

Dominguezia

Museo de Farmacobotánica
"Juan A. Domínguez"

Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires



Marsdenia cundurango Rchb. f.

Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires

Propietario
Museo de Farmacobotánica
"Juan Aníbal Domínguez"

Dominguezia

Vol. 25(1) - 2009

Director Responsable:

Dr. Alberto Ángel Gurni

Comisión Redactora:

Farm. Carlos Agosto
Dr. Arnaldo L. Bandoni
Dr. Gustavo C. Giberti
Dr. Alberto A. Gurni
Dr. Marcelo L. Wagner

Comisión Científica Asesora:

Dr. Aníbal Amat (Universidad Nacional de Misiones, Argentina)
Dr. Pastor Arenas (Instituto de Botánica Darwinion, Argentina)
Dr. Néstor Caffini (Universidad Nacional de La Plata, Argentina)
Dra. María T. Camargo (Universidad de San Pablo, Brasil)
Dr. Rodolfo Campos (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dr. Salvador Cañigueral Folcará (Universidad de Barcelona, España)
Dr. Ramón A. de Torres (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dr. José Luis López (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dr. Eloi Mandrile (Universidad Nacional de La Plata, Argentina)
Dra. Marta Nájera (Universidad Nacional de La Plata, Argentina)
Dr. Rafael A. Ricco (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dr. Lionel G. Robineau (Universidad de las Antillas y de la Guyana)
Dr. Rubén V. Rondina (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dr. Otmaro Rosés (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dra. Etilde Spegazzini (Universidad Nacional de La Plata, Argentina)
Dr. Carlos Taira (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dra. María L. Tomaro (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dra. E. C. Villamil (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Editor Científico:

Dr. Marcelo Luis Wagner

Editora Asociada:

María Cristina Ratto de Sala

Edición patrocinada por la Secretaría de Extensión Universitaria
de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)
y financiada por la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Dominguezia se distribuye por canje con otras publicaciones dedicadas a temas afines.

This publication is sent to individuals or institutions by exchange with similar ones,
devoted to Pharmacobotany or related subjects.

Lámina de Tapa:
***Marsdenia cundurango* Rchb. f. –Asclepiadaceae–**

Lámina extraída de *Köhler's Atlas der Medizinal-Pflanzen* (1887-1889)

Incluida en el Directorio de LATINDEX
por el Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT - CONICET)
con el número de Folio 2787 Dominguezia,
y en Electronic Sites of Leading Botany, Plant Biology and Science Journals.
Providing links to the world's electronic journals.

Registro de la Propiedad Intelectual N° 611947.

Se terminó de editar en julio de 2009.

Índice de contenido

- Cambios anatómicos y estudios histoquímicos en las raíces de plantas micropropagadas del portainjertos de *Prunus* Gf 655/2** 5
Patricia E. Perelman y Cristina Dizeo de Strittmatter
- Análisis multivariado de las proteasas de la familia *Asclepiadaceae*** 13
Constanza Liggieri, Marina L. Sardi, David Obregón, Susana Morcelle del Valle y Nora Priolo
- Flavonoides de especies argentinas del género *Tripodanthus* (Eichl.) Tiegh. (Loranthaceae)** 21
Marcelo L. Wagner, Rafael A. Ricco, Fernando G. Ranea y Alberto A. Gurni

Index

- Anatomic changes and histochemical study in the roots of micropropagated plants of *Prunus insititia* GF 655/2 microshoots** 5
Patricia E. Perelman and Cristina Dizeo de Strittmatter
- Multivariate analysis from proteases of *Asclepiadaceae* family** 13
Constanza Liggieri, Marina L. Sardi, David Obregón, Susana Morcelle del Valle and Nora Priolo
- Flavonoids from argentine species of *Tripodanthus* (Eichl.) Tiegh. (Loranthaceae)** 21
Marcelo L. Wagner, Rafael A. Ricco, Fernando G. Ranea and Alberto A. Gurni

Cambios anatómicos y estudios histoquímicos en las raíces de plantas micropropagadas del portainjertos de *Prunus* Gf 655/2

Patricia E. Perelman^{1,2*} y Cristina Dizeo de Strittmatter³

¹ Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (Conicet). Av. Ángel Gallardo 470 (C1405DJR) CABA, República Argentina.

² Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Junín 956 (1113) CABA, República Argentina.

³ CEFYBO-Conicet.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: patriperelman@macn.gov.ar.

Resumen

A partir de brotes crecidos *in vitro* del portainjertos de *Prunus insititia* GF 655/2 se realizaron estudios comparativos sobre la anatomía y la histoquímica de las raíces crecidas en las fases de enraizamiento y aclimatación. Para los análisis histoquímicos se usaron las técnicas histológicas de Sudán III, Lugol y cloruro férrico. Las raíces de los brotes crecidos *in vitro* presentaban grasas, almidón y células con taninos, mientras que las raíces que se encontraban en la etapa de aclimatación estos contenidos no estaban presentes o, en algunos casos, restringidos a la endodermis. Estas diferencias en los contenidos celulares podrían estar relacionados con los distintos hábitos nutricionales que presentan las plantas que crecen *in vitro* y las que se encuentran en el estadio de aclimatación en invernáculo.

Anatomic changes and histochemical study in the roots of micropropagated plants of *Prunus insititia* GF 655/2 microshoots

Summary

A comparative anatomic and histochemical study between *in vitro* rooting and acclimatized stages of *Prunus insititia* GF 655/2 microshoots was carried out. Histochemical analysis were analyzed using Sudan III, Lugol and ferric chloride histochemical techniques. It was found that sprouts grown *in vitro* roots present fat, starch and tannin cell contents, while in the acclimatized ones these contents are not present, or in some cases, are limited to the endodermis. These differences in the contents could be related with the dissimilar nutritional habits between the *in vitro* grown plants and the acclimatized ones.

Introducción

La propagación vegetativa *in vitro* o micropropagación es una técnica que se utiliza para multiplicar plantas en condiciones estériles. Consta de diferentes etapas: iniciación, multiplicación,

elongación y enraizamiento, y rusticación o aclimatación.

Para crecer y multiplicarse en estas condiciones, las plantas necesitan un medio rico en nutrientes, tanto orgánicos (vitaminas, aminoácidos, hidratos de carbono, etcétera) como inorgánicos (sales minera-

Palabras clave: micropropagación - análisis histoquímico - enraizamiento *in vitro* - aclimatación - *Prunus*.

Key words: micropropagation - histochemical analysis - *in vitro* rooting - acclimatation - *Prunus*.

les fundamentalmente macro y micronutrientes) y reguladores del crecimiento como el ácido giberélico y benzil amino purina. Por esta razón se dice que los tejidos vegetales son heterótrofos (George, 1993) porque son dependientes de un aporte externo de hidratos de carbono en el medio de cultivo, como sustrato primario para la respiración.

En la etapa de enraizamiento se induce la formación de raíces adventicias, generalmente por agregado de auxinas (ácido indol butírico) al medio de cultivo.

En la rusticación, los brotes crecidos y enraizados *in vitro* son pasados a una cámara con sustrato y humedad controlada. Esta etapa es crítica, ya que las plantas pueden sufrir un fuerte estrés hídrico por varios factores. A diferencia de las plantas crecidas en invernáculo o en el campo, cuyas hojas tienen cutícula y presentan un mesófilo con dos a tres capas de células, las plantas crecidas *in vitro* se caracterizan por la ausencia de cutícula, y porque sus estomas no tienen la capacidad de cierre (Preece y Sutter 1991); además, el mesófilo tiene un considerable espacio de aire y una sola capa de células. (Brainerd y col., 1981; Brainerd y Fuchigami, 1981). También se observó que las raíces inducidas *in vitro* no son completamente funcionales. El pasaje desde el cultivo *in vitro* a las condiciones de rusticación origina cambios en la anatomía de la planta, de las que hay escasa información con respecto al nivel de los cambios histológicos.

En este trabajo se describen los cambios histológicos que ocurren en las raíces de ciruelo *Prunus insititia* L. –Rosaceae– GF 655/2, micropropagadas del portainjertos durante las etapas de enraizamiento y rusticación.

Materiales y métodos

Material vegetal

Todo el material vegetal usado para este trabajo fue obtenido de brotes de plantas madres con sanidad controlada del portainjertos de *Prunus insititia* GF 655/2 que se encontraban en la Estación Experimental Julio Hirschhorn de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

Para la iniciación *in vitro* se usaron segmentos nodales de brotes tiernos, de material no lignificado,

de la copa de los árboles del portainjertos de *Prunus insititia* GF 655/2.

Desinfección del material vegetal y obtención de explantos estériles

Los brotes tiernos fueron desfoliados y seccionados en segmentos que contenían de dos a tres yemas cada uno, y que se desinfectaron con una solución compuesta con hipoclorito de sodio (NaClO) marca *Ayudin*® al 25% (1% de cloro activo) y unas gotas de detergente, durante 20 minutos, seguida de HgCl₂ al 0,1%, 5 minutos. Los explantos se enjuagaron tres veces con abundante agua estéril entre cada desinfectante y al final del tratamiento. De esta manera, los explantos quedaron preparados para ser colocados en el medio de cultivo de iniciación.

Etapas de la micropropagación, medios de cultivo usados y condiciones de cultivo

Iniciación

Los explantos desinfectados fueron colocados en tubos que contenían medio de iniciación hasta la brotación de sus yemas, mientras que los contaminados fueron descartados.

