

Caracterización farmacognostica y Actividad fotodinámica sobre especies Argentinas de *Bidens Kunth* (HELIANTHEAE- ASTERACEAE)

Pascuali, Marcos; Cardoso-Schiavi, Paulina; Funes, Matías; Petenatti, Elisa; Maximiliano Sortino#.

marcospascuali44@gmail.com; paulinacardososchiavi@gmail.com;

matiasdfunes@gmail.com; empetenatti@gmail.com; mstortino@fbioyf.unr.edu.ar

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional de San Luis, Argentina

Universidad Nacional de Rosario, Argentina

Resumen

La urgencia por encontrar nuevos antimicrobianos ha llevado a los científicos a desarrollar nuevas alternativas terapéuticas que permitan bajar la carga microbiana empleando compuestos fotoactivos vegetales o extractos de alta fototoxicidad, esta técnica se llama Inactivación fotodinámica de microorganismos o PDI por sus siglas en inglés del término Photodynamic Inactivation.

Por lo dicho, el objetivo principal de este trabajo es el de caracterizar plantas del género *Bidens* cuyos metabolitos secundarios o extractos tengan un potencial fotoinactivante alto sobre levaduras.

La caracterización del género *Bidens* nos permitió identificar parámetros macro- y micrográficos cuali- y cuantitativos, aplicando métodos de estudio macro-/micromorfológicos y taxonómicos. Además se pudo determinar que el alto potencial fotoinactivante de extractos de diferente polaridad de *Bidens triplinervia* var. *macrantha*, *B. pilosa*, *B. subalternans* var. *subalternans* y *B. subalternans* var. *simulans*, sobre levaduras como *Cándida albicans*, *Cándida parapsilosis*, *Cándida tropicalis*, *Cándida krusei* y *Cándida glabrata*. Para tal fin, se utilizó microdilución en caldo con posterior exposición a luz UVA.

También, a partir de los datos cromatográficos y espectroscópicos se pudo determinar que el género *Bidens* contiene compuestos fotoactivos del tipo tiofénicos, poliacetilénicos o moléculas combinadas con ambos sustituyentes. De lo observado se puede concluir que los diferentes extractos de género *Bidens*, presentan en su matriz, una mezcla de diferentes compuestos fotoactivos capaces de fotosensibilizar eficientemente levaduras del tipo *Cándidas*.

Palabras clave: *Bidens kunt*, Inactivación Fotodinámica, *Cándida*.

Introducción

El hallazgo de agentes antimicrobianos novedosos se ha convertido en un objetivo prioritario para el sistema científico, en busca de nuevas alternativas terapéuticas para la inactivación de microorganismos patógenos ante el registro cada vez más frecuente de resistencia a los agentes químicos tradicionales. Las infecciones fúngicas y bacterianas han aumentado dramáticamente en las últimas décadas, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (tratados con quimioterapias, trasplantes, SIDA, etc.). La medicina ha hecho colosales esfuerzos para lograr la sobrevivencia de los mismos, pero lamentablemente un alto porcentaje de ellos muere debido a infecciones fúngicas^[i] y/o bacterianas. Las drogas disponibles para el tratamiento de micosis superficiales o sistémicas exhiben una alta toxicidad, producen recurrencia o conducen al desarrollo de resistencia por parte de los agentes patógenos^[ii], por lo cual urge la necesidad de contar con nuevos compuestos "líderes" más eficaces y seguros, transformándose en un grave problema en la Salud Pública ya que limita las opciones terapéuticas existentes. La Inactivación Fotodinámica (photodynamic inactivation, PDI por sus siglas en inglés) es una de las alternativas más

