



**INFORME PERIODO: 2013 - 2014**

**1. APELLIDO: TOURNIER**

Nombre(s): **Horacio Alfio**

Título(s): Farmacéutico y Lic. Farmacia y Bioquímica

Dirección Electrónica:

**2. OTROS DATOS**

INGRESO: Categoría: Adjunto

Mes: enero

Año: 1980

ACTUAL: Categoría: Principal

Mes: agosto

Año: 1991

**3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA**

A) Evaluación de las propiedades antioxidantes, citotóxicas y farmacológicas de productos naturales.

A1) Determinación de la actividad citotóxica de extractos y compuestos de plantas nativas argentinas y sudamericanas en un modelo de células en cultivo.

A2) Caracterización de extractos de yerba mate (*Ilex paraguariensis*), corozo (*Bactris guineensis*) y curuba (*Passiflora mollisima*) en actividad antioxidante y contenido de fenoles totales y flavonoides.

**4. DIRECTOR**

Apellido y Nombre (s): Buschiazzo, Héctor O.

Cargo Institución: Profesor Extraordinario Consulto. Fac. Cs. Médicas UNLP.

Dirección: Calles 60 y 120

S/Nº

Ciudad: La Plata

C. P.: 1900 Prov.: Bs. As. Tel.: 421 69 32 Dirección Electrónica:

**5. LUGAR DE TRABAJO**

Institución: Universidad Nacional de La Plata

Dependencia: Cátedra de Farmacología Básica. Facultad de Ciencias Médicas

Dirección: Calles 60 y 120

Ciudad: La Plata

C. P.: 1900

Prov.: Bs. As.

Tel: 421 6932

## 6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre: Universidad Nacional de La Plata

Dependencia: Facultad de Ciencias Exactas – Departamento de Ciencias Biológicas.

Asignatura: Elementos de Farmacología.

Dirección: Calles 47 y 115

Ciudad: La Plata C. P.: 1900 Prov.: Bs. As.

Cargo que ocupa: Profesor Adjunto dedicación simple

## 7. Propósito general.

Este trabajo es parte de un proyecto general que pretende evaluar distintas propiedades farmacológicas o toxicológicas de extractos de productos naturales de uso frecuente en comunidades sudamericanas.

### A1.Introducción

Existe evidencia sobre los beneficios del consumo de dietas ricas en frutas y vegetales y de una moderada cantidad de vinos tintos en situaciones de salud asociadas a la producción de riesgo oxidativo (enfermedad cardiovascular, diabetes, inflamación, enfermedades degenerativas) <sup>(1,2)</sup>.

Estos efectos protectores se atribuyen a la presencia en los productos consumidos popularmente, de compuestos con actividad antioxidante.

Estos productos son consumidos en forma habitual por gran parte de nuestra comunidad por lo que se hace necesario determinar, además de sus efectos antioxidantes, sus potenciales efectos farmacológicos o deletéreos sobre diferentes estructuras celulares.

En informes previos hemos comunicado la actividad antioxidante de diferentes extractos obtenidos de plantas nativas argentinas así como de vinos de distintas regiones del país.

En este período se continuó con el estudio de dicha actividad y la probable acción citotóxica de algunos extractos. Asimismo se procedió a la caracterización en polifenoles de un extracto de yerba mate administrado a animales experimentales (ver detalles mas adelante) y la determinación de la actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de jugos obtenidos de frutos de dos plantas colombianas.

### 7.1 Actividad antioxidante y citotóxica de productos naturales de uso popular

Evaluación de la citotoxicidad de extractos de productos naturales en células en cultivo

Este trabajo se realiza en colaboración con los Dres. Félix Vega Lisi y Juan Rubiolo de los Departamentos de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela, España. Se habían realizado estudios preliminares con extractos de las plantas *Ilex paraguariensis* (yerba mate), *Hypericum connatum* (cabotoril) y *Satureja parvifolia* (muña muña) utilizados en la medicina popular como estimulante, vasodilatador o reductor de peso corporal entre otras (mate); cardiotónico (cabotoril) y antirreumático, espasmolítico o afrodisíaco (muña muña) que habían mostrado

previamente significativa acción antioxidante en diferentes modelos experimentales.<sup>3,4</sup> En estos estudios se evalúa la actividad citotóxica utilizando como modelos de trabajo hepatocitos primarios de rata en cultivo y células epiteliales obtenidas de un carcinoma hepatocelular humano. (Hep G2 (ATCC<sup>®</sup> HB-8065<sup>™</sup>) determinando el efecto de los extractos sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo, la inducción de apoptosis mediante la actividad de caspasa 3 mediante espectrofluorimetría y el efecto sobre la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción del MTT.