El medio usado para la iniciación de los cultivos fue el de Murashige y Skoog (1962), solución salina básica más los orgánicos de iniciación: (mg/l) mio-inositol 100; tiamina 0,1; glicina, 2. Se agregó sacarosa 30 g/l y, en algunos casos, se agregó benzil amino purina (BA), según la necesidad y el momento del año en que fueron tomados los brotes de las plantas madres.

Multiplicación

Los explantos brotados en el medio de iniciación fueron transferidos a frascos que contenían medio de multiplicación para comenzar su reproducción vegetativa o micropropagación. Cada 28 a 30 días se realizaron los repiques o subcultivos de los explantos. Los brotes fueron multiplicados en el medio de cultivo descrito por Radice y col. (1999), que consiste en:

Solución salina básica de Murashige y Skoog (1962): (mg/l) Macronutrientes: NH₄NO₃, 1650; KNO₃, 1900; CaCl₂·2H₂O, 440; MgSO₄·7H₂O, 370; KH₂PO₄, 170;

Quelante: Na EDTA, 37,23 + FeSO₄7H₂O, 27,95 = FeEDTA;

Micronutrientes: KI, 0,83; H₃BO₃, 6,2; MnSO₄4H₂O, 22,3; ZnSO₄7H₂O, 8,6; Na₂MoO₄2H₂O, 0,25; CuSO₄5H₂O, 0,025; CoCl₂6H₂O, 0,025.

Composición orgánica de *Prunus*: MSP (Radice y col., 1999) (mg/l): mio-inositol, 100; tiamina, 0,1; glicina, 2; piridoxina, 0,1; pantotenato de Ca, 0,1; ácido nicotínico, 0,1; biotina, 0,1; riboflavina, 0,5; ácido ascórbico, 10.

Reguladores del crecimiento agregados: ácido giberélico (GA₃) 0,1 mg/l + benzil amino purina (BA) 0,5 mg/l.

Enraizamiento

Los brotes o microestacas que alcanzaron 2 cm de longitud fueron pasados al medio de enraizamiento (Perelman y Caso, 2000) que se describe a continuación.

Solución salina básica de enraizamiento

Se realizaron modificaciones sobre la base de la solución salina básica de Murashige y Skoog usada para la etapa de multiplicación. Se redujeron los nitratos a la mitad de la solución salina y el FeEDTA se duplicó. Se agregó la composición orgánica de *Prunus* (MSP) descrita y, además, se agregó 1mg/l de ácido indol butírico (IBA).

Los brotes se mantuvieron en oscuridad la primera semana de cultivo, y luego fueron transferidos al fotoperíodo normal. Permanecieron en el medio de enraizamiento 28 días.

Condiciones de cultivo y fraccionamiento de los medios

Los medios de iniciación fueron distribuidos en fracciones de 10 ml, en tubos de vidrio de 45 ml de capacidad; por otra parte, los medios de multiplicación fueron fraccionados de a 50 ml y envasados en frascos de vidrio de 350 ml, con tapa de plástico opaca. Para los de enraizamiento se usaron frascos de 160 ml de capacidad con 25 ml de medio.

Todos los medios de cultivo usados fueron suplementados con sacarosa al 3%; para que los medios fueran semisólidos se agregó agar 7 g/l, se ajustaron a pH 5,8 ± 0,02 con KOH 1N. La esterilización se llevó a cabo en autoclave durante 20 minutos a 0,1 MPa.

Las condiciones de cultivo del material vegetal para las diferentes etapas de la micropropagación fueron 24 ± 2 °C de temperatura con un fotoperíodo de 16 horas, suministrado por tubos Philips TLT 110 W/54 RS de luz blanca fría.

Aclimatación

Las plantas enraizadas se aclimataron en macetas o en cajones que contenían un sustrato estéril compuesto por perlita, turba y acículas trituradas de pino, en partes iguales. Durante aproximadamente 20 a 25 días se mantuvieron en una cámara con condiciones controladas de luz, temperatura de 24 ± 2 °C y un fotoperíodo de 16 h. Durante la primera semana las plantas crecen con altos niveles de humedad (≥ 80% HR) que se reduce en forma gradual durante los días siguientes.

Al final de ese período las plantas están en condiciones de pasar a invernáculo. El tiempo necesario para la aclimatación completa de los brotes es de aproximadamente 45 días.

Preparación histológica

Fijación

Se usaron dos soluciones de fijación: formol-ácido acético-alcohol (FAA) y la otra, formol-ácido acético (FOA). Las raíces de los brotes aclimatados 60 días se fijaron en FAA. Las raíces de los brotes crecidos *in vitro* y las raíces de los brotes aclimatados 45 días se fijaron en FOA.

Inclusión

La inclusión se realizó mediante la técnica de Johansen descrita por Dizeo de Strittmatter, (2000).

Cortes

Los cortes transversales y longitudinales de todas las raíces se realizaron con micrótomo minot y de deslizamiento, a 9 μm. Los cortes transversales siempre se realizaron en la zona media de la raíz.

Coloración

Para determinar la estructura histológica de la raíz la coloración utilizada fue safranina-*fast green*.

Muestras

Para cada etapa en estudio se cortaron transversalmente 10 raíces en cortes seriados.

Técnicas histoquímicas

Se realizaron reacciones de caracterización para observar diferencias en las raíces crecidas *in vitro* y en las raíces que se encontraban 45 días aclimatadas. Las técnicas histoquímicas usadas fueron: Sudán III para identificación de grasas, Lugol para detección de almidones y cloruro férrico para la identificación de taninos (D'Ambrogio, 1986).

Resultados

Cortes con safranina fast-green

Raíces de brotes crecidos *in vitro*

El aspecto general del corte transversal de los brotes crecidos *in vitro* se corresponde con una raíz primaria de *Prunus*, tipo tetrarca (Esau, 1953).

En estas raíces se observó, de afuera hacia adentro: a) una corteza de una sola capa de células fuertemente coloreada con safranina; b) dos capas de células de parénquima cortical; c) varias capas de tejido parenquimático con abundantes células que presentan contenidos; d) una endodermis fuertemente teñida, que

significa presencia de células con contenidos abundantes; se observó, además, que la endodermis puede presentar de una a tres capas de células fuertemente teñidas; e) el periciclo levemente teñido con safranina presenta una sola capa de células ovoidales; f) entre cuatro y cinco capas de células de parénquima floemático rodeando al tejido xilemático que presenta grandes vasos y fibras no lignificadas de paredes celulares gruesas (Figura 1 a, b y c).

Raíces de brotes aclimatados 45 días

Las raíces de los brotes aclimatados 45 días, coloreadas con safranina-*fast green* presentan una típica estructura tetrarca, muy similar a lo observado en las raíces de *in vitro*, pero con algunas diferencias: los contenidos celulares están restringidos a la endodermis, en una sola capa de células (Figura 2 a, b) en los brotes aclimatados 45 días.

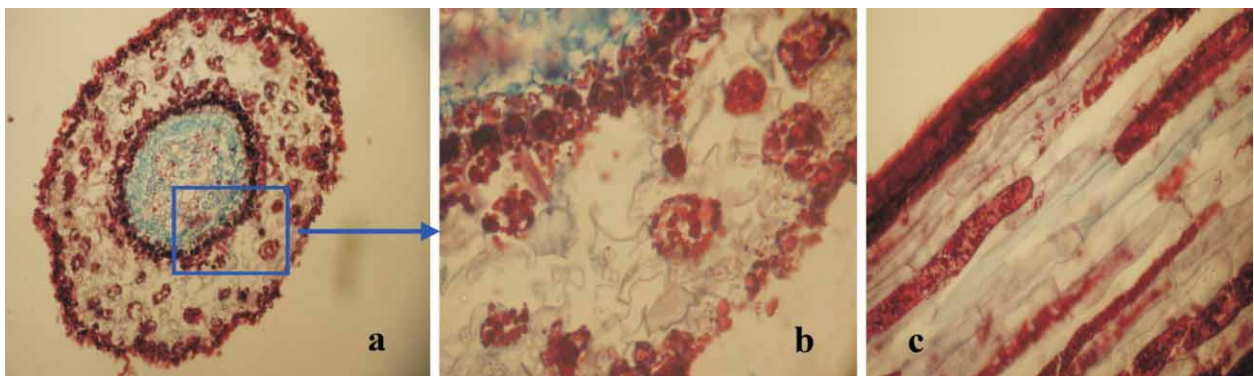
Cuando se estudiaron con safranina-*fast green* las raíces de los brotes que permanecieron 60 días en aclimatación, se observó que presentaban el aspecto típico de las raíces con crecimiento secundario (Figura 3 a y b).

