Argentina, Bs. As., Ed. Peuser, 104-158-433 pp.
- DREW AK, MYERS SP (1997) Safety issues in herbal medicine, implication for the health professions. *Medical Journal of Australia* 166, 538-541.
- EISENBERG DM, DAVIS RB, ETTNER SL, WILKEY S, VAN ROMPA Y (1997) Advising patients who seek alternative medical therapies. *Annals of Internal Medicine* 127, 61-69.
- ELVIN-LEWIS M (2001) Should we be concerned about herbal remedies *Journal of Ethnopharmacology* 75, 141-164.
- ESTRELLA, E (1988) *El pan de América*. Ed. Abya-Yata, pp. 300-304.
- FAIRBAIRN DW, O'NEILL KL, STANDING

- MD (1993) Application of confocal laser scanning microscopy to analysis of H₂O₂ induced DNA damage in human cells. *Scanning* 15: 136-139.
- FAIRBAIRN DW, OLIVE PL, O'NEILL KL (1995) The comet assay: A comprehensive review. *Mutation Research* 339:37-59.
- FONT I, QUER P (1983) *Plantas Medicinales*. Ed. Labor. Barcelona 1978 *Guía Práctica de las Plantas Medicinales y la Salud*. Ed. S.A. Barcelona.
- FRANCA F, LAGO EL, MARSDEN PD (1996) Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Revista de la Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 29(3): 229-232.
- GADANO A, GURNIA, CARBALLO M (2004) Screening Genotóxico de Hierbas Medicinales Utilizadas en la Medicina Tradicional Argentina. *Acta Toxicológica Argentina*. 12(1):2-8.
- GIRAULT L (1987) *Kallawayá: Curanderos itinerantes de los Andes*. Ed. UNICEF-OPS-OMS. 178-179.
- GIUSTI L (1967), En: *Flora de la provincia de Buenos Aires*. Cabrera, A.L.; Tomo IV; Parte 3. INTA. Buenos Aires. 115-116.
- GONSEBATT ME, STERNBERG H, TICE RR, SENULA GC, KRAM D, SMITH J, BYNUM C (1979) Cellular replication and age. *Mech. Age Dev.* 9:313-324.
- GRAPHPAD INSTAT. Software estadístico IBM PC compatible.
- GUPTA PM (1995) 270 plantas medicinales iberoamericanas. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. CYTED.; 230-237.
- HERNÁNDEZ F (1571) *Historia natural de nueva España*. Ed. UNAM. México. vol 3.
- HIERONYMUS G (1882) *Plantae Diaphoricae Florae Argentinae - Bs. As.*, Ed. Kraft, 69-404 pp.
- HOCMAN G (1989) Prevention of cancer: vegetables and plants. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B(2): 201-212.
- KANBA S, YAMADA K, MIZUSHIMA H, ASAI M (1998) Use of herbal medicine for treating psychiatric disorders in Japan. *Psychiatry and clinical neurosciences* 52:S331-S333 Suppl.
- KINCHELOE L (1997) Herbal medicines can reduce costs in HMO. *Herbalgram* 41, 49.
- KISHORE N, MISHRA AK, CHANSOURIA JP (1993) Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. *Mycoses*. 36(5-6): 211-215.
- KO RJ (1998) Adulterants in Asian patent medicines. *New England Journal of Medicine* 339, 847.
- MARTINDALE M (1982) *The extra Pharmacopoeia*. Twenty eight edition. Ed. James E.F. Reynolds. The pharmaceutical press. London. pp. 90.
- MCPARTLAND JM, PRUITT PL (1999) Side effects of pharmaceuticals not elicited by comparable herbal medicines, the case of tetrahydrocannabinol and marijuana. *Alternative Therapy Health and Medicine* 5, 57-62.
- MONTEITH DK, VANSTONE J (1995) Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. *Mutation Research* 345:97-103.
- MURPHY JM (1999) Preoperative considerations with herbal medicines. *American Organization of Registered Nurses Journal* 69:173-183.
- NATARAJAN AT, OBE G, VAN ZEELAND AA, PALITTI F, MEJERS M, VERDEGAAL-IMMERZEEL E.A.M. (1980) Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations II. Utilization of neospora endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle. *Mutation Research* 69:293-305.
- NRC (National Research Council) (1987) Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect* 74:3-9.
