

## Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae)

[Survey on polyphenols, antioxidant activity and genotoxicity on argentinean species of *Lippia* and *Aloysia* (Verbenaceae)]

Rafael A. RICCO<sup>1</sup>, Marcelo L. WAGNER<sup>1</sup>, Erika PORTMANN<sup>2</sup>, Claudia REIDES<sup>3</sup>,  
Susana LLESUY<sup>3</sup>, Alberto A. GURNI<sup>1</sup>, Marta A. CARBALLO<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Cátedra de Farmacobotánica. <sup>2</sup>CIGETOX-INFIBIOQ. <sup>3</sup>Cátedra de Química General e Inorgánica.  
Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junin 954. (1113) Buenos Aires. República Argentina

### Abstract

Three species and a variety from the Verbenaceae belonging to the argentinean flora were analyzed: *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Gill. Et Hook) Tronc., *Aloysia gratissima* var. *schulziana* (Moldenke) Botta, *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke and *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hieron., the first two known as “cedrón del monte”, the third as “yerba del burro” and the other as “incayuyo”. Their leaves are used as digestive in folk medicine. The research was performed on quantification of polyphenols (total phenols, total flavonoids and total hydroxycinnamic acids) and on determination of antioxidant and genotoxic activities. *L. integrifolia* showed the highest total phenol concentration and *A. polystachya* the lowest, but with the highest concentration of hydroxycinnamic acids. When flavonoids were quantified, *A. polystachya* showed the lowest concentrations and *A. gratissima* var. *schulziana* the highest. According to quantification of total polyphenols, the lowest antioxidant activity was measured in *A. polystachya* extracts, followed by those from *A. gratissima* var. *gratissima* and *A. gratissima* var. *schulziana*, while extracts from *L. integrifolia* showed the highest antioxidant activity. No genotoxic activity was detected by means of the comet-assay for any of the species. This absence of genotoxicity, added to the relevant antioxidant activity, could justify the use of leaves infusions and decoctions from these species in treatments of those pathologies where antioxidants play an important role. These studies suggest their sure use in folk medicine, in which people include them among their medicinal plants.

**Keywords:** *Aloysia*, antioxidant activity, genotoxicity, *Lippia*, polyphenols

### Resumen

Se analizaron 3 especies y una variedad de la familia Verbenaceae de la flora argentina: *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Gill. Et Hook) Tronc., *Aloysia gratissima* var. *schulziana* (Moldenke) Botta, *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke y *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hieron., conocidas como “cedrón del monte” las dos primeras, “yerba del burro” la tercera e “incayuyo” la restante. De todas ellas se emplean las hojas en la medicina popular como digestivas. Se investigaron los contenidos de polifenoles (fenoles totales, flavonoides totales y ácidos hidroxicinámicos totales) y se determinó la capacidad antioxidante y genotoxicidad de las preparaciones acuosas (infusiones y cocimientos). *L. integrifolia* fue la especie con mayor contenido de fenoles totales y *A. polystachya* la menor. En el análisis de los hidroxicinámicos, *A. polystachya* fue la que mayor concentración mostró. En cuanto a los flavonoides, *A. polystachya* fue la que poseyó menor concentración en tanto que *A. gratissima* var. *schulziana* fue la más rica en estos compuestos. *A. polystachya* es la especie que presenta los menores valores de actividad antioxidante, seguida por *A. gratissima* var. *gratissima* y *A. gratissima* var. *schulziana*, mientras que *L. integrifolia* es la especie con mayor actividad antioxidante, en correlación con los valores de polifenoles totales. Ninguna de las especies analizadas demostró actividad genotóxica en el ensayo del cometa. La ausencia de genotoxicidad, sumada a una marcada actividad antioxidante, justificarían el empleo de las infusiones y cocimientos en el tratamiento de aquellas patologías donde los agentes antioxidantes juegan un importante rol terapéutico. Estos estudios sugieren el empleo seguro en la medicina tradicional de los pueblos y comunidades que las incluyen entre sus plantas medicinales.