Análisis histoquímico

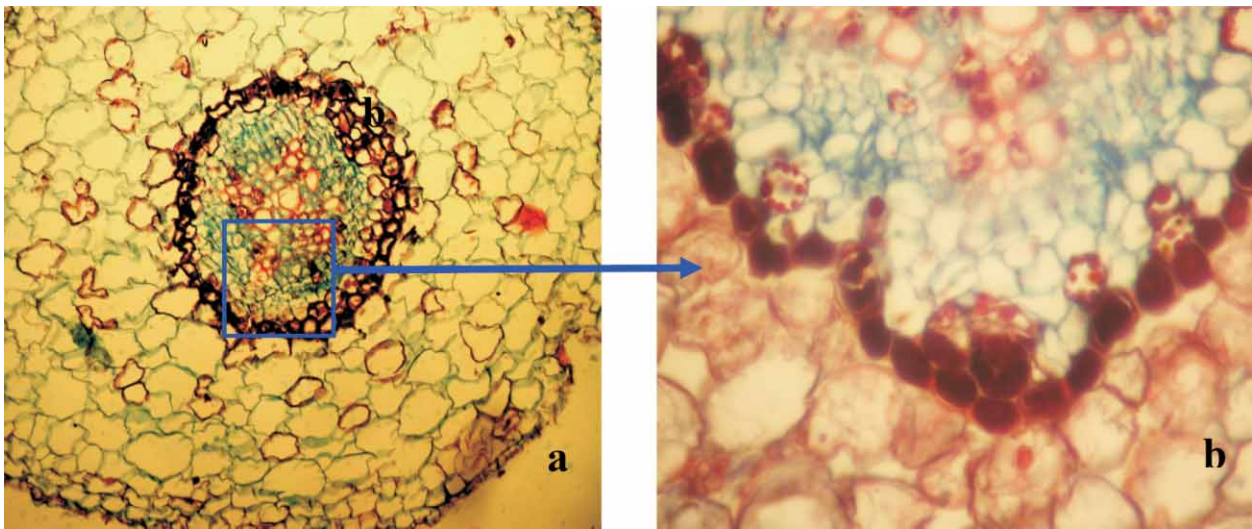
Reacción de Sudán III

En las raíces procedentes de brotes de *in vitro*, esta reacción resultó positiva en las células del

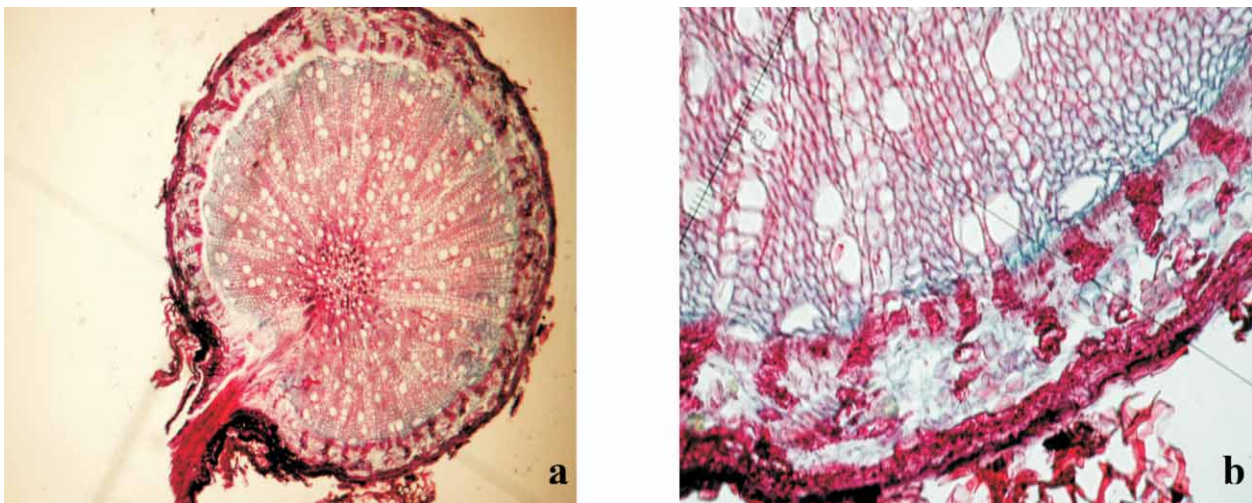
Figura 1.- Transcorte de raíz de brotes crecidos *in vitro*



a) Observación de raíz primaria tetrarca. Presencia de endodermis de varias capas y contenidos celulares. Aumento: 100 x. b) Detalle de endodermis, periciclo y células del parénquima con contenidos celulares. Aumento: 400 x. c) Corte longitudinal. Aumento: 400 x.

Figura 2.- Transcorte de raíz aclimatada 45 días

a) Se observan contenidos celulares en la endodermis. Aumento: 200 x. b) Detalle de la endodermis de raíz. Aumento: 400 x.

Figura 3.- Corte transversal de raíz aclimatada 60 días, con crecimiento secundario

a) Aumento: 100 x. b) Detalle de la corteza y del leño. Aumento: 200 x.

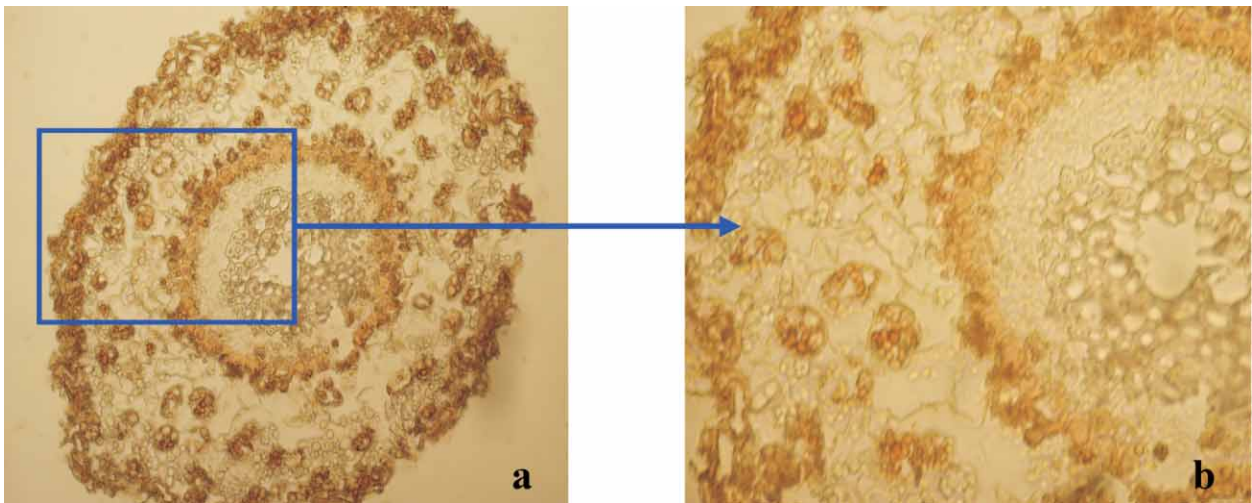
parénquima cortical, en la endodermis y en las células de la epidermis, donde se observaron contenidos grumosos de grasas (Figura 4 a y b).

En las raíces de los brotes aclimatados por 45 días, se observó que algunas células de la endodermis presentaron contenidos de grasa en su interior (Figura 5), de modo quedó restringida esta reacción a la única capa de células de la endodermis.

Reacción de Lugol

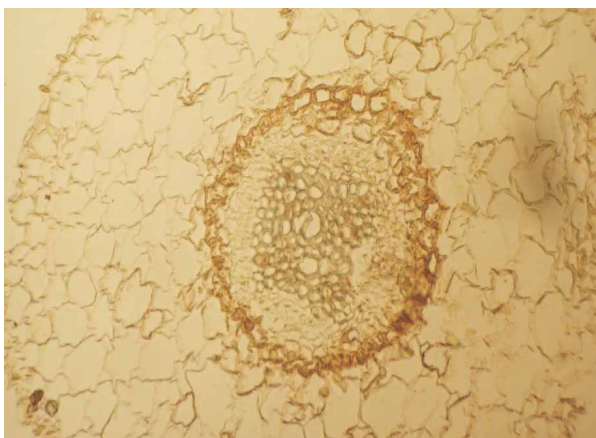
En los cortes de las raíces procedentes de cultivos *in vitro* se observó que la mayoría de las células de los parénquimas radical y cortical, y del periciclo presentan abundante contenido de almidón. El almidón atraviesa la endodermis y se acumula en el periciclo que rodea los parénquimas floemático y xilemático (Figura 6).

Figura 4.- Reacción de Sudán III en raíces de brotes crecidos *in vitro*



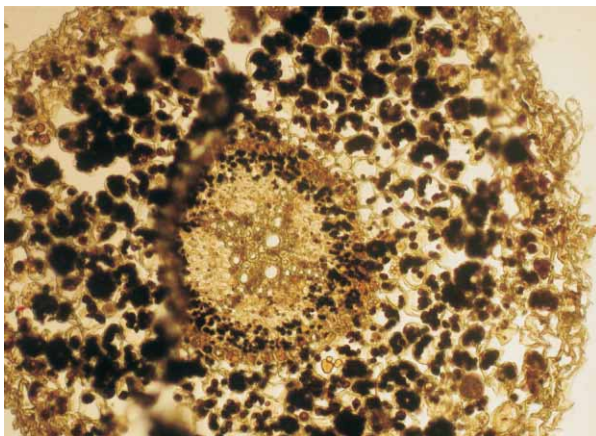
a) Raíz procedente de brotes *in vitro*. Aumento 200 x. b) Detalle de la raíz. Aumento: 400 x.