prometedoras, ya que se basa en la administración de un agente fotosensibilizador (PS) que se acumula preferencialmente en las células microbianas; la posterior irradiación con luz UV en presencia de oxígeno, produce daño celular en forma inespecífica, ocasionando la muerte de los microorganismos, con muchas ventajas frente a los tratamientos tradicionales, tales como amplio espectro de acción, baja probabilidad de generación de cepas fotoresistentes, mínimo daño a tejidos sanos del hospedero, compatibilidad con terapias convencionales, etc. La eficiencia de la PDI depende de la efectividad de los procesos oxidativos que ocurren durante su aplicación, que determinan la destrucción de diferentes tipos de células. El reto principal en el campo de la PDI es obtener PS naturales que puedan ser empleados en forma segura en la terapia de diversas patologías de etiología microbiana. De las distintas fuentes a partir de las cuales se pueden obtener PS para PDI, los extractos y/o metabolitos obtenidos de plantas constituyen una valiosa materia prima, dada su alta diversidad. Algunos PS extraídos de plantas, por ejemplo, la clorofila y sus derivados, han sido empleados en tratamientos contra el cáncer mediante terapia fotodinámica ^[iii, iv]. Otros PS hallados en plantas son poliacetilénidos, poliacetilenos, tiofenos, cumarinas⁷ y

furanocumarinas [v,vi]. Algunas antraquinonas obtenidas de extractos de *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) fueron empleadas como PS naturales en PDT involucrando la fotoinactivación de bacterias y hongos [vii, viii, ix, x, xi, xii, xiii]. También se ha utilizado derivados de porfirinas y poliméricos sobre *Cándida albicans* y sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* [xiv, xv]. Extractos de especies de la familia Asteraceae (*Carthamus tinctorius* L., *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC, *Eclipta alba* (L.), *Bidens pilosa* L. y *Chrysanthemum leucanthemum* L.) demostraron fotoactividad frente a *Cándida albicans* en presencia de luz UV-A (320-400 nm) debido a la presencia de compuestos poliacetilenos y tiofénicos [xvi]. No obstante, los estudios de productos naturales para fotoinactivación microbiana son aun escasos en el país, por lo que el abordaje de plantas medicinales nativas se toma imprescindible para el hallazgo de nuevos productos para PDT. De allí la importancia del conocimiento de la diversidad de la Flora argentina, en cuanto a las plantas medicinales se refiere, que han sido y son una importante fuente de extractos/metabolitos bioactivos, proporcionando una inestimable oportunidad para el aislamiento de nuevas moléculas antimicrobianas. La familia de plantas Asteraceae es la de mayor diversidad a nivel mundial, comprendiendo

más de 1.700 géneros y unas 30.000 especies distribuidas por todo el mundo (excepto la Antártida), muchas de ellas endémicas. En Argentina se encuentran 1.300 especies nativas, de las que 380 son endémicas [xvii]. En la región centro-oeste del país habitan cerca de medio millar de ellas, en buena parte con amplio uso en la medicina popular para afecciones de la piel como vulnerarias, antimicrobianas, antisépticas, entre otras, lo que la hacen un interesante objeto de estudio para la obtención de PS naturales. La temática abordada es novedosa para nuestro país especialmente en el abordaje de inactivación fotodinámica en productos naturales (extractos/metabolitos) con especial énfasis en establecer las bases para que, en un futuro cercano, empresas regionales puedan utilizar los productos promisorios obtenidos, en la producción de medicamentos herbarios tópicos, con aplicaciones en diversas afecciones de la piel (particularmente acné, vitíligo, psoriasis, etc.). Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo y resultados de búsquedas bibliográficas, mostraron que las especies del genero *Bidens* tienen escasos estudios previos, lo que la hacen un interesante objetivo de estudio.

Objetivos

Llevar a cabo una exhaustiva búsqueda de metabolitos fotosensibilizantes (FS) naturales en especies nativas del género

Bidens Kunth (Heliantheae, Asteroideae, Asteraceae) de la flora argentina, con uso etnofarmacológico y contribuir a la caracterización micrográfica, fitoquímica y determinación de la actividad fototóxica (antifúngica y antibacteriana) de dichas especies para potencial aplicación en Terapia Fotodinámica.