**Palabras Clave:** actividad antioxidante, *Aloysia*, genotoxicidad, *Lippia*, polifenoles

Recibido | Received: July 2, 2010

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: September 26, 2010

Publicado en línea | Published online: September 30, 2010

Declaración de intereses | Declaration of interests:

Financiación | Funding: subsidio ANPCYT-PICT N° 38238.

This article must be cited as: Rafael A. RICCO, Marcelo L. WAGNER, Erika PORTMANN, Claudia REIDES, Susana LLESUY, Alberto A. GURNI, Marta A. CARBALLO. 2010. Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae). Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 9(5): 388 - 396. [EPub September 2010].

\*Contactos | Contacts: [raricco@ffyba.uba.ar](mailto:raricco@ffyba.uba.ar)

## INTRODUCCIÓN

La familia Verbenaceae comprende en la actualidad alrededor de 100 géneros y unas 2000 especies de amplia distribución geográfica, abarcando regiones tropicales, subtropicales y templadas.

En la República Argentina se describen 26 géneros con 191 especies de las cuales 54 especies son endémicas (Zuloaga y Morrone, 1999). La familia se caracteriza por incluir especies aromáticas muy utilizadas en la medicina tradicional y popular. Entre los géneros más importantes se encuentran *Lippia* (los “poleos criollos”) y *Aloysia* (los “cedrones”).

*Aloysia citrodora* Palau, conocida vulgarmente con el nombre de “cedrón”, y *Lippia turbinata* Griseb., cuyo nombre vulgar es “poleo”, son las especies más empleadas. Los trabajos realizados sobre dichas especies se centran principalmente en el análisis de los aceites esenciales y en menor medida en los compuestos polifenólicos (Montes *et al.*, 1973; Lamaison *et al.*, 1993; Carnat *et al.*, 1995).

Sin embargo, en la Argentina crecen otras especies como *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Gill. Et Hook) Tronc., *Aloysia gratissima* var. *schulziana* (Moldenke) Botta, *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke y *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hieron., entre otras, que también son conocidas con los nombres de “cedrones” y “poleos”. Todas presentan un uso común que corresponde al tratamiento de desórdenes gastrointestinales, empleándose como digestivas, antiespasmódicas y estomacales (Pascual *et al.*, 2001). Respecto de la composición química, los estudios realizados comprenden el análisis de los aceites esenciales, resultando escasa la información que se dispone de ellas (Bailac y col., 1996; Ricciardi y col., 2000).

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar cuantitativamente los compuestos polifenólicos, como así también la capacidad antioxidante y genotoxicidad de los extractos acuosos (infusión y cocimiento), provenientes de las especies *Aloysia gratissima* var. *gratissima*, *A. gratissima* var. *schulziana*, *Aloysia polystachya* y *Lippia integrifolia*, con el fin de determinar la inocuidad de los extractos acuosos (ausencia de genotoxicidad) como así también su potencial empleo como agentes antioxidantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal empleado son las hojas de las especies *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Gillies *et al.* Hook) Tronc., *A. gratissima* var. *schulziana* (Moldenke) Botta, *A. polystachya* (Griseb.) Moldenke,

y *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hieron.. El material proviene de ejemplares que se encontraban en estado vegetativo al momento de la toma de las muestras.

Los ejemplares de herbario de los materiales empleados se encuentran depositados en el Museo de Farmacobotánica “Juan A. Domínguez” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (BAF).

### Extracción

Se realizaron infusiones y cocimientos (decocciones) al 5% según la Farmacopea Nacional Argentina VI° edición.

Infusión: a 5 g de las hojas pulverizadas, contenidas en un erlenmeyer con tapa, se adicionaron 100 ml de agua destilada hirviendo y se dejó actuar durante 20 min. Luego se filtró y el residuo se lavó con agua destilada hasta volumen final de 100 ml de extracto.