La capacidad antioxidante de los mismos se ensayó utilizando diferentes modelos experimentales “in vitro”: capacidad de captación de radicales libres estables (ensayos ABTS y DPPH.)<sup>5,6</sup> y poder reductor (ensayo FRAP)<sup>7</sup>. Se determina también el contenido de fenoles totales de los 3 extractos.

## Metodología

### Preparación de los extractos

Como se describió previamente, en la preparación de los extractos se utilizaron muestras de las diferentes especies obtenidas de productos comerciales (cabotoril y muña muña ;Almacén Natural Prama, Villa de las Rosas, Córdoba, Yerba mate: Establecimiento Las Marías, Corrientes ). Las muestras estaban libres de conservantes y fueron utilizadas dentro de los tres meses de su adquisición. En la preparación de los extractos se tuvo en cuenta la forma y concentración en que los vegetales son consumidos por la población, en estos casos en forma de infusiones al 10%.

Los preparados fueron liofilizados y mantenidos a -20°C hasta su utilización cuando se redisuelven en agua bidestilada a una concentración de 10mg/mL.

El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin Ciocalteu<sup>8</sup>

### Caracterización de los extractos

Extractos de:	ABTS*	DPPH*	FRAP**	Fenoles***
Cabotoril	1121 ± 15	442 ± 21	1390 ± 120	368 ± 27
Muña muña	801 ± 40	370 ± 39	1600 ± 175	342 ± 21

\* µg equivalentes de Trolox /mg extracto seco.

\*\* µmoles equivalentes de ácido ascórbico/mg extracto seco

\*\*\* µmoles equivalentes de ácido gálico / mg extracto seco.

<sup>a</sup> Los valores son promedios de 4 determinaciones.

El extracto de **yerba mate** se caracterizó según los siguientes valores

Fenoles totales	18 mg EQ ácido gálico/mg extracto
ABTS <sup>++</sup>	6 mg EQ ácido gálico/mg extracto
FRAP	33 mg EQ ácido ascórbico/mg extracto

### Estudio de la citotoxicidad de los extractos

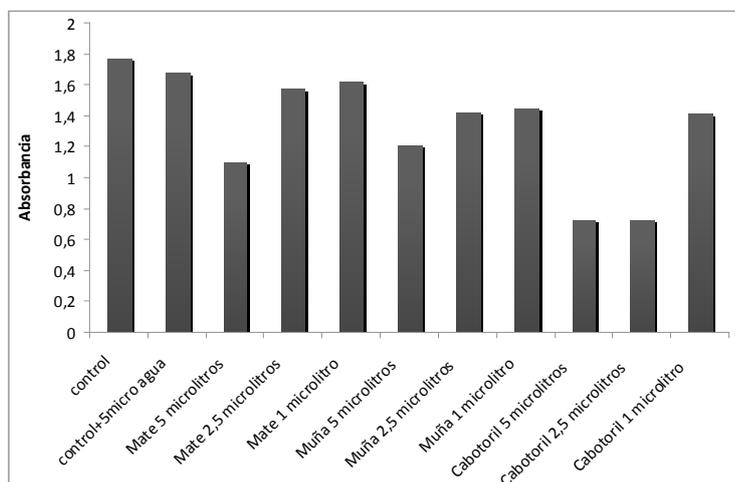
En la primera etapa se evaluó la actividad citotóxica de los 3 extractos sobre las células HepG2 obtenidas de un carcinoma hepatocelular humano.

Brevemente, las células se siembran en placas de 96 wells (20000/well) en 100µL de medio de cultivo<sup>9</sup> Luego de 24 horas las células se tratan con los diferentes extractos (1,2.5, 5µL) y se incuban durante 48 horas. La viabilidad se determina mediante el ensayo de reducción del colorante 3-(4,5-

dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT). El ensayo se basa en la reducción del MTT por deshidrogenadas mitocondriales a un producto azul violáceo (formazán) que se determina espectrofotométricamente a 570 nm previa disolución en SDS-HCl <sup>10</sup>.