Materiales y Métodos

a) Selección de las especies vegetales: durante la bioprospección se localizaron las poblaciones naturales de especies del género *Bidens* y se colectaron partes aéreas (hojas, flores, frutos) y subterráneas (raíces y rizomas). Los voucher specimens fueron depositados en el Herbario de la Universidad Nacional de San Luis (UNSL). De cada especie y población muestreada se consignó: número de registro, fecha, localidad, georreferenciación (GPS), estado fenológico, condiciones climáticas y edáficas del sitio, parte/s recolectada/s, información etnobotánica y otras observaciones de campo, etc.

b) Preparación de extractos y obtención de metabolitos fotosensibles: Las partes aéreas y subterráneas fueron secadas a T° amb., molidas y extraídas sucesivamente (96 h x3) a 25°C con Hex, DCM, Éter, AcO y MeOH, filtrando posteriormente y llevando a sequedad a presión reducida, obteniéndose los extractos correspondientes. Se calculó el

rendimiento porcentual respecto de cada material de partida. De estos se obtuvieron los respectivos espectros ultravioleta (UVA). La actividad fototóxica fue probada frente a *C. albicans*, *Cándida parapsilosis*, *Cándida tropicalis*, *Cándida krusei* y *Cándida glabrata*, además de ser caracterizados por HPLC en fase reversa determinándose los compuestos mayoritarios.

b) Ensayo biológico: Microdilución en caldo: Se siguió el método recomendado por NCCLS [xviii-xix]. Se utilizó un panel de hongos estandarizados de American Type Culture Collection (ATCC) y aislados clínicos de CEREMIC (Centro de Referencia Micológica, UNRosario). Se trabajó con *C. albicans*, utilizando los inóculos cuantificados de acuerdo con los lineamientos del CLSI. Se emplearon microplacas estériles de 96 pocillos y el medio de cultivo fue RPMI-1640, tamponado a pH 7,0 ± 0,1 con MOPS [ácido3-(N-morfolino propano) sulfónico] a una concentración de 0,165 M y con el agregado de glucosa 10% P/V. Se ensayaron concentraciones desde 1000-0,98 µg/mL para extractos. Los controles positivos fueron diferentes antifúngicos comerciales y se realizaron los controles de calidad recomendados por las metodologías, controles de viabilidad de los inóculos (CC), de esterilidad de las soluciones de los compuestos (CEC) y de esterilidad del medio de cultivo (CE). Las

determinaciones se realizaron por triplicado. Se obtuvieron las CIM₁₀₀ (inhibición total de crecimiento). También la Concentración Fungicida Mínima (CFM), tomando alícuotas de 50 µL y sembrándolas en placas de Petri conteniendo medio Sabouraud-agar. Se incubó por 24 h a 28 °C y se determinó las Unidades Formadoras de Colonias/mL (UFC/mL) y se pudo definir la CFM como la mínima concentración con UFC/mL = 0. Una de las microplacas se irradió con luz de una determinada longitud de onda por 1h previo a la incubación, mientras que la otra permaneció en oscuridad. Aquellos compuestos que exhibieron actividad solamente bajo irradiación se consideraron como FS.

Resultados y Discusión

a) Selección de las especies vegetales:

Durante la bioprospección se localizó las poblaciones naturales de las especies en estudio. Se recolectaron partes aéreas (hojas, flores, frutos) y subterráneas (raíces y rizomas) de *Bidens triplinervia* Kunth var. *macrantha* (Wedd.) Sherff, *B. pilosa* L., *B. subalternans* DC. var. *subalternans* y *B. subalternans* DC. var. *simulans* Sherff. Se procedió a identificar las mismas mediante la metodología taxonómica clásica, a través del uso de claves, descripciones e iconografía, documentando las mismas y depositando un ejemplar de herbario (*voucher*) de cada

una en el Herbario de la Universidad Nacional de San Luis (UNSL). De cada especie y población muestreada se consignó: número de registro, fecha, localidad, georreferenciación (GPS), parte/s recolectada/s, información etnobotánica y otras observaciones de campo, etc.