Figura 5.- Reacción de Sudan III en raíces aclimatadas 45 días



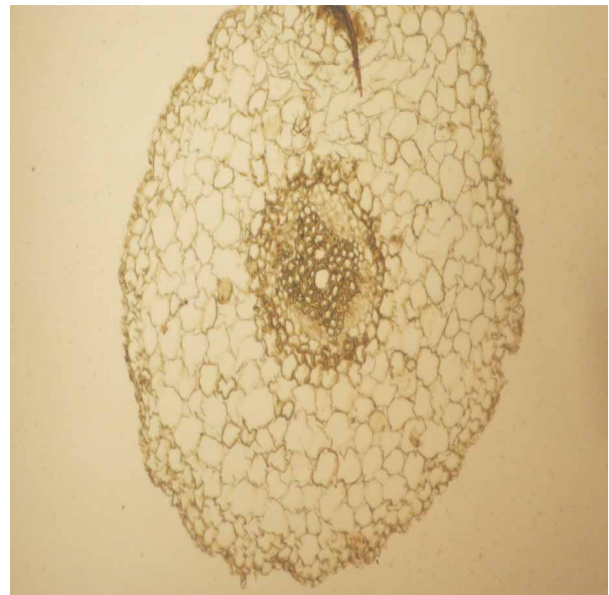
Aumento 100 x .

Figura 6.- Reacción de Lugol en raíces de brotes crecidos *in vitro*



Corte transversal de la raíz. Aumento: 200 x.

Figura 7.- Reacción de Lugol en raíces aclimatadas 45 días



Corte transversal de la raíz. Aumento: 100 x.

En los cortes transversales de raíz, provenientes de los brotes aclimatados durante 45 días, no se observó la presencia de almidón en las células radicales (Figura 7).

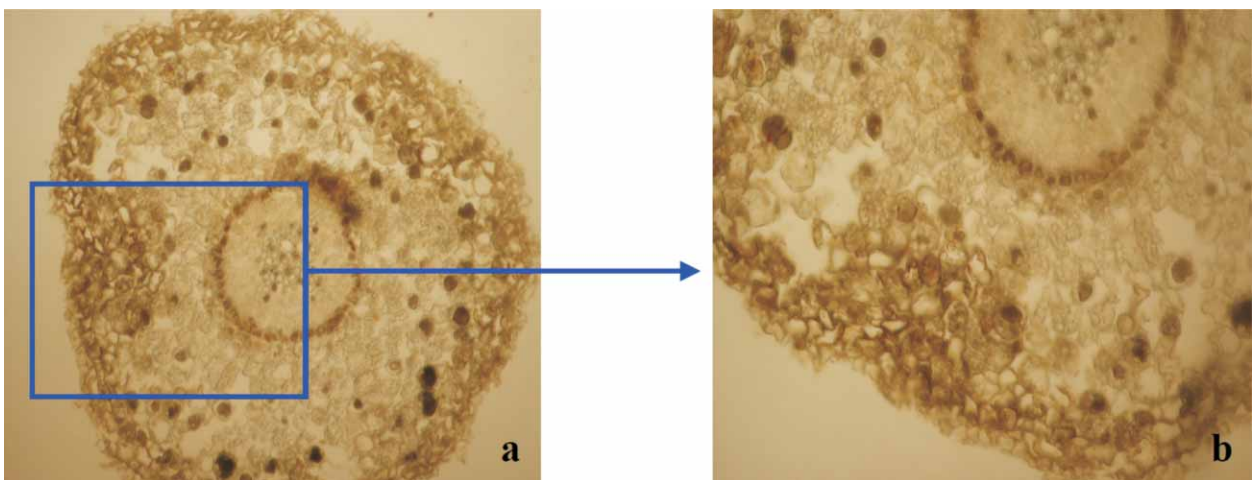
Reacción de cloruro férrico

Los contenidos de taninos que se observaron en los

cortes transversales de las raíces provenientes de los brotes cultivados *in vitro*, presentaron una distribución más abundante en el parénquima más próximo a la corteza; también se encontraron en la endodermis y en los vasos del xilema (Figura 8).

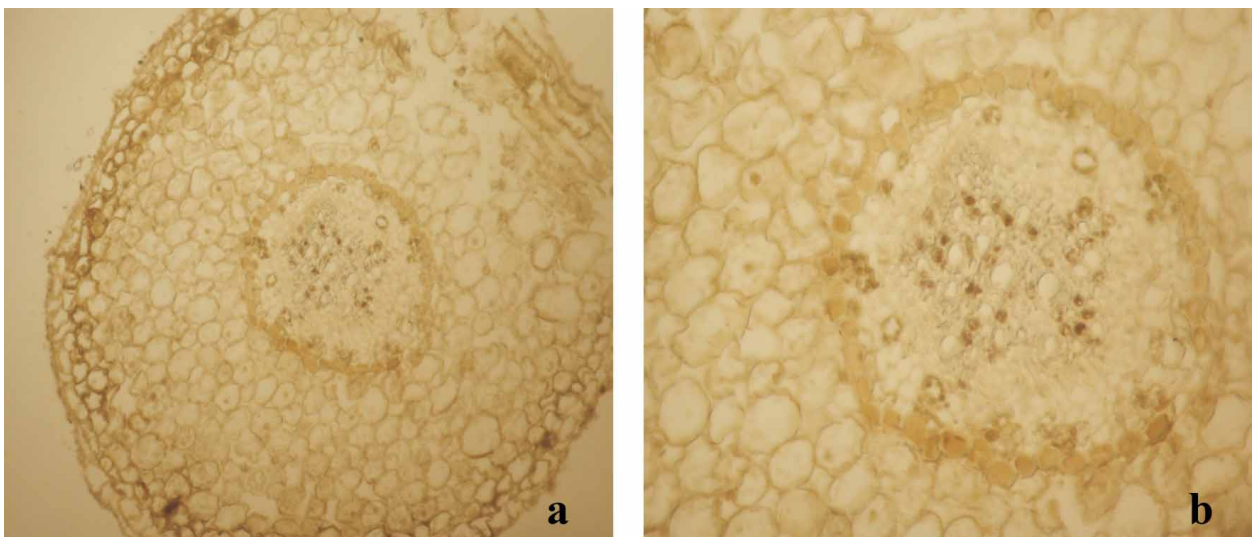
En las raíces de las plantas aclimatadas 45 días esta reacción solo mostró taninos en el parénquima xilemático (Figura 9 a y b).

Figura 8.- Cloruro férrico en raíces de brotes crecidos *in vitro*



Corte transversal de la raíz, se puede observar la distribución de taninos en el parénquima, en la endodermis y en los vasos del xilema. a) Aumento: 100 x. b) Aumento: 200 x.

Figura 9.- Reacción cloruro férrico en raíces aclimatadas 45 días



Corte transversal, se observa reacción positiva en los vasos del xilema. a) Aumento: 100 x. b) Aumento: 200 x.

Conclusiones

Los cortes del material cultivado *in vitro* con la coloración de safranina-*fast green* presentan en el parénquima gran cantidad de contenidos celulares muy coloreados y, en las reacciones histoquímicas, abundantes sustancias de reserva (SR), que podría deberse a la acumulación de SR durante el período *in vitro*, ya que durante la etapa de micropropagación las plantas se vuelven heterótrofas debido al agregado externo de nutrientes e hidratos de carbono.

Los cortes de las raíces de los brotes aclimatados durante 45 días no presentan sustancias de reserva, o son muy escasas y restringidas al parénquima xilemático o a la endodermis, en algunos casos (taninos y grasas). Es de esperar que los nutrientes que aparecen durante la etapa *in vitro* sean usados para superar la aclimatación o la rusticación, por esa razón los cortes de esta etapa no presentan contenidos, o son muy escasos en los parénquimas radiculares, además de volver al hábito autótrofo.

Las sustancias de reserva que se observaron con la coloración de safranina-*fast green* son fundamentalmente grasas combinadas con almidón y taninos, como lo demostraron los análisis histoquímicos.

Referencias bibliográficas

Brainerd, K.E.; Fuchigami, L.H. (1981). "Leaf anatomy and stomatal functioning in the accli-

matization of tissue cultured apples and plums". *New Horizons*: 24-26.

Brainerd, K.E.; Fuchigami, L.H.; Kwiatkowski, S. and Clark, C.S. (1981). "Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments". *Hort Science* 16: 173-175.

D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. Hemisferio Sur S.A. Dizeo de Strittmatter, C. (2000). "Modificación de la técnica de inclusión en parafina de Johansen". *Dominguezia* 16(1): 55-58.

Esau, K. (1953). *Plant Anatomy* (2nd Edition), chapter 17. John Wileys & Sons, New York: 513-514.

George, E. (1993). "Factors affecting Growth and Morphogenesis", (Chapter 7). In: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1 (2nd edition). Exegetics, Edington.

Perelman, P. and Caso, O. (2000). "Root formation by microshoots of *Prunus insititia* L., rootstock GF 655/2 in an auxin-free medium". *Phyton Int J Exp Bot* 69: 65-69.

Preece, J.E. and Sutter, E.G. (1991). "Aclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field". In: Deberg, P.C. and Zimmerman, R.H. *Micropropagation Technology And Application*. Kluwer Academy Publisher Dordrecht, Amsterdam: 71-94.

Radice, S.; Perelman, P. and Caso, O. (1999). "Clonal propagation of three rootstocks of the genus *Prunus* for the 'Flooding Pampa'". *Phyton Int J Exp Bot* 64: 149-156.