## Resultados preliminares

Tabla 1.-Efecto de los extractos de yerba mate, muña muña y cabotoril sobre la reducción del reactivo MTT



Estos resultados preliminares permitieron sugerir que el extracto de *Hypericum connatum* ejercería un marcado efecto citotóxico dosis dependiente frente a la línea celular utilizada.

En estudios posteriores realizados con concentraciones mas bajas (1, 10, 50 µg/mL) no se pudo confirmar esta acción, debido probablemente a una acción tóxica inespecífica del extracto o a la estabilidad del mismo. Se prepararán nuevos extractos para confirmar los resultados.

## Estudios de citotoxicidad de otros compuestos antioxidantes

### Isoespintanol

El isoespintanol (2-Isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol) es un monofenol extraído del extracto etéreo de las hojas de *Oxandra cf xylopioides* (Annonaceae). Se encontró que este compuesto poseía actividad antiinflamatoria en la inflamación inducida por carragenina, en las patas de ratones.

Además, redujo la producción de IL-1 $\beta$  (interleuquinas) en un 72 % e inhibió significativamente la síntesis de mRNA de IL-1 $\beta$ . Por otra parte, el isoespintanol, teórica y experimentalmente, se comportó como mejor captador de radicales y mejor reductor que el timol (análogo biosintético). Debido al alto porcentaje encontrado en la planta para un producto natural como el isoespintanol (1.5%) y sus características estructurales se comporta como un antioxidante promisorio para usar en diferentes medios. (Actividad antioxidante del Isoespintanol en diferentes medios)

(Antioxidant Activity of the Isoespintanol in different media)

Benjamín A. Rojano., Carlos A. Gaviria., Maritza A. Gil., Jairo Saez., Guillermo Schinella y Horacio Tournier. VITAE, (2008) 15 (1) 173-181)

Este compuesto está siendo estudiado para determinar su citotoxicidad en el modelo antes descripto.

## Referencias

- 1.- Gutteridge, J.M., & Halliwell, B. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspec* 102 Suppl 10: 5-12.
- 2.- Aruoma, O.I, Bahorun., T & Jen, L.S. (2003). Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutat Res* 544: 203-215.
- 3.- Bracesco, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T and Gugliucci, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview *Journal of Ethnopharmacology* 136 (2011) 378– 384
4. Martín Dadé, Daniel Fioravanti, Guillermo Schinella Horacio Tournier (2009). Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina). *BLACMA (Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas)*, 8 (6), 529 - 539
- 5.- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). *Lebensm.-Wiss u. – Technol.* 28:25-30.
- 6.- Pannala, A.s, Rice-Evans, C.A, Halliwell, B and Sing, S. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1997); 232:164-168.
- 7.- Benzie, I, Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power". The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-6
- 8.- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158
- 9.- J.A. Rubiolo, H. López-Alonso, F.V. Vega, M.R. Vieytes, L.M. Botana J. Rubiolo .(2012) Comparative study of toxicological and cell cycle effects of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in primary rat hepatocytes *Life Sciences*; **90**, 416–423
- 10.- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*; 65: 55–63

### **7.2 Caracterización de extractos de corozo (*Bactris guineensis*) y curuba (*Passiflora mollisima*) en su capacidad antioxidante y su contenido de fenoles totales.**

Este trabajo se realiza en un marco de cooperación con el Dr. Benjamin Rojano, director del Laboratorio de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín) Las culturas tradicionales e indígenas han tenido una gran influencia en la ingesta alimentaria de los países latinoamericanos, especialmente en el consumo de frutas y vegetales, los cuales se usan directamente, como jugos o tras la obtención de extractos (infusiones, decocciones, etc.). Actualmente productos de ciertos frutos son consumidos como confituras, dulces artesanales y como bebidas alcohólicas. En el Caribe colombiano dos de estos frutos cuyo consumo se ha ido incrementando son corozo (*Bactris guineensis*) y curuba (*Passiflora mollisima*).

El *objetivo* de este trabajo fue evaluar la actividad antioxidante total y el contenido de fenoles totales de jugos obtenidos de corozo y curuba.