Cocimiento: a 5 g de las hojas pulverizadas, contenidas en un erlenmeyer, se adicionaron 100 ml de agua destilada y se llevó a ebullición durante 20 min. Se dejó enfriar a 40 °C y se filtró. El residuo se lavó con agua destilada hasta volumen final de 100 ml de extracto.

### Estudio de polifenoles

#### Cuantificación de fenoles totales

Fueron determinados mediante el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo con Makkar *et al.*, 1993.

Se tomaron 50 µl de los extractos y fueron transferidos a tubos de ensayos y se llevó a un volumen igual a 500 µl con agua desionizada. Se adicionaron a continuación 250 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,25 ml de solución acuosa de carbonato de sodio al 20%. Luego de 40 min se midió la absorbancia a 725 nm.

Se realizó una curva de calibración con ácido tánico. El contenido de fenoles totales fue expresado como mg ácido tánico / g material seco. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

#### Cuantificación de flavonoides totales

Se tomaron alícuotas de 0,1 ml de cada extracto y fueron adicionadas a 1,4 ml de agua desionizada y 0,50 ml del reactivo de flavonoides (133 mg de tricloruro de aluminio, 400 mg acetato de sodio en 100 ml de solvente constituido por 140 ml metanol, 50 ml agua, 10 ml ácido acético). Luego de 30 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 430 nm (Maksimovic *et al.*, 2005).

Se realizó una curva de calibración con rutina. El contenido de flavonoides fue expresado como mg rutina / g material seco. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

#### **Cuantificación de ácidos hidroxycinámicos totales**

Se determinó mediante una modificación de la metodología descrita por Dao y Friedman, 1992.

Se tomaron 50 µl de cada extracto y se llevó a un volumen igual a 2 ml con etanol absoluto.

Se determinó la absorbancia a 328 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico. Los valores se expresaron como mg de ácido clorogénico / g material seco. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  error estándar. Se consideraron diferencias significativas con  $p < 0,05$ . Se empleó el programa GraphPad Prism®.

#### **Estudio de capacidad antioxidante**

##### **Determinación de la capacidad antioxidante total hidrosoluble**

Se determinó mediante el método del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-sulphonico)) (Campos y Lissi, 1997), método habitualmente empleado para determinar la capacidad antioxidante total de extractos vegetales. El método consiste en la generación de radicales libres mediante la reacción del ABTS con ABAP (2,2'-azobis (2-amidopropano)).

El consumo de radicales del ABTS se mide espectrofotométricamente a 734 nm mediante la disminución de la absorbancia de la solución original cuando se incuba en presencia de la muestra a analizar. Se realizó una curva de calibración con ácido ascórbico.

#### **Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  error estándar. Se consideraron diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### **Estudio de genotoxicidad**

##### **Electroforesis en gel de una Sola Célula**

Viabilidad celular: mediante una coloración fluorescente con bromuro de etidio (BE) y naranja de acridina (NA) (100 µg/mL BE y 100 µg/mL NA) (Mc Gahon, 1995), se contabilizaron 100 células y se

estableció el porcentaje de células viables y células no viables (Mercille and Massie, 1994).