Análisis multivariado de las proteasas de la familia Asclepiadaceae

Constanza Liggieri^{1a*}, Marina L Sardi², David Obregón^{1b}, Susana Morcelle del Valle^{1c}
y Nora Priolo¹

¹ Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. C.C. 711, (B1900AVW), La Plata, República Argentina.

² División Antropología. Museo de La Plata, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, República Argentina.

^a Miembro de la Carrera de Profesional de Apoyo de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC).

^b Becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet).

^c Miembro de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet).

* Autor a quien dirigir correspondencia: cliggieri@biol.unlp.edu.ar.

Resumen

Varias especies de las familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae* son de especial interés debido a que son utilizadas como plantas medicinales porque tienen diferentes principios activos. En este trabajo se discute la posición taxonómica de la familia *Asclepiadaceae* mediante un análisis multivariado de caracteres bioquímicos. El objetivo de la investigación fue establecer si la familia *Asclepiadaceae* es taxonómicamente una familia independiente, o es una subfamilia de la familia *Apocynaceae*.

La muestra utilizada estaba conformada por proteasas de látex de: *Araujia hortorum*, *A. angustifolia*, *Asclepias curassavica*, *A. fruticosa*, *Funastrum claussum*, *Morrenia brachystephana*, *M. odorata*, *Philibertia gilliesii* (*Asclepiadaceae*) y *Ervatamia coronaria*, *E. heyneana* (*Apocynaceae*). Se realizó un agrupamiento jerárquico de esas enzimas para determinar si las proteasas pertenecientes a la familia *Asclepiadaceae* conforman un grupo separado respecto a las proteasas provenientes de la familia *Apocynaceae*.

Los resultados obtenidos indicaron que los caracteres bioquímicos empleados en este trabajo no permitieron establecer si la familia *Asclepiadaceae* es una familia independiente o no, de la familia *Apocynaceae*; así, concuerda con la corriente cladista que considera a las Asclepiadáceas como una subfamilia (*Asclepiadoideae*) dentro de la familia *Apocynaceae*.

Multivariate analysis from proteases of Asclepiadaceae family

Summary

Several species of the *Asclepiadaceae* and *Apocynaceae* families, are of great interest due to their uses in folk medicine and their different active compounds. In this paper, by means of a multivariate analysis of biochemical characters the taxonomic placement of *Asclepiadaceae* is discussed. The aim is to investigate whether the *Asclepiadaceae* must be systematically considered as an independent family, or to be recognized as a subfamily of *Apocynaceae*. The sample was comprised by proteases of *Araujia hortorum*, *A. angustifolia*, *Asclepias curassavica*, *A. fruticosa*, *Funastrum claussum*, *Morrenia brachystephana*, *M. odorata*, *Philibertia gilliesii* (*Asclepiadaceae*) and *Ervatamia coronaria*, *E. heyneana* (*Apocynaceae*). A hierarchical cluster was

Palabras clave: *Asclepiadaceae* - *Apocynaceae* - proteasas - feneticismo.

Key words: *Asclepiadaceae* - *Apocynaceae* - proteases - phenetics.

obtained with the biochemical characters of proteases, in order to determine whether proteases derived from *Asclepiadaceae* cluster as a separate group respect to proteases derived from *Apocynaceae*. Results indicated that proteases of both *Asclepiadaceae* and *Apocynaceae* cluster together. These data agree with cladistic hypothesis that considerer the *Asclepiadaceae* as a subfamily of the *Apocynaceae*.

Introducción

El interés que promueve el estudio de las familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae* se debe a que varias especies son utilizadas como plantas medicinales porque tienen diferentes principios activos. Algunas de las especies usadas con estos fines (*Vinca minor*, *Catharanthus roseus*, *Rauwolfia serpentina*, *Nerium oleander*) contienen alcaloides, flavonoides, taninos y glicósidos cardíacos (cardenólidos).

Las principales propiedades medicinales que se atribuyen a estas especies son analgésicas, dermatológicas, purgantes, antitumorales, hipotensoras y sedantes (Hechem de Bonansea y Escurra, 2006; Fernández Brewer y col., 2008).

Es necesario identificar con precisión las especies pertenecientes a estas familias, debido a la importancia económica que tienen algunas de ellas; por ejemplo, la vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*, perteneciente a la familia *Apocynaceae*) se ha convertido en la principal fuente de alcaloides como la vinblastina (antineoplásico), ajmalicina (hipotensor) y serpentina (tranquilizante) (Iwase y col., 2005). Otras especies, como *Nerium oleander* (*Apocynaceae*) o *Asclepias syriaca* (*Asclepiadaceae*), son conocidas por su toxicidad.

Uno de los principales objetivos de la Sistemática Botánica es la construcción de un verdadero sistema filogenético que refleje las relaciones naturales entre todos los taxones vegetales. No es, naturalmente, una tarea fácil debido a que desde mediados del siglo XX se han producido diferentes tipos de clasificaciones para las Angiospermas. Ejemplo de ello son las elaboradas por Hutchinson (1959; 1973); Takhtajan (1959; 1969; 1980); Cronquist (1968; 1981), Dahlgren (1980) y Thorne (1983; 1992).

Los fundamentos de la clasificación biológica son objeto de una de las más intensas controversias en la Biología, ya que hay varias corrientes de pensamiento acerca de los fundamentos teóricos para aplicar en esa clasificación. Es así que se construyeron variadas clasificaciones, desde la corriente evolucionista (Schumann, 1985; Bruyns y Forster, 1991; Wenzel, 1997); la cladista (Endress y Bruyns, 2000;

Sennblad y Bremer, 2002), y la fenética (Sneath y Sokal, 1973; Duncan y Baum, 1981).

Los caracteres morfológicos, anatómicos, palinológicos, embriológicos, químicos, bioquímicos, entre otros, son válidos para evaluar las relaciones naturales entre los diferentes seres vivos cuando no se cuenta con sus registros fósiles.

La publicación *Chemotaxonomie der Pflanzen* por Hegnauer fue un hito en la comprensión de las relaciones filogenéticas de las familias vegetales. Este autor revisó la literatura sobre la distribución de los metabolitos secundarios y de algunos metabolitos primarios en el reino vegetal –como el almacenamiento de carbohidratos– y sugirió la existencia de relaciones filogenéticas entre las familias de plantas a partir de sus perfiles químicos (*Chemotaxonomische Betrachtungen*) (Hegnauer, 1962).

En forma simultánea se desarrollaron la “quimiotaxonomía” o “sistemática micromolecular” –que tradicionalmente utiliza como caracteres taxonómicos pequeños componentes orgánicos de plantas–, y la “sistemática macromolecular” o “sistemática molecular” –que emplea las características de las biomoléculas– (proteínas y ácidos nucleicos) en sus clasificaciones (Grayer y col., 1999).

Actualmente los investigadores de diferentes disciplinas se proponen llegar a un acuerdo definitivo con respecto a la ubicación taxonómica de la familia *Asclepiadaceae*.

Tradicionalmente la posición de esta familia es la siguiente:

Reino, Plantae
División, Magnoliophyta
Clase, Magnoliopsida
Subclase, Asteridae
Orden, Gentianales
Familia, *Asclepiadaceae*.

El orden Gentianales tiene, además de la ya mencionada familia *Asclepiadaceae*, cuatro familias más: *Loganiaceae*, *Gentianaceae*, *Saccifoliaceae* y *Apocynaceae*. La controversia se plantea cuando se considera la familia *Asclepiadaceae* como una subfamilia de la familia *Apocynaceae*, o mantenerla como tal.

La escuela evolucionista o tradicional considera que tanto la familia *Asclepiadaceae* como la familia *Apocynaceae* tienen características propias, y por ello mantienen la identidad de cada una de ellas. Con relación a esta temática han trabajado Cronquist (1981), Swarupanandan y col. (1996), entre otros. Cronquist mantiene las dos familias independientes por la presencia de traslatores (estructuras que participan en la polinización) en *Asclepiadaceae* y su ausencia en *Apocynaceae*.

Autores como Safwat (1962), Stevens (1983), Fishbein (2001), Liede y Tauber (2002) y Endress y Bruyns (2000), entre otros, siguen la línea de pensamiento cladista en lo que se refiere a la ubicación de la familia *Asclepiadaceae*. Endress y sus colaboradores consideran que los integrantes de la familia *Asclepiadaceae* son derivados apomórficos de los miembros de la familia *Apocynaceae*.

Sin embargo, las nuevas investigaciones moleculares, así como los anteriores estudios morfológicos, sugieren la inclusión de la familia *Asclepiadaceae* como una subfamilia de la familia *Apocynaceae* (Sennblad y Bremer, 1996).

En este estudio se propone contribuir a este debate aplicando la metodología de la escuela fenética; así, analiza las variables bioquímicas de las proteasas de ambas familias, *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae*, por técnicas de análisis multivariado. El objetivo principal

consiste en clarificar si la familia *Asclepiadaceae* es una familia taxonómicamente independiente o es una subfamilia de la familia *Apocynaceae*. La hipótesis de prueba indica que *Asclepiadaceae* es una familia independiente con respecto a la familia *Apocynaceae*, y si esto se expresa por rasgos bioquímicos, entonces las proteasas de la familia *Asclepiadaceae* deberían formar un grupo bien definido y no deberían estar vinculadas con las proteasas de la familia *Apocynaceae*.