*Metodología:* Los extractos acuosos de las plantas tropicales fueron provistos por el Dr. Benjamín Rojano. Los extractos evaluados son liofilizados de jugo de corozo y curuba. Se midió la actividad antioxidante total de los extractos determinando la actividad decolorante de los radicales libres

estables, ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>, el poder reductor de los extractos mediante el ensayo FRAP y el contenido de fenoles totales mediante el ensayo de Folin Ciocalteau.

#### Resultados:

	EQ µg AG/mg extracto			
	FT	FRAP	DPPH	ABTS
Corozo	79,4	17,4	19,6	2796
Curuba	86,1	27,9	30,1	5390

Los resultados sugieren que los extractos de los frutos de las dos especies estudiadas constituyen una fuente muy considerable para el aporte de compuestos que pueden colaborar con la defensa antioxidante del organismo humano.

### 7.3 Insulinorresistencia: Efecto de un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* (yerba mate).

Este trabajo se lleva a cabo conjuntamente con el Dr. Flavio Francini perteneciente al CENEXA - Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP.

La administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) a ratas normales genera disfunción metabólica hepática e insulinorresistencia (IR) con aumento de marcadores de estrés oxidativo y de inflamación. La infusión de yerba mate, de reconocida actividad antioxidante, fue seleccionada con el objetivo de estudiar sus potenciales efectos para corregir las alteraciones endocrino-metabólicas producidas por la sacarosa.

El *objetivo* de este trabajo fue evaluar el efecto de un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* (yerba mate) sobre las alteraciones endocrino-metabólicas inducidas por la DRS.

*Metodología:* Se preparó el extracto acuoso de yerba mate a partir de una muestra comercial. Se realizó una infusión al 2% con agua corriente. Se utilizaron ratas macho Wistar normales (180-200 g) alimentadas con dieta comercial estándar. Los tratamientos realizados fueron a través del agua de bebida: 1) agua corriente (control [C]); 2) solución acuosa sacarosa 10% (control sacarosa [S]; 3) yerba mate 2% (yerba mate [CY]) y 4) yerba mate 2% con 10% de sacarosa 10% (yerba mate +sacarosa [SY]). Los animales (n= 8/lote) se sacrificaron a los 35 días de tratamiento y se midió: glucemia (Kit comercial), trigliceridemia (TG) (Kit comercial), insulinemia (RIA), leptinemia (RIA), ácidos grasos libres plasmáticos (Kit comercial), daño oxidativo, glucógeno hepático e indicadores histológicos de inflamación (microscopía óptica / tinción con hematoxilina y eosina).

En este contexto se caracterizaron los extractivos de yerba mate en su contenido de fenoles totales (método de Folin) y flavonoides (método del AlCl<sub>3</sub>) y se confirmó la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH y el poder reductor (método FRAP). Ácido gálico y rutina se utilizaron como compuestos de referencia.

#### Resultados:

Contenido de Fenoles totales: **24.1 µmoles equiv. Ácido gálico / mL extracto**  
 Contenido de flavonoides: **75.9 µmoles equiv. Rutina / mL extracto**  
 Captación del radical DPPH: **7.35 nmoles equiv. Ácido gálico / mL extracto**  
 Poder reductor: **3.83 µmoles equiv. Ácido gálico / mL extracto**

#### 7.4 Trabajo proyectado:

Actualmente, es posible encontrar en el mercado alimentario varios productos, teóricamente nuevos que resaltan sus propiedades nutritivas y antioxidantes. La expansión del mercado global y la competencia entre industrias alimentarias generan entre los consumidores expectativas de encontrar productos ya preparados y fáciles de consumir que podrían aportar al organismo compuestos con similares nutrientes que los alimentos tradicionales.

El conocimiento de los perfiles antioxidantes de tales productos comerciales es importante para establecer comparaciones y obtener información sobre el verdadero valor nutricional de los mismos. En este contexto, en el siguiente período se tratará de evaluar la actividad antioxidante y caracterizar en contenido de polifenoles y vitamina C de muestras de determinados productos comerciales ( los llamados jugos frutales en sus diferentes versiones, diferentes productos para la preparación de infusiones y suplementos dietarios que aportarían compuestos con actividad antioxidante. Las muestras se tomarán de productos en venta en supermercados locales y el procesamiento se llevará a cabo en forma inmediata en caso de muestras líquidas o previa preparación de un extracto en caso de muestras sólidas

Como en actividades anteriores la metodología del trabajo contemplará el uso de modelos de captación de radicales libres (ABTS), medida de la capacidad reductora (FRAP). Y el contenido de fenoles totales y de ácido ascórbico por métodos iodométricos, ( A. Costa y col. LWT-Food Science and Technology, **49** (2012) 324-328).