La caracterización macromorfológica, micromorfológica (Tabla 1) sumada a la medición de los parámetros micrográficos (Tabla 2); entre ellos n° de estomas, índice de estomas, índice en empalizada, n° de islotes y n° de terminales de nerviación, permiten una clara diferenciación entre cada una de las especies entre las especies estudiadas del género *Bidens* fundamentales para caracterizar dichas especies y así contribuir a un efectivo control de calidad de las drogas crudas y medicamentos herbarios que los contengan.

Tabla 1

PARAMETROS MICROMORFOLOGICOS						
	Número de estratos pericquima clorofiliano	Corte caulinar	Tricomas	Endodermis	Drusas de Oxalato de Calcio	Canales secretores
<i>Bidens pilosa</i>	1	cuadrangular	6	amiflora	+	Canales en epidermis superior
<i>Bidens subalternans</i> var. <i>subalternans</i>	1-2	hexagonal	6-7	amiflora	+	Canales en epidermis superior
<i>Bidens subalternans</i> var. <i>simulans</i>	1	cuadrangular	8	-	-	Canales en epidermis superior
<i>Bidens triplinervia</i> var. <i>macrantha</i>	2-3 estratos de p. empalizada	Terete	4-5	-	-	Canales en epidermis superior-inferior

Tabla 2

PARAMETROS MICROGRAFICOS							
	Nº de estomas epidermis superior	Nº de estomas epidermis inferior	Índice de estomas epidermis superior	Índice de estomas epidermis inferior	Índice de empalizada (Remp)	Nº de islotes	Nº de terminales de nervi acción
<i>Bidens pilosa</i>	1,1 ± 0,99	9,5 ± 2,65	4,92 - 5,48	21,5 - 31,7	9,66 - 15,84	10	6
<i>Bidens subalternans</i> var. <i>subalternans</i>	2,5 ± 1,08	7,9 ± 1,47	7,26 - 19,32	14,24 - 20,72	9,02 - 11,18	7	5
<i>Bidens subalternans</i> var. <i>simulans</i>	12 ± 1,88	20,7 ± 2,7	21,9-29,46	27,99-37,57	5,05-6,40	9	17
<i>Bidens triplinervia</i> var. <i>macrantha</i>	4,2 ± 1,03	10,03 ± 2,35	11,66-18,28	19,64-33,84	1,71 - 2,79	7	12

b) Preparación de extractos y obtención de metabolitos fotosensibles

Preparación de extractos y obtención de metabolitos fotoactivos: el material vegetal seco molido y perfectamente pesado se extrajo a T amb. Sucesivamente con diclorometano (DCM), hexano (Hex), Eter sulfúrico (Etéreo), Acetato de Etilo (EtAc) y metanol (MeOH), filtrando posteriormente. Se llevó cada uno a sequedad a presión reducida, obteniéndose los extractos correspondientes. Se calculó el rendimiento porcentual respecto de cada material de partida.

Una vez obtenidos los extractos se empleó cromatografía en placa TLC (por sus siglas en inglés thin layer chromatography) con el fin de encontrar compuestos que pudieran fluorescentes al ser irradiados con luz UV. Debido a que se encontraron compuestos con estas características se procedió a la determinación de perfiles espectrales de cada uno de los extractos mediante Absorción UV-Vis, encontrándose que los

Ext. AcEt y MeOH, porción subterránea, presentan las bandas características de los compuestos de interés.