Materiales y Métodos

Material vegetal

La muestra estuvo conformada por 19 proteasas, de las cuales 15 pertenecen a la familia *Asclepiadaceae* y el resto, a la familia *Apocynaceae*, según la clasificación tradicional de Cronquist (1981). En el primer grupo las enzimas derivan de las siguientes especies: *Araujia angustifolia*, *Araujia hortorum*, *Asclepias curassavica*, *Asclepias fruticosa*, *Funastrum claussum*, *Morrenia brachystephana*, *Morrenia odorata* y *Philibertia gilliesii* (Tabla 1). Las cuatro proteasas restantes de la muestra derivan de la familia *Apocynaceae* y pertenecen a las especies: *Ervatamia coronaria* y *Ervatamia heyneana* (Tabla 2).

Tabla 1.- Proteasas seleccionadas de la familia *Asclepiadaceae*

Proteasas	Familia <i>Asclepiadaceae</i>	Referencias
Araujiaína a I (Arau a I)		
Araujiaína a II (Arau a II)	<i>Araujia angustifolia</i> (Hook et Arn.) Descaine	Obregón y col., 2008
Araujiaína a III (Arau a III)		
Araujiaína h I (Arau h I)		
Araujiaína h II (Arau h III)	<i>Araujia hortorum</i> Fourn.	Obregón y col., 2001
Araujiaína h III (Arau h III)		
Asclepaína c I (Ascle c I)		
Asclepaína c II (Ascle c II)	<i>Asclepias curassavica</i> L.	Liggieri y col., 2004
Asclepaína f (Ascle f)	<i>Asclepias fruticosa</i> L.	Trejo y col., 2001
Funastraína c II (Funa c II)	<i>Funastrum claussum</i> (Jacq.) Schlechter	Morcelle de Valle y col., 2004
Morrenaína b I (Morre b I)		
Morrenaína b II (Morre b II)	<i>Morrenia brachystephana</i> Griseb.	Vairo Cavalli y col., 2003 Cortadi, 2001
Morrenaína o I (Morre o I)		
Morrenaína o II (Morre o II)	<i>Morrenia odorata</i> (Hook et Arn.) Lindley	Vairo Cavalli y col., 2001 Cortadi, 2001
Philebertaína g I (Phili g I)	<i>Philibertia gilliesii</i> Hook. et Arn.	Sequeiros y col., 2005

Tabla 2.- Proteasas seleccionadas de la familia *Apocynaceae*

Proteasas	Familia <i>Apocynaceae</i>	Referencias
Ervatamina A (Ervata A)	<i>Ervatamia coronaria</i> (Jacq.) Stapf.	Sreedevi y col., 2003
Ervatamina B (Ervata B)	<i>Ervatamia coronaria</i> (Jacq.) Stapf.	Kundu y col., 2000
Ervatamina C (Ervata C)	<i>Ervatamia coronaria</i> (Jacq.) Stapf.	Kundu y col., 1999
Heynaína (Heyna)	<i>Ervatamia heyneana</i> (Wall.) Cooke	Patel y col., 2003

Tabla 3.- Caracteres bioquímicos de las proteasas seleccionadas

Fitoproteasas	Caracteres bioquímicos						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Araujiaína a I (Arau a I)	4,88	23,464	9,3	8,00	NC	NC	85
Araujiaína a II (Arau a II)	8,6	23,528	9,3	8,25	0,18	NC	0
Araujiaína a III (Arau a III)	8,66	23,488	9,3	9,25	5,14	NC	80
Araujiaína h I (Arau h I)	18	24,031	9,3	8,75	NC	0,024	0
Araujiaína h II (Arau h II)	3	23,718	8,9	8,5	NC	0,238	85
Araujiaína h III (Arau h III)	12,5	23,446	10,5	8,5	NC	0,099	80
Asclepaína c I (Ascle c I)	10,9	23,200	9,3	8,5	0,8183	0,0503	80
Asclepaína cII (Ascle cII)	6,58	23,590	9,3	8,5	NC	0,1634	85
Asclepaína f (Ascle f)	7	23,652	9,3	9,5	0,0554	NC	85
Funstraína c II (Funa c II)	7,45	23,636	9,3	9,5	0,1011	0,0203	80
Morrenaína b I (Morre b I)	10,9	23,205	9,3	8,70	NC	0,02	0
Morrenaína b II (Morre b II)	8,8	26,000	9,3	8,25	NC	0,041	0
Morrenaína o I (Morre o I)	15,36	27,000	9,3	8,5	NC	NC	0
Morrenaína o II (Morre o II)	30,1	25,8	9,3	8,5	NC	0,000043	0
Philibertaína g I (Phili g I)	5,28	23,530	9,0	7,5	0,1527	NC	0

Referencias. Caracteres bioquímicos. **I:** Actividad específica (Ucas/mg de proteína); **II:** Peso Molecular (Daltons); **III:** Punto isoeléctrico; **IV:** pH óptimo; **V:** Parámetro cinético K_m usando $pFLNA$ como sustrato; **VI:** Parámetro cinético K_m usando N -a-Cbz-L-Gln p -Nitrofenil ésteres de algunos L-aminoácidos (Ala, Asn, Gln, Gly, Ile, Leu, Trp, Pro y Val) como sustratos; **VII:** Porcentaje de identidad con papaína (Papaya Proteinasa I); NC: datos no comparados.

Selección de los caracteres

Se utilizaron siete características bioquímicas para comparar las proteasas entre sí. (Tabla 3): actividad específica (Ucas/mg de proteína), peso molecular (Daltons), punto isoeléctrico, pH óptimo, parámetro cinético K_m usando como sustratos $pFLNA$ y N -a-Cbz-L- p -Nitrofenil ésteres de algunos L-aminoácidos (Ala, Asn, Gln, Gly, Ile, Leu, Trp, Pro y Val), y porcentaje de identidad con papaína (Papaya Proteinasa I).

Método estadístico

Las relaciones entre las proteasas se evaluaron por medio de una agrupación jerárquica, técnica de uso

común para analizar similitudes y diferencias entre las unidades por la aplicación de una serie de algoritmos. La agrupación jerárquica permite organizar unidades en estructuras significativas (Sneath y Sokal, 1973).

Se efectuó una estandarización de los datos con el objeto de eliminar las diferencias de escala y de unidades de medida entre las variables. Los datos fueron convertidos en Score Z (unidades estándar en valor promedio igual a 0 y desvío estándar igual a 1) (Crisci y López Armengol, 1983). La agrupación se basó en el Método de la Varianza Mínima de Ward y la distancia euclidiana (Johnson, 2000).

En primer lugar, las proteasas de la familia *Asclepiadaceae* se compararon entre sí con el objeto de conocer la forma en que se agrupaban en

función de sus similitudes y diferencias. Luego se incluyeron en la comparación las proteasas de la familia *Apocynaceae* con el fin de detectar los patrones de relación con las proteasas de la familia *Asclepiadaceae*. Debido a la falta de datos en algunas de las características, la comparación entre *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae* se realizó con las variables 1-4 y 7. Los análisis estadísticos se realizaron con Systat 10,2.

Resultados

La comparación de las proteasas de la familia *Asclepiadaceae* con todas las variables estudiadas origina la formación de dos grupos principales (Figura 1), donde el grupo más distanciado está integrado por tres Morrenáinas (Morre b II, Morre o I y Morre o II), mientras que el otro grupo se subdivide en dos subgrupos: uno de ellos compuesto por Arau h II, Ascle c II, Ascle f, Funa c II y Arau h III, y el otro subgrupo, integrado por: Arau h I, Morre b I, Arau a II, Phili g I, Arau a I, Ascle c I y Arau III.

Al incluir en el análisis estadístico las proteasas de la familia *Apocynaceae* se formaron dos grandes agrupamientos (Figura 2). El grupo más alejado contiene a Ascle f, Funa c II, Arau a III, Ascle c I, Ascle c II, Arau a I, Arau h II y *Ervata C*. El grupo restante fue subdividido en dos subgrupos: el formado por Heyna, Arau h III, Arau h I, Morre b I, Arau a II y Phili g I y el integrado por *Ervata B*, Morre b II, Morre o I, Morre o II y *Ervata A*.

Discusión

Del análisis de los datos expuestos, surgieron resultados sorprendentes. Por un lado se mantuvo la relación de las proteasas de la familia *Asclepiadaceae* entre sí y, por otro, las proteasas correspondientes a la familia *Apocynaceae* se distribuyeron en los dos grupos principales.

La clasificación resultante desde el punto de vista de la fenética sugirió que la familia *Asclepiadaceae* no puede considerarse una familia separada. Estos resultados coincidieron con el pensamiento cladístico y, en consecuencia, difirieron con el evolucionista.