### 8. OTRAS ACTIVIDADES

#### 8.1 Publicaciones

Schinella G, Neyret E, Cónsole G, **Tournier H**, Prieto JM, Ríos JL, Giner R. An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of COX-2 and iNOS in animal models of inflammation. *Planta Med.* 2014; 80(12):961-968. Epub 2014 Aug 4.

#### 8.2 Comunicaciones

Schinella G, Neyret E, **Tournier H**, Prieto J, Ríos J, Giner R. Efecto antiinflamatorio de un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis*.

LVIII Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión científica anual 2013 de la Sociedad Argentina de Fisiología, XLV Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Mar del Plata, Argentina. 20-23 de noviembre 2013. *Medicina (Buenos Aires)* 73 (Supl. III): 152; 2013.

### 9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

Las correspondientes al cargo de Profesor Adjunto de Elementos de Farmacología en la Facultad de Ciencias Exactas. UNLP

Ellas consistieron en:

- Dictado de las clases teóricas y la realización de actividades de taller.
- Responsable de la elaboración y corrección de los exámenes de la materia
- Confección de guías para el aprendizaje de diferentes temas farmacológicos.
- Presidente de la mesa de examen final de la materia.

## RESUMEN DE CONGRESO

LVIII Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión científica anual 2013 de la Sociedad Argentina de Fisiología, XLV Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Mar del Plata, Argentina. 20-23 de noviembre 2013. Medicina (Buenos Aires) 73 (Supl. III): 273; 2013.

**EFFECTO ANTIINFLAMATORIO DE UN EXTRACTO ACUOSO DE ILEX PARAGUARIENSIS**  
Guillermo Schinella, Elisa Neyret, Horacio Tournier, José Ma. Prieto, José L. Ríos, Rosa Giner.

Facultad de Ciencias Médicas. UNLP; CIC-PBA, Argentina; Universitat de Valencia, España; University College of London, UK. E-mail de contacto: Guillermo Schinella <schinell@uv.es>

**Introducción:** La infusión de hojas secas y picadas de *Ilex paraguariensis* –yerba mate- (YM) es la bebida tradicional que se utiliza como fuente de cafeína, con una importante función social y ritual. En los últimos años, un gran número de publicaciones científicas demostraron sus efectos antioxidantes, cardiovasculares, antimutagénicos, reductores de peso corporal, etc., en diferentes modelos experimentales.

**Objetivo:** Estudiar el efecto antiinflamatorio de *I. paraguariensis* en un modelo in vivo

**Metodología:** El extracto acuoso YM se preparó, a partir de material vegetal comercial, como una infusión al 5% p/v, se liofilizó y se almaceno a -20C hasta su uso. Se caracterizó su composición química mediante HPLC-DAD. Se utilizaron ratones machos Swiss. Se evaluó la actividad antiinflamatoria mediante el modelos experimental de inflamación aguda del edema plantar inducido por carragenina. Se determinó la actividad de mieloperoxidasa (MPO) en patas de animales tratados y controles para estimar la infiltración leucocitaria en el sitio de inflamación. En homogenatos de las patas se determinó la expresión de COX2 e iNOS mediante western blot.

**Resultados:** La administración oral de YM reduce de forma dosis dependiente el edema plantar inducido por carragenina. YM a la dosis de 250 mg/kg reduce significativamente el edema con una inhibición de 53% a las 3 h. Tanto YM (250 mg/kg) como la indometacina (10 mg/kg) inhiben significativamente la infiltración leucocitaria en el tejido después de 5 h de la inyección plantar de carragenina en un 24%. El análisis de western blot del efecto del YM en el tejido plantar inflamado, 5 h después de la inyección de carragenina, muestra que se produce un 43% y 53% de inhibición la expresión de COX-2 e iNOS respectivamente, valores ligeramente inferiores a los obtenidos para la indometacina.

**Conclusión:** Un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* –yerba mate- posee actividad antiinflamatoria en un procesos de inflamación aguda.