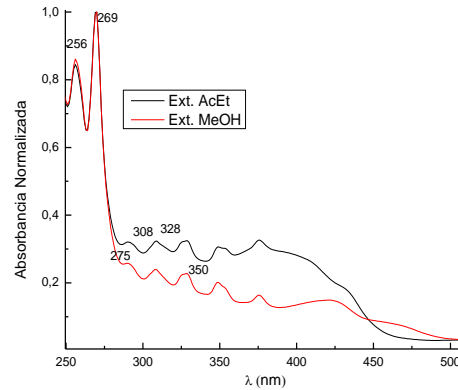


Figura 1. Espectros UV-Vis de extractos genero *Bidens*.

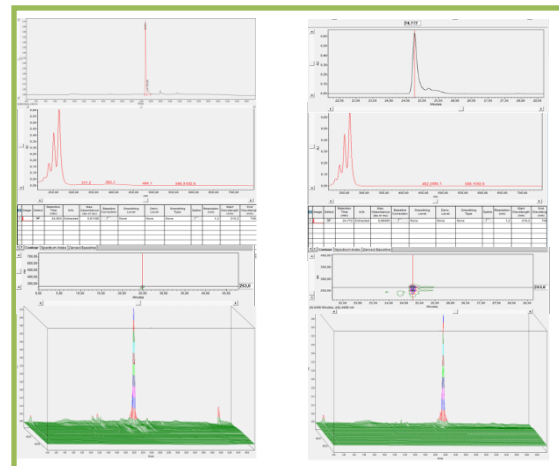


Figura 2. Cromatografía HPLC-DAD de extractos genero *Bidens*.

Empleando bioautografía, cromatografía HPLC-DAD y espectroscopia UV-Vis (Figura 1 y Figura 2) se puede predecir que los extractos están constituidos principalmente por un tipo de compuesto. En función de los máximos de absorbancia y los tiempos de retención obtenidos suponemos que los metabolitos constituyentes de los extractos pertenecen

a la familia de compuestos tiofénicos, poliacetilenos o moléculas conjugadas con ambos grupos funcionales.

Para llevar a cabo la bioautografía se empleó en primera instancia cromatografía en placa TLC (por sus siglas en inglés thin layer chromatography) usando de fase móvil Hexano: Acetato de Etilo en proporción 80:20, una vez obtenida la corrida se procedió a preparar un medio de cultivo (peptona de carne, glucosa, agar agar y rojo fenol) inoculando en el mismo *Cándida albicans* (5×10^5). Posterior al secado del mismo se vaporiza MTT incubando 1h para poder llegar al revelado de la misma

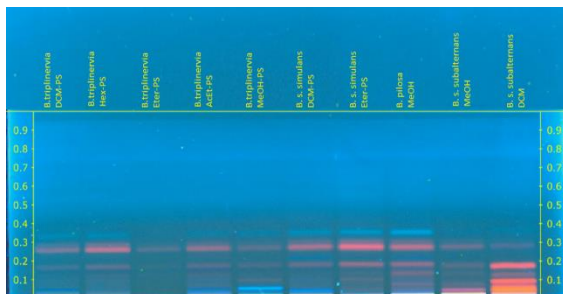


Figura 3. Técnica TLC bajo irradiación UVA de extractos género *Bidens* fotoactivos frente a *Cándida*.

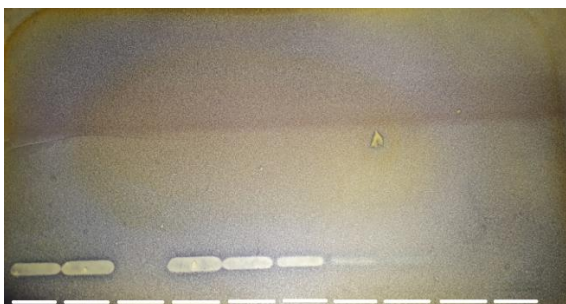


Figura 4. Técnica bioautografía posterior a exposición UVA, Porciones inhibidas de *Cándida*

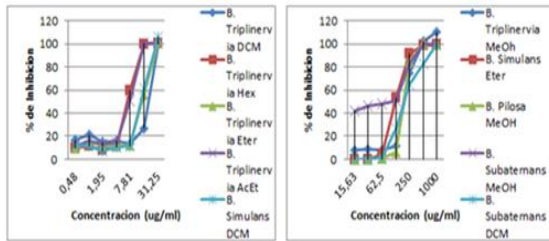
sobre placa TLC.