#### **Ensayo Cometa alcalino**

Se utilizó la técnica descrita por Singh et al. 1988, con modificaciones. Cada muestra (3 individuos sanos) se procesó por duplicado incluidos los controles negativos y positivos ( $H_2O_2$  50 µM). Los extractos evaluados (0,05 mg/ml y 0,5 mg/ml.) en sus dos formas de preparación infusión y cocimiento, fueron incubados con 50 µl de sangre y 950 µl de RPMI 1640 durante 2 h a 37 °C. El pellet se mezcló con agarosa de bajo punto de fusión al 1% a 37 °C. La suspensión celular se distribuyó sobre portaobjetos previamente cubiertos con una capa de agarosa de punto de fusión normal al 1% y se adicionó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Finalizada la preparación de los extendidos, se los sometió a la acción de una solución de lisis (NaCl 2,5 M;  $Na_2EDTA$  100 mM; Tris 10mM; 1% Triton X-100 y DMSO 10%, pH 10) durante 24 h a 4 °C. Se realizó la electroforesis con buffer de corrida (200 mM  $Na_2EDTA$ ; 10N NaOH, pH > 13) 20 min a 24 V y 300 mA (0,75 V/cm) a 4 °C. Se realizaron tres lavados con buffer de neutralización (Tris 0,4M, pH 7,5) y se coloreó con bromuro de etidio (0,02 mg/ml). Se observó al microscopio de fluorescencia, cuantificando 100 células por vidrio, analizando un total de 200 células, clasificando en categorías de daño (I a IV), teniendo en cuenta la integridad de la cabeza y de la cola del cometa.

Se calculó el Índice de daño mediante la siguiente fórmula: ID =  $N^\circ$  cél. Cat. I + 2 x  $N^\circ$  cél. Cat. II + 3 x  $N^\circ$  cél. Cat. III + 4 x  $N^\circ$  cél. Cat. VI (Tice et al., 2000).

#### **Análisis Estadístico**

Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  desvío estándar. El tratamiento estadístico se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis (ANOVA por Rangos) seguido del post test de Dunn para comparaciones múltiples. Se consideraron diferencias significativas con  $p < 0,05$  (SigmaPlot 9.0).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Análisis de los polifenoles**

La determinación de fenoles totales es un estudio ampliamente utilizado que permite conocer el contenido de polifenoles presentes en extractos vegetales (Waterman and Mole, 1994).

En lo que respecta a la presencia de estos compuestos en extractos acuosos, en estudios llevados a cabo sobre la infusión (té) de “cedrón”, se han detectado altas concentraciones de polifenoles (675 mg / l de infusión) que incluyen principalmente al verbascósido y derivados de luteolina (Carnat et al. 1999).

En el presente estudio se incluyó la cuantificación de los fenoles totales (contenido total de polifenoles), como así también los contenidos de los grupos principales de polifenoles: flavonoides, mediante la determinación del contenido de flavonoides totales, y derivados hidroxicinámicos mediante la determinación de hidroxicinámicos totales.

En la cuantificación de fenoles totales no se han determinado diferencias significativas cuando se compara la infusión y el cocimiento de cada especie (Tabla 1), si bien los cocimientos provenientes de *A. gratissima* var. *gratissima* y *A. polystachya* presentan menores concentraciones de fenoles respecto de sus infusiones. Probablemente, debido a la naturaleza de los compuestos fenólicos presentes, durante el proceso de infusión se extrae la mayoría de los polifenoles, no obteniéndose concentraciones significativamente mayores cuando el método empleado involucra condiciones más energéticas de extracción (cocimiento).

**Tabla 1.** Cuantificación de fenoles totales

Especie	Extracto	Fenoles Totales
		mg ácido tánico / g material seco
<i>Aloysia gratissima</i> var. <i>gratissima</i>	Infusión	36,94 ± 1,73
	Cocimiento	33,62 ± 1,45
<i>Aloysia gratissima</i> var. <i>schulziana</i>	Infusión	45,38 ± 2,83
	Cocimiento	47,35 ± 2,70
<i>Aloysia polystachya</i>	Infusión	30,80 ± 1,29
	Cocimiento	31,24 ± 1,35
<i>Lippia integrifolia</i>	Infusión	54,33 ± 3,44
	Cocimiento	58,72 ± 3,10

Las especies correspondientes al género *Aloysia* presentan los valores más bajos de fenoles totales. Dentro del género se observa que *A. polystachya* es la especie que presenta los valores más bajos, *A. gratissima*, en sus dos variedades, es la especie que presenta valores intermedios de fenoles totales, pero existe una diferencia significativa entre ambas

variedades. Por último, *Lippia integrifolia* es la especie con mayores niveles de polifenoles.