- NRC (National Research Council) (1991) Environmental epidemiology public health and hazardous wastes. VII Biologic markers in studies of hazardous-waste sites. National Academic Press. 219-255.
- OKUYAMA E, UMEYAMA K, SAITO Y, YAMAZAKI M, MSATAKE M (1993) Ascaridole as pharmacologically active principle of Paico, a medicinal peruvian plant. *Chemical. Pharmaceutical Bulletin of Tokyo* 41(7): 1309-1311.
- ÖSTLING O, JOHANSON KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Community* 123: 291-298.
- PAHLOV M (1979) *El gran libro de las plantas medicinales*. Ed. Everest. León, pp. 124-156.
- PAINTER RB (1980) A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutation Research* 70:337-341.

- POLETTI A (1979) Plantas y flores medicinales. PARRAMÓN (Ed). Barcelona, pp. 109-124.
- POUSSET JL (1989) Plantas medicinales africanas. MARKETING (Ed). París, pp. 56-57.
- PRESTON RJ, AU A, BENDER MA, BREWEN JG, CARRANO AV, HEDDLE JA, MCFEE AF, WOLFF S, WASSON JS (1981) Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays: a Report of the US EPA's Genotoxic Program. *Mutation Research*. 87:147-188.
- RILEY TJ (1993) Ascarids, American Indians and the modern world: parasites and the prehistoric record of a pharmacological tradition. *Perspectives in Biology and Medicine*. 36(3): 369-375.
- ROJAS E, HERRERA LA, SORDO M, GONSEBATT ME, MONTERO R, RODRIGUEZ R, OSTROSKY-WEGMAN P (1993) Mitotic index and cell proliferation kinetics for the identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs*. 4:637-640.
- ROSS GM, Mc MILLIAN TJ, WILCOX P, COLLINS AR (1995) The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutation Research* 337:57-60.
- SHAFFER DA (1982) Alternate replication bypass mechanism for sister-chromatid exchange formation. *Progress Topics in Cytogenetic*. 2:67-98.
- SHAW D, MURRAY V, VOLANS G. (1999) Adverse effects of herbal remedies and OTC medicines. *British Journal of Clinical Pharmacology* 47 (227-228), 229-230.
- SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-191.
- SINGH NP, TICE RR, STEPHENS RE, SCHNEIDER EL (1991) A microgel technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Research* 252:289-296.
- SINGH NP, DANNER DB, TICE RR, MCCOY MT, COLLINS GD, SCHNEIDER EL (1989) Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Experimental Cell Research* 184: 461-470.
- SOLA W (1942) Arboles y arbustos de Córdoba, Ed. Estrada, Cba., 35-37 - 97 pp.
- STEWART MJ, MOAR JJ, STEENKAMP P, KOKOT M (1999) Findings in fatal cases of poisoning attributed to traditional remedies in South Africa. *Forensic Science International* 101, 177-183.
- TAYLOR JH (1958) Sister Chromatid Exchanges in Tritium-Labeled Chromosomes. *Genetics*. 43:515-529.
- TICE RR, STRAUSS GH (1995) The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13 Suppl 1:207-14.
- TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, MIYAMAE Y, ROJAS E, RYU JC, SASAKI YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis* 35(3):206-21.
- Toursarkissian (1980) Plantas medicinales de la Argentina - Bs. As., Ed. H. Sur, 4-5 - 178 pp.
- VIESCA C (1984) Prevención y terapéuticas mexicanas en la historia general de la medicina en México antiguo. UNAM (EDS), pp. 212.
- WILLS RBH, BONE K, MORGAN M (2000) Herbal products and active constituents, modes of action and quality control. *Nutrition Research Reviews* 13: 47-77.
- WOGAN GN (1992) Molecular epidemiology in Cancer Risk Assessment and Prevention: Recent Progress and Avenues for Future Research. *Environmental and Health Perspectives* 98: 167-178.
- WOLFF S, BODYCOTE J, PAINTER RB (1974) Sister-chromatid exchanges induced in Chinese Hamster Cells by UV irradiation of different stages of cell cycle: The necessity for cell to pass through S. *Mutation Research* 25:73-81.
- WONG AH, SMITH M, BOON HS (1998) Herbal remedies in psychiatric practice. *Archives of General Psychiatry* 55, 1033-1044.
- YSUNZA OA (1976) Estudio bioantropológico de tratamiento del susto. *Estudio de. Antropología Médica* I: 63-68.