Se observa placa bajo irradiación UVA (Figura 3) y bioautografía finalizada (Figura 4) en donde se determinó claramente las porciones inhibidas sobre la misma; presentando todos los compuestos, unos más claros que otros, el mismo compuesto o mezcla de compuestos con características fotoinactivante.

c) Determinación de la actividad biológica de extractos de *Bidens*

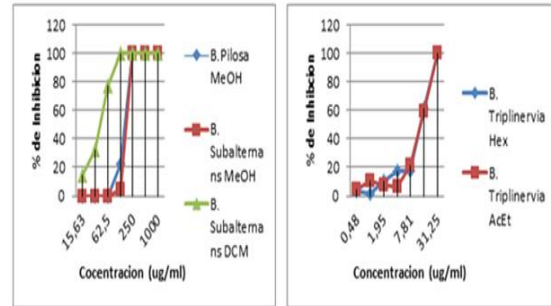
Se realizó la técnica de microdilución en caldo para determinar la actividad fototóxica de los extractos frente *C. albicans* (Figura 5), *C. krusei* (Figura 6), *C. parapsilosis* (Figura 7), *C. glabrata* (Figura 8) y *C. tropicalis* (Figura 9). Las placas de 96 pocillos se inocularon por duplicado, una fue irradiada mientras que la otra se mantuvo en oscuridad. El resultado de dicho estudio nos permitió asegurar que los extractos tanto subterráneos así como Aéreos produjeron la inactivación de esta levadura a CIM variables dependiendo el extracto así como la levadura, irradiando por 1 h.

Entendiéndose por CIM: mínima concentración de compuestos que inhibe el desarrollo fúngico y por CFM: concentración fungicida mínima.



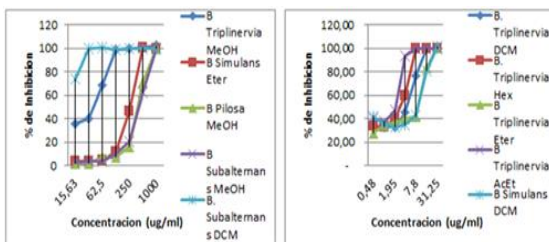
Cándida albicans		
Extracto	CIM (ug/ml)	CFM (ug/ml)
B. triplinervia DCM	31,25	31,25
B. triplinervia Hexano	15,62	31,25
B. triplinervia Eter	31,25	31,25
B. triplinervia AcEt	15,62	15,62
B. s. simulans DCM	31,25	31,25
B. Triplinervia MeOH	500	500
B. s. simulans Eter	500	1000
B. pilosa MeOH	500	1000
B. s. subalternans	500	500
B. s. subalternans	1000	1000

Figura 5. Representación gráfica % de inhibición *Cándida albicans* vs concentración de extractos con fotoactividad. Representación CIM y CFM correspondiente a cada extracto frente a *Cándida albicans*.



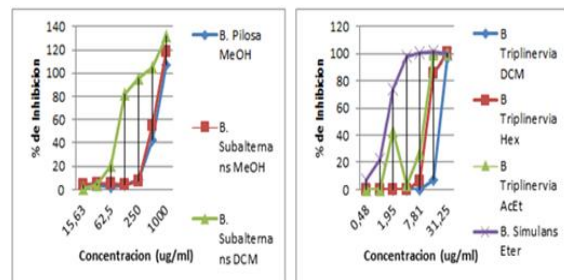
Candida parapsilosis		
Extracto	CIM (ug/ml)	CFM (ug/ml)
B. triplinervia Hexano	31,25	62,5
B. triplinervia AcEt	31,25	62,5
B. pilosa MeOH	250	250
B. s. subalternans MeOH	250	250
B. s. subalternans DCM	125	125

Figura 7. Representación gráfica % de inhibición *Cándida parapsilosis* vs concentración de extractos con fotoactividad. Representación CIM y CFM correspondiente a cada extracto frente a *Cándida parapsilosis*.