De acuerdo con los valores obtenidos de los ácidos hidroxicinámicos totales (Tabla 2), *A. polystachya* es la especie con menor concentración; *L. integrifolia* presenta valores inferiores a los detectados para las dos variedades de *A. gratissima*. El análisis del contenido de flavonoides totales (Tabla 3), muestra que *A. polystachya* es la especie

**Tabla 2.** Cuantificación de hidroxicinámicos totales

Especie	Extracto	Hidroxicinámicos Totales
		mg ácido clorogénico / g material seco
<i>Aloysia gratissima</i> var. <i>gratissima</i>	Infusión	42,31 ± 2,25
	Cocimiento	36,30 ± 2,16
<i>Aloysia gratissima</i> var. <i>schulziana</i>	Infusión	45,39 ± 3,20
	Cocimiento	45,97 ± 3,40
<i>Aloysia polystachya</i>	Infusión	17,79 ± 1,47
	Cocimiento	21,39 ± 1,30
<i>Lippia integrifolia</i>	Infusión	29,40 ± 1,60
	Cocimiento	29,56 ± 1,23

**Tabla 3.** Cuantificación de flavonoides totales

Especie	Extracto	Flavonoides Totales
		mg rutina/g material seco
<i>Aloysia gratissima</i> var. <i>gratissima</i>	Infusión	19,23 ± 1,74
	Cocimiento	12,79 ± 1,25
<i>Aloysia gratissima</i> var. <i>schulziana</i>	Infusión	31,05 ± 2,40
	Cocimiento	31,22 ± 2,45
<i>Aloysia polystachya</i>	Infusión	11,10 ± 1,14
	Cocimiento	9,85 ± 1,33
<i>Lippia integrifolia</i>	Infusión	20,01 ± 2,40
	Cocimiento	25,27 ± 2,31

con menor concentración de dichos compuestos y es duplicada en el contenido de flavonoides por las otras especies del género *Aloysia*. Para *L. integrifolia* se obtuvieron valores intermedios entre ambas variedades de *A. gratissima*.

#### **Análisis de la actividad antioxidante**

Los compuestos fenólicos poseen la estructura química adecuada para ejercer una acción antioxidante, actuando como atrapadores de radicales libres, como por ejemplo, de las especies reactivas del oxígeno (ROS). La peroxidación lipídica mediada por ROS es una importante causa de la destrucción y daño de las membranas celulares y se ha involucrado

en la patogénesis de la lesión aguda de la mucosa gástrica inducida por etanol (Salim, 1990), como así también en procesos que afectan al hígado, intestino y páncreas (Dryden et al., 2005).

Trabajos realizados con extractos acuosos de “cedrón” han demostrado tener efecto citoprotector y cicatrizante de úlceras gástricas. El empleo del extracto acuoso tiene un efecto similar al obtenido con hidróxido de aluminio (Leon Miralla y Soto Cochon, 1995).

Cuando se analiza la actividad antioxidante de los extractos (Tabla 4), puede observarse que los valores obtenidos correlacionan con aquellos correspondientes al contenido de fenoles totales. Es decir, *A. polystachya* es la especie que presenta los menores valores de actividad antioxidante, seguida por *A. gratissima* var. *gratissima*, *A. gratissima* var. *schulziana*, mientras que *L. integrifolia* es la especie con mayor actividad antioxidante.