Tanto la escuela cladista como la evolucionista con-

Figura 1.- Fenograma correspondiente a las características bioquímicas de las proteasas de la familia *Asclepiadaceae*

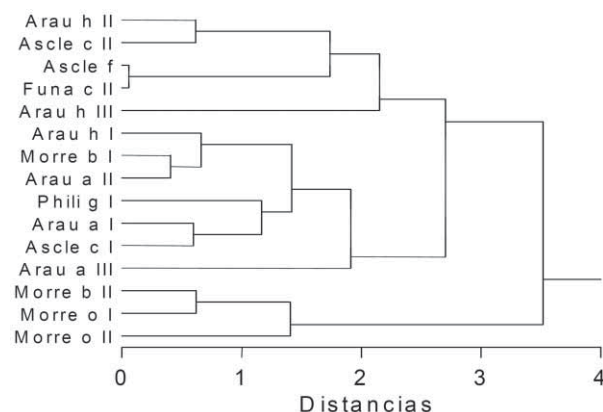
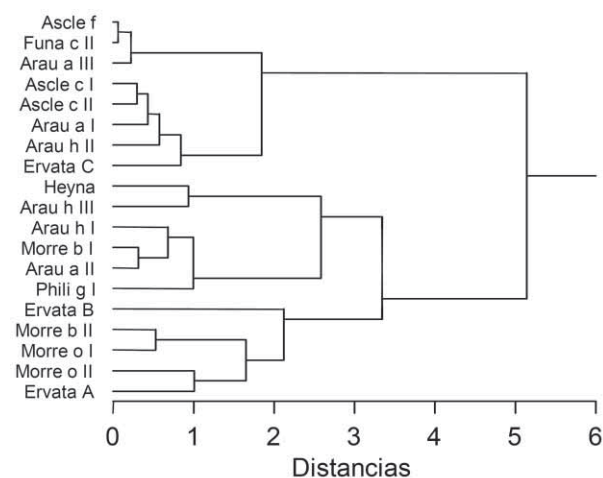


Figura 2.- Fenograma correspondiente a las características bioquímicas de las proteasas de las familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae*



sidera que las relaciones filogenéticas deben expresarse en la clasificación. El evolucionismo también establece que la clasificación debe expresar la cantidad de cambio entre los taxones y, además, que tengan un sentido práctico y estable. El cladismo no considera las relaciones basadas en la similitud global de los caracteres en sus clasificaciones. Esta escuela argumenta que si dos grupos son similares no necesariamente significa que sus relaciones evolutivas sean cercanas. Estas semejanzas pueden ser debidas a la congruencia evolutiva. Es decir, esa congruencia se refiere al proceso por el cual los caracteres de especies pertenecientes a líneas evolutivas independientes pueden tener

semejanzas en respuesta a las adaptaciones que surgen de similares presiones de selección (Queiroz y Gauthieri, 1992; Cantino, 1998).

Finalmente, esta corriente tiende a crear un gran número de categorías taxonómicas, una por cada nodo de un cladograma, lo que lleva a un exceso de categorías jerárquicas. De este modo, cada cladograma representa una hipótesis evolutiva global que la convierte en algo extremadamente cambiante debido a que nuevos estudios pueden llevar a una nueva clasificación taxonómica, con cambios jerárquicos notables. Por lo tanto, las clasificaciones cladistas no son estables como la de los taxónomos evolucionistas, pues hay un continuo cambio de categorías taxonómicas, lo cual estaría agravando aún más la taxonomía de los seres vivos.

Por su lado, el feneticismo, proporciona clasificaciones que consideran varios caracteres del organismo en su conjunto, y cada uno tiene el mismo peso en la clasificación.

Las diferencias entre las distintas corrientes de pensamiento son las responsables de las diferencias en las clasificaciones biológicas. Es por ello que en la actualidad, se tiende a la búsqueda de nuevos caracteres que permitan acceder a nuevas fuentes de información filogenética. Así, los datos provenientes de estudios de secuenciación de ADN, los estudios ontogenéticos basados en un contexto filogenético con el objeto de evitar errores en los conceptos de estructuras homólogas, entre otros, cambiarían la idea que se tiene sobre la evolución puntual de algunos grupos de organismos.

Además, los análisis morfológicos y moleculares constituyen las dos caras de una misma moneda y deben utilizarse de manera complementaria (Stuessy, 1997; Fishbein, 2001).

Se puede concluir que, de acuerdo con el análisis multivariado de caracteres bioquímicos realizados en este estudio, la hipótesis fue rechazada. Las proteasas de la familia *Asclepiadaceae* no conforman un grupo separado respecto a las correspondientes a la familia *Apocynaceae*. Así, los caracteres bioquímicos empleados en este trabajo no permitieron establecer la independencia taxonómica de una familia con respecto a la otra. De este modo, entendemos que este trabajo constituye un aporte a la corriente cladista que considera que las *Asclepiadáceas* forman la subfamilia *Asclepiadoideae* dentro de la familia *Apocynaceae*.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo de ANPCyT (PICT 9-9916), Conicet (PIP 2813); la Universidad Nacional de La Plata, Argentina y CYTED IV.22.

Referencias bibliográficas

- Bruyns, P.V. and Forster, P.I. (1991). "Recircumscription of the Stapelieae". *Taxon* 40: 381-391.
- Cantino, P.D. (1998). "Binomials, Hyphenated uninomials and phylogenetic nomenclature". *Taxon* 47: 425-429.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York. pp.:1262.
- Duncan, T. and Baum, B.R. (1981). "Numerical Phenetics: Its use in botanical systematics". *Annual Review of Ecology and Systematics* 12: 387-404.
- Endress, M.E. and Bruyns, P.V. (2000). "A revised Classification of the *Apocynaceae* s.l.". *Bot. Rev.* 66(1): 1-56.
- Fernández Brewer, A.M.; Juárez Jaimes, V. y Cortés Zárraga, L. (2008). "Usos de las especies del género *Asclepias* L. (*Apocynaceae*, *Asclepiadoidea*). Información del Herbario Nacional de México, Mexu". *Polibotánica* 25: 155-171.
- Fishbein, M. (2001). "Evolutionary innovation and diversification in the flowers of *Asclepiadaceae*". *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 603-623.
- Grayer, R.J.; Chase M.W. and Simmonds M.S.J. (1999). "A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". *Biochemical Systematics and Ecology* 27(4): 369-393.
- Hechem de Bonansea, M.V. and Ecurra, C. (2006). "*Asclepiadaceae* R. BR". *Serie Flora* 6(4): 1-64.
- Iwase, A.; Aoyagi, H.; Ohme-Takagi, M. and Tanaka, H. (2005). "Development of a novel system for producing ajmalicine and serpentine using direct culture of leaves in *Catharanthus roseus* intact plant". *J. Biosci. Bioeng.* 99: 208-215.
- Johnson, D.E. (2000). *Métodos Multivariados*

- Aplicados al Análisis de Datos*. International Thomson Editores.
- Kundu, S.; Sundd, M. and Jagannadham, M.V. (1999). "Structural characterization of a highly stable cysteine protease ervatamin C". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264(3): 635-42.
- Kundu, S.; Sundd, M. and Jagannadham, M.V. (2000). "Purification and characterization of a stable cysteine protease ervatamin B, with two disulfide bridges, from the latex of *Ervatamia coronaria*". *J. Agric. Food. Chem.* 48(2): 171-9.
- Liede, S. and Tauber, A. (2002). "Circumscription of genus *Cynanchum* (*Apocynaceae-Asclepiadoidea*)". *Sys. Bot.* 27: 789-800.
- Liggieri, C.; Arribére, M. C.; Trejo, S.A.; Canals, F.; Avilés, F. and Priolo, N. (2004). "Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex *Asclepias curassavica* L.". *Protein J.* 23(6): 403-411.
- Morcelle del Valle, S.R.; Trejo, S.A.; Canals, F.; Avilés, F.X. and Priolo, N.S. (2004). "Funastrain c II, a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*". *Protein J.* 25: 205-215.
- Obregón, W.D.; Arribére, M.C.; Morcille del Valle, S.; Liggieri, C.; Caffini, N.O. and Priolo, N.S. (2001). "Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.* 20: 17-25.
- Obregón, W.D.; Liggieri, C.; Morcille del Valle, S.; Trejo, S.A.; Avilés, F.X. and Priolo, N.S. (2008). "Biochemical and PMF MALDI-TOF analyses of two novel papain-like plant proteinases". Manuscrito enviado a *Protein & Peptide Letters*. (Nro. PPL-180456). (En prensa).
- Patel, B.K. and Jagannadham, M.V. (2003). "A high cysteine containing thiol proteinase from the latex of *Ervatamia heyneana*: purification and comparison with ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*". *J. Agric. Food. Chem.* 51(21): 6326-34.
- Queiroz, K. and Gauthier, J. (1992). "Phylogenetic taxonomy". *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23: 449-480.
- Safwat, F.M. (1962). "The floral morphology of *Secamone* and the evolution of pollinating apparatus in *Asclepiadaceae*". *Annals of the Missouri Botanical Garden* 49: 45-129.
- Schumann, K. (1895). *Asclepiadaceae*. En: Engler, A. and Prantl, K. Die natürlichen pflanzenfamilien 4(2):189-306.
- Sennblad, B. and Bremer, B. (1996). "The familial and subfamilial relationships of *Apocynaceae* and *Asclepiadaceae* evaluated with rbcL data". *Pl. Sys. Evol.* 202: 153-175.
- Sennblad, B., and Bremer, B. (2002). "Classification of *Apocynaceae* s.l. according to a new approach combining linnean and phylogenetic". *Taxonomy Systematic Biology* 51: 1-21.
- Sequeiros, C.; Torres, M.J.; Trejo, S.A.; Natalucci, C.L. and López, L.M.I. (2005). "Philibertain g I the most basic cysteine endopeptidase purified from the latex of *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (*Apocynaceae*)". *The Protein Journal* 24(7-8): 445-453.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973). *The principle and practice of numerical classification*. En: Kennedy, D., Park, R.B. (Eds.). Numerical Taxonomy. Freeman Press, San Francisco.
- Sreedevi, N.; Kundu, S.; Medicherla, V. and Jagannadham, M.V. (2003). "Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease Ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*". *Journal of Protein Chemistry* 22(1): 1-13.
- Stevens, W.D. (1983). "New species and names in *Apocynaceae, Asclepiadoideae*". *Phytologia* 53(6): 401-405.
- Stussey, T.F. (1997). "Classification: more than just branching patterns of evolution". *Alisa* 15: 113-124.
- Swarupanandan, K.; Mangaly, J.; Sonny, T. K.; Kishorekumar, K. and Chand Basha, S. (1996). "The Subfamilial and Tribal Classification of the family *Asclepiadaceae*". *Bot. Journal of the Linnean Society* 120: 327-369.
- Trejo, S.A.; López, L.M.I; Cimino, C.V.; Caffini, N.O. and Natalucci, C.L. (2001). "Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (*Asclepiadaceae*)". *Journal of Protein Chemistry* 20: 445-453.
- Van Welzen, P.C. (1997). "Paraphyletic groups or what should a classification entail". *Taxon* 46:99-103.
- Vairo Cavalli, S.; Arribére, M.C.; Cortadi, A.; Caffini, N.O. and Priolo, N.S. (2003). "Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)". *Journal of Protein Chemistry* 22: 15-22.