Cándida Krusei		
Extracto	CIM (ug/ml)	CFM (ug/ml)
B. triplinervia DCM	15,62	15,62
B. triplinervia Hexano	7,8	15,62
B. triplinervia Eter	31,25	31,25
B. triplinervia AcEt	7,8	15,62
B. s. subalternans DCM	31,25	31,25
B. triplinervia MeOH	125	125
B. s. simulans Eter	500	500
B. pilosa MeOH	1000	1000
B. s. subalternans MeOH	1000	1000
B. s. subalternans DCM	35,25	35,25

Figura 6. Representación gráfica % de inhibición *Cándida krusei* vs concentración de extractos con fotoactividad. Representación CIM y CFM correspondiente a cada extracto frente a *Cándida krusei*.



Cándida glabrata		
Extracto	CIM (ug/ml)	CFM (ug/ml)
B. triplinervia DCM	31,25	31,25
B. triplinervia Hexano	31,25	31,25
B. triplinervia AcEt	15,6	15,6
B. s. simulans Eter	3,90	7,81
B. pilosa MeOH	1000	1000
B. s. subalternans MeOH	1000	1000
B. s. subalternans DCM	1000	1000

Figura 8. Representación gráfica % de inhibición *Cándida glabrata* vs concentración de extractos con fotoactividad. Representación CIM y CFM correspondiente a cada extracto frente a *Cándida glabrata*.

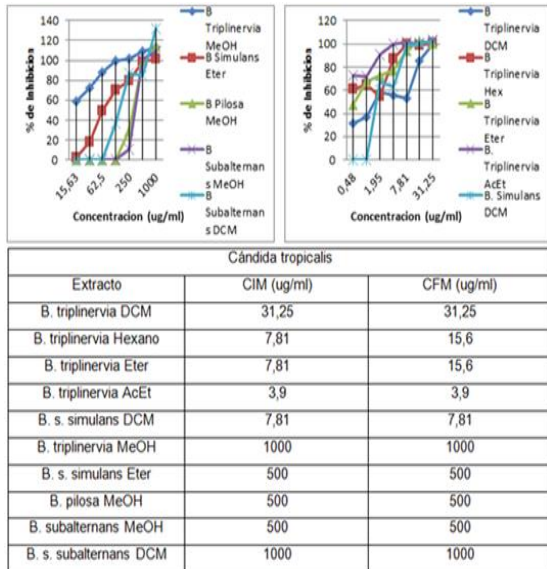


Figura 9. Representación gráfica % de inhibición *Cándida tropicalis* vs concentración de extractos con fotoactividad. Representación CIM y CFM correspondiente a cada extracto frente a *Cándida tropicalis*.

Conclusiones

De lo observado se puede concluir que los diferentes extractos de genero *Bindes* presentan en su matriz una mezcla de diferentes compuestos de los cuales uno, poliacetilenos, tiene características fotoactivas. Al enfrentarlos con *C. albicans*, *C. Krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, estos producen una inactivación de los microorganismo. Debido a todo esto, podemos considerar a los extractos de genero *Bindens* como potenciales anti fúngicos fotoactivos.

Bibliografía

- i Denning D (2004) Antifungals-Where are we headed? Drug Plus Intern 3: 11-13.