**Tabla 4.** Cuantificación de la actividad antioxidante total

Especie	Extracto	ABTS
		µmoles ác. ascórbico/g material seco
<i>Aloysia gratissima</i> var. <i>gratissima</i>	Infusión	219 ± 42
	Cocimiento	244 ± 25
<i>Aloysia gratissima</i> var. <i>schulziana</i>	Infusión	351 ± 50
	Cocimiento	302 ± 56
<i>Aloysia polystachya</i>	Infusión	217 ± 20
	Cocimiento	185 ± 11
<i>Lippia integrifolia</i>	Infusión	359 ± 43
	Cocimiento	406 ± 60

Esta correlación entre actividad antioxidante y contenido de polifenoles se refleja, como se ha mencionado anteriormente, respecto de los fenoles totales, no pudiendo ser establecida si se analizan aisladamente los contenidos de flavonoides totales o de ácidos hidroxicinámicos totales. Esto pone en evidencia que los polifenoles tomados en conjunto (flavonoides más los derivados hidroxicinámicos), son responsables en la expresión de la actividad antioxidante total.

Por lo anteriormente expuesto, los extractos aquí analizados, ricos en polifenoles y con una marcada actividad antioxidante, podrían constituir una opción válida en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, situaciones en que dichas especies son empleadas en la medicina tradicional.

#### **Estudio de genotoxicidad**

Las técnicas de estudio de las alteraciones citogenéticas *in vitro* se consideran el paso inicial para evaluar el riesgo de agentes genotóxicos. Dentro de las diferentes técnicas que evalúan la genotoxicidad se encuentra la electroforesis de una sola célula o ensayo del cometa. Esta técnica permite la evaluación de los niveles de daño sin la necesidad de trabajar con células en proliferación; se necesitan pequeñas cantidades de células (< 200.000); se puede aplicar en cualquier tipo celular (Deeley y col., 1992; Ahuja y col., 1993; Plappert et al., 1994) es una metodología rápida y sencilla que permite la obtención de resultado comparables en un corto período de tiempo. Es de gran utilidad en el análisis *in vitro* de potenciales sustancias genotóxicas en protocolos industriales (Hartmann et al., 2001; 2003; Kiskinis, 2002; Giannotti, 2002).

Respecto de los estudios de genotoxicidad, se analizaron en esta ocasión los extractos (infusión y cocimiento) en dos concentraciones diferentes: 0,05 mg/ml y 0,5 mg/ml.

En el estudio de viabilidad celular se determinó que el porcentaje de células muertas no excede el 20% en ninguno de los tratamientos. Esto indicaría que cualquier efecto genotóxico potencial es debido al agente en estudio y no a falsos positivos generados

por procesos de muerte celular producto de la metodología.

En la evaluación genotóxica mediante el ensayo del cometa (Tablas 5 y 6) no se observan diferencias significativas entre las células tratadas con los extractos analizados y sus controles negativos correspondientes  $p > 0,05$  (test de Dunn)

**Tabla 5.** Ensayo del cometa. Índice de daño de la infusión

Individuo	Infusión				
	1	2	3	Pool	
control negativo	118,4 ± 4,38	138 ± 3,93	122,7 ± 4,88	<b>126,8 ± 9,55</b>	
control positivo	204,2 ± 19,39	199,3 ± 7,49	201,7 ± 2,6	<b>201,6 ± 16,7*</b>	
<i>A. gratissima</i> var. <i>gratissima</i>	<i>Cc1</i>	120 ± 1,41	134,5 ± 3,54	129,5 ± 4,95	<b>128 ± 7,15</b>
	<i>Cc2</i>	108 ± 3,54	136,5 ± 0,71	130 ± 5,65	<b>125 ± 13,45</b>
<i>A. gratissima</i> var. <i>schulziana</i>	<i>Cc1</i>	124 ± 5,66	133,5 ± 2,12	128 ± 8,48	<b>128,5 ± 6,32</b>
	<i>Cc2</i>	126 ± 1,41	138 ± 1,41	124,5 ± 3,54	<b>129,5 ± 6,86</b>
<i>A. polystachya</i>	<i>Cc1</i>	121,5 ± 2,12	134,5 ± 6,36	127 ± 1,41	<b>127,7 ± 6,59</b>
	<i>Cc2</i>	120 ± 2,83	129,5 ± 3,54	127 ± 9,90	<b>125,5 ± 6,56</b>
<i>L. integrifolia</i>	<i>Cc1</i>	132 ± 2,83	145,5 ± 4,95	119,5 ± 0,71	<b>132,3 ± 11,91</b>
	<i>Cc2</i>	128 ± 1,41	142 ± 1,41	123,5 ± 7,78	<b>131,2 ± 9,35</b>

*Cc1*: 0,05 mg/ml

*Cc2*: 0,5 mg/ml

Kruskal- Wallis (ANOVA por Rangos)  $p < 0,001$

\*  $p < 0,05$  post test de Dunn

Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los mismos extractos y las distintas concentraciones evaluadas (0,05 y 0,5 mg/ml) y las dos formas de preparación (infusión y cocimiento). Si se observan diferencias significativas entre el control positivo y los diferentes extractos

analizados contra el control positivo  $p < 0,05$  (test de Dunn).

Como puede observarse, si bien el nivel de polifenoles varía entre 58,72 mg ácido tánico/g material seco (como la máxima concentración) y 30,80 mg ácido tánico/g material seco (como la mínima concentración), para éste rango de valores ninguna de las especies analizadas presenta efectos genotóxicos, al menos en las condiciones analizadas.

**Tabla 6.** Ensayo del cometa. Índice de daño del cocimiento

Individuo	Cocimiento				
	1	2	3	Pool	
control negativo	118,4 ± 4,38	138 ± 3,93	122,7 ± 4,88	<b>126,8 ± 9,55</b>	
control positivo	204,2 ± 19,39	199,3 ± 7,49	201,7 ± 2,6	<b>201,6 ± 16,7*</b>	
<i>A. gratissima</i> var. <i>gratissima</i>	Cc1	111 ± 1,41	131,5 ± 0,71	124,5 ± 3,54	<b>124 ± 10,37</b>
	Cc2	117,5 ± 4,95	142 ± 2,83	128 ± 2,83	<b>129,8 ± 11,53</b>
<i>A. gratissima</i> var. <i>schulziana</i>	Cc1	122,5 ± 0,71	134 ± 1,41	126 ± 7,07	<b>128,2 ± 6,43</b>
	Cc2	118,5 ± 0,71	135,5 ± 0,71	117,5 ± 6,36	<b>126,2 ± 7,88</b>
<i>A. polystachya</i>	Cc1	118 ± 4,24	137 ± 4,24	120,5 ± 6,36	<b>121,5 ± 2,12</b>
	Cc2	122,5 ± 2,12	126 ± 5,66	124 ± 5,66	<b>120 ± 2,83</b>
<i>L. integrifolia</i>	Cc1	133,5 ± 7,78	139,5 ± 3,54	126,5 ± 4,95	<b>132 ± 2,83</b>
	Cc2	137 ± 1,41	147,5 ± 2,12	125,5 ± 7,07	<b>128 ± 1,41</b>

Cc1: 0,05 mg/ml

Cc2: 0,5 mg/ml

Kruskal- Wallis (ANOVA por Rangos)  $p < 0,001$ \*  $p < 0,05$  post test de Dunn

## CONCLUSIONES

La ausencia de genotoxicidad, sumada a una marcada actividad antioxidante, estaría avalando el empleo de las infusiones y los cocimientos en la medicina tradicional de los pueblos y comunidades que incluyen a las especies aquí analizadas entre sus plantas medicinales.

## AGRADECIMIENTOS

Con subsidio ANPCYT-PICT N° 38238.