- ii San Blas G, G Niño Vega (2004). Morphogenesis in *Candida albicans* and in other agents of systemic micoses. En: Pathogenic fungi. Host Interactions and Emergin Strategies for Control; San Blas, G; Calderone, R. (eds.), Caister Academic Press (England). 167-220.
- iii Ochsner M (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 39 (1), 1-18.
- iv Hudson JB, GH Towers (1991) Therapeutic potential of plant photosensitizers, Pharmacol. Ther. 49, 181-222.
- v Agostinis P, A Vantieghem, W Merlevede, PA de Witte (2002) Hypericin in cancer treatment: more light on the way, Int. J. Biochem. Cell Biol. 34, 221-241.
- vi Pistelli L, A Bertoli, S Zucconelli, I Morelli, L Panizzi, F Menichini (2000) Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*, Fitoterapia 71, S138-S140.
- vii Engelhardt V, B Krammer, BK Plaetzer (2010) Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*, Photochem. Photobiol. Sci. 9, 365-369.

- viii Lopez-Chicon P., M. Paz-Cristobal, A. Rezusta, C. Aspiroz, M. Royo-Canas, E. Andres-Ciriano, Y. Gilaberte, M. Agut, S. Nonell (2012) On the mechanism of *Candida* spp. photoinactivation by hypericin, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 1099–1107.
- ix Postigo A, L Bulacio, M Sortino (2014) Photodynamic inactivation of oropharyngeal *Candida* strains, *Phytomedicine* 21, 11, 1424-1431.
- x Donnelly RF, McCarron PA, Tunney M, Woolfson D (2007) Potential of Photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth... *J. Photochem. Photobiol. B* 86, 59–69.
- xi Arnason T, Chan G F Q, Wat C K, Downum K, Towers GHN (2008) Oxygen Requirement for Near-UV Mediated Cytotoxicity of α -terthienyl to *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Photochem Photobiol* 33, 821–824. 1981.
- xii Silva NCC, Fernández JA (2010) Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 16:402-413.
- xiii Mattana C, Satorres S, Alcaraz L, Petenatti E, Del Vitto L, Laciari A (2012) Evaluation of the antibacterial properties of extracts obtained from native *Porophyllum lanceolatum* in San Luis, Argentina. *PhOL* 3: 162-166.
- xiv Quiroga ED, S J Mora, M G Alvarez, EN Durantini (2016) Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a tetracationic tentacle porphyrin and its analogue without intrinsic charges in presence of fluconazole, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 13, 334-340.
- xv Álvarez MG, MN Montes de Oca, ME Milanesio, CS Ortiz, EN Durantini (2014) Photodynamic properties and photoinactivation of *Candida albicans* mediated by brominated derivatives of triarylmethane and phenothiazinium dyes, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 11, 2, 148-155.
- xvi Wat, C.K. y col. (1980) *J Ethnopharmacol*, 2, 279.
- xvii Katinas L, DG Gutiérrez, MA Grossi, JV Crisci (2007) Panorama de la familia Asteraceae (=Compositae) en la Republica Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot* 42, 1-2, 113-129.
- xviii NCCLS, 27 A. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2nd. Ed., Wayne, Penn. (USA), 22 (15), 1-29. 2002.
- xix NCCLS, 38 A. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 2nd Ed. Wayne, Penn. (USA), 22 (16), 1-27. 2002.

Agradecimientos

CONICET, Área de Química Orgánica
FQByF-UNSL, Herbario de UNSL y Área
Farmacognosia Facultad de Ciencias
Bioquímicas y Farmacéuticas UNR.

Financiamiento

Proyecto 2-1014 SECyT-UNSL, "Estudios
Botánicos Regionales, en el Centro-Oeste
argentino" Director: Ing. Luis Angel Del
Vitto.

Proyecto PROIPRO-2018, "Tamizaje de
Productos Naturales vegetales
productores y atrapadores de especies
reactivas de Oxígeno y Nitrógeno para la
Obtención de potenciales antibióticos
fotoactivos y analgésicos "atípicos" de los
receptores opioides" Director Dr. Matías
Funes.