## REFERENCIAS

- Ahuja YR, Anuradha G, Jaiswal M, Rajeswari N, Raju KN, Jain S N. 1993. Single cell gel electrophoresis in leukocytes of patientd with precancerous and cancerous lesions of the cervix. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 1515.
- Bailac P, Dutschatzky C, Carrascul A, Firpo N y Ponzi M. 1996. Composición del aceite esencial de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook). *Actas del III Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones.* Talca. Chile. pp:111.
- Carnat A, Carnat AP, Chavignon O, Heitz A, Wylde R, Lamaison JL. 1995. Luteolin 7-diglucuronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. *Planta Med.* 61: 490.
- Carnat A, Carnat AP, Fraisse D, Lamaison JL. 1999. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia* 70: 44 - 49.



- Campos AM, Lissi EA. 1997. Kinetics of the reaction between ABTS derived radical cations and phenols. *Int J Chem Kinetics* 29: 219 - 224.
- Dao L and Friedman M, 1992. Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2152 - 2150.
- Deeley JGT, Mitchell SM, Sanders A, Moore JL. 1992. Heterogeneity of radiation induced damage measured by microgel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* 62: 372.
- Dryden GW Jr, Deaciuc I, Arteel G, McClain CL. 2005. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 7: 308 - 316.
- Giannotti E, Vandin L, Repeto P, Comelli R A. 2002. Comparison of the in vitro Comet assay with the in vitro chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster luh cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals. *Mutagenesis* Mar. 17: 163 - 170.
- Hartmann A, Elhajouji A, Kiskinis E, Poetter F, Martus H, Fjallman A, Frieauff W, Suter W. 2001. Use of alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.* 39: 843 - 858.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay p, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice R R. 2003. 4<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18: 45 - 51.
- Kiskinis E, Suter W, Hartmann A. 2002. High throughput Comet assay using 96- well plates. *Mutagenesis.* 17: 37 - 43.
- Lamaison JL, Petitjean-Freytet C, Carnat A. 1993. Le verbascoside, composé phénolique majeur des feuilles de frêne (*Fraxinus excelsior*) et de verveine (*Aloysia trtphylla*). *Plant. Méd. Phytothér.* 26: 225 - 233.
- Leon Miralla DJ y Soto Cochon CR. 1995. Efecto citoprotector y cicatrizante de *Lippia triphylla* (tiquil-tiquil), *Taraxacum officinalis* y *Brassica campestris* (nabo silvestre) sobre las úlceras gástricas experimentales inducidas por etanol en ratas. Tesis Doctoral. Arequipa, Universidad Nacional de San Agustín.
- Makkar HPS, Bluemmel M, Borowy NK, Becker K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 61: 161 - 165.
- Maksimovic Z, Malencic D and Covacevic N. 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Mayadis stigma* extracts. *Biores. Tech.* 96: 873 - 877.
- Mercille S and Massie B. 1994. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hydridoma and myeloma cells. *Biotechnol Bioeng* 44: 1140 - 1154
- Montes M, Valenzuela L, Wilkomirsky T, Arrive M. 1973. Sur le composition de l'essence d'*Áloysia triphylla*. (Cedron). *Planta Med* 23: 119.
- Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review, *J. Ethnopharmacol.* 76: 201 - 214.
- Plappert U, Barthel E, Raddatz K, Seidel H J. 1994. Early effects of benzene in mice. Hematological versus genotoxic effects. *Arch. Toxicol.* 68: 284 - 290.
- Ricciardi GA, Ricciardi AIA y Bandoni AL. 2000. Fitoquímica de Verbenaceae (*Lippia* y *Aloysia*) del Noroeste Argentino. <http://www.unne.edu.ar>. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE. Exactas N° 039.
- Salim AS. 1990. Removing oxygen-derived free radicals stimulates healing of ethanol-induced erosive gastritis in the rat. *Digestion* 47: 24 - 28.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184 - 191
- Waterman PG and Mole S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. *Methods in ecology.* Blackwell Scientific Publications. London. England. pp: 80.
- Zuloaga, F. O. y Morrone, O. 1999. Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina. Editorial Missouri Botanical Garden Press, pp: 1136 - 1170.