Vairo Cavalli, S.E.; Cortadi, A.; Arribére, M.C.; Conforti, P.; Caffini, N.O. and Priolo, N.S. (2001). "Comparison of two cysteine endopeptidases from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*)". *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 382: 879–883.

Flavonoides de especies argentinas del género *Tripodanthus* (Eichl.) Tiegh. (Loranthaceae)

Marcelo L. Wagner^{1*}, Rafael A. Ricco¹, Fernando G. Ranea^{1,2} y
Alberto A. Gurni^{1,2}

¹ Cátedra de Farmacobotánica, Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

² Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez". Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956 (1113) Buenos Aires. República Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. Correo electrónico: mlwagner@ffyb.uba.ar.

Resumen

Tripodanthus acutifolius (Ruiz & Pav.) Tiegh. y *Tripodanthus flagellaris* (Cham. & Schlecht.) Tiegh. –Loranthaceae– son plantas hemiparásitas utilizadas en la medicina popular por sus supuestas propiedades hipotensoras. El objetivo de este trabajo es caracterizarlas mediante su composición de flavonoides. Se estudiaron hojas y tallos de ejemplares que crecen sobre diferentes hospedantes. Para el aislamiento y la caracterización de los flavonoides se recurrió a métodos estándares. Los estudios fitoquímicos revelaron la síntesis de quercetina-3-O-arabinofuranósido y catequina-4 β -ol en hojas y tallos de *T. acutifolius*, y quercetina-3-O-ramnosilglucósido y proantocianidinas diméricas B6 y B8 en *T. flagellaris*. Estos resultados aportan parámetros anatómicos y fitoquímicos que pueden ser utilizados para el control de calidad de estas especies.

Flavonoids from Argentine species of *Tripodanthus* (Eichl.) Tiegh. (Loranthaceae)

Summary

Tripodanthus acutifolius (Ruiz & Pav.) Tiegh. and *Tripodanthus flagellaris* (Cham. & Schlecht.) Tiegh. –Loranthaceae– are hemiparasitic plants used in folk medicine by their putative hypotensives properties. The aim of this work is to characterize them studying their flavonoid composition. Standard procedures for flavonoid isolation and characterization have been used. Phytochemical analysis revealed quercetin-3-O-arabinofuranoside and catechine-4 β -ol synthesis in leaves and stems of *T. acutifolius*, and quercetin-3-O-rhamnosylglucoside and dimeric proanthocyanidins B6 and B8 in *T. flagellaris*. These results propose anatomical and phytochemical parameters which can be used for quality control of those species.

Introducción

Tripodanthus (Eichl.) Tiegh. es uno de los cinco géneros que conforman la familia Loranthaceae en la República Argentina (Abbiatti, 1946). Esta

familia, junto con Viscaceae y Eremolepidaceae principalmente, comprende un gran grupo de plantas –aproximadamente 1.400 especies– a las que se les llama, en forma generalizada, “muérdagos”. Son plantas hemiparásitas, semileñosas, que se

Palabras clave: estudios fitoquímicos - flavonoides - hemiparásitas - Loranthaceae - *Tripodanthus* - medicina popular.

Key words: Phytochemical study - flavonoids - hemiparasites - Loranthaceae - *Tripodanthus* - folk medicine.

desarrollan sobre otros árboles o arbustos y se distribuyen en hábitats tropicales, subtropicales y también en zonas templadas.

En la Argentina se desarrollan dos especies del género *Tripodanthus*: *T. acutifolius* (R. & P.) Tiegh. y *T. flagellaris* (Cham. & Schlecht.) Tiegh (Abbiatti, 1946).

T. acutifolius se encuentra distribuida en la región septentrional de la Formación del Monte y del Parque Chaqueño (22° a 30° S, 64° a 68° O) (Cabrera, 1994). Los pobladores de las provincias de Salta y Jujuy le dan el nombre popular de “corpus”; también se la conoce como “liga” y “yerba del pajarito” (Abbiatti, 1946; Lombardo, 2003). Es una planta hemiparásita de especies de Leguminosas, Anacardiáceas, Sapindáceas, Zigofiláceas y también frutales. Es un arbusto erecto o subtrepador, con raíces aéreas vigorosas. Las hojas son opuestas, coriáceas o subcoriáceas, aovado-lanceoladas, pecioladas y penninervadas. Las flores son blancas o blanco-amarillentas, muy fragantes y dispuestas en tríades pediceladas. Los frutos son bayas aovadas y negruzcas (Castellón, 1998) (Figura 1).

Figura 1.- *Tripodanthus acutifolius*



T. flagellaris se distribuye en la Formación del Monte y el Parque Mesopotámico o selva paranaense. Se la conoce con el nombre popular de “liga blanca” (Abbiatti, 1946); en algunas comarcas, los pobladores la denominan “corpo”, “liga” o “pupusa” (Ulibarri, 1987). Parasita diversas especies de *Acacia* y *Prosopis*. Es una planta trepadora, de ramas flexuosas y con raíces aéreas delgadas. Las hojas son alternas, sésiles o subsésiles, linear-agudas, subcoriáceas y con la nervadura media apenas visible. Las flores son blancas o amarillentas, dispuestas en tríades pediceladas. Los frutos son bayas obovoides, negruzcas (Abbiatti, 1946) (Figura 2). Ambas especies son utilizadas en medicina popular por su supuesta acción hipotensora que se atribuye a las semejanzas –en su hábito hemiparásito– con el muérdago europeo (*Viscum album* L. –Viscaceae–) (Domínguez, 1928).

Debido a su empleo como hipotensor en medicina popular, y a su posible utilización en la terapéutica antitumoral, se abordó este estudio a fin de caracterizar los flavonoides de ambas especies no solo

Figura 2.- *Tripodanthus flagellaris*



para diferenciarlas entre sí, sino también, de otros muérdagos; además, fue objetivo del estudio establecer parámetros que se puedan aplicar a su control de calidad.

Materiales y métodos

Material vegetal

El material estudiado se encuentra depositado en el Herbario del Museo de Farmacobotánica “Juan Aníbal Domínguez” (BAF), de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Los ejemplares se determinaron mediante el uso de claves sistemáticas y la comparación con material de herbario. Se analizaron las hojas y los tallos de los siguientes materiales:

Tripodanthus acutifolius: - JUJUY: Tumbaya, Leg. Vignale, D. y P. Domenech n° 811, 26-IV-1996, sobre *Salix sp* (Salicaceae); Lozano, Leg. Gurni, A. s. n., 17-III-1999, sobre *Salix humboldtiana* Willd. (Salicaceae). - SALTA: Faldeo Cerro San Bernardo, Leg. Gurni, A. s. n., 20-IX-1985, (3 ejemplares), sobre hospedante indeterminado. - TUCUMÁN: El Cadillal, Leg. Gurni, A. s. n., 2-V-1981, sobre Fabaceae.

Tripodanthus flagellaris: - CATAMARCA: a 33 km. antes de El Rodeo, Leg. Gurni, A. y Wagner, M. n° 31, 16-II-1997, sobre *Prosopis sp* (Fabaceae). - Cn., II-1983, sobre *Acacia caven* (Mol.) Molina (Fabaceae). - ENTRE RÍOS: Ñandubaysal, Gualeguaychú, Leg. Gurni, A. n° 3, 16-III-1985, sobre hospedante indeterminado.

Obtención de los extractos

Se tomaron 10 g de cada órgano desecado y molido, a los cuales se les agregaron 100 ml de metanol-agua (80:20) a temperatura ambiente durante tres días, con cambio diario del solvente hasta obtener un volumen de 300 ml. Cada extracto así obtenido se llevó a sequedad a presión reducida en evaporador rotatorio. Se preparó de cada extracto una solución al 20%.

Estudio de los flavonoles

Con cada uno de los extractos se realizaron cromatografías bidimensionales en capa fina de celulosa normal (TLC) o de alta resolución (HPTLC).

Se utilizó TBA (ter butanol-ácido acético-agua, 3:1:1) como primera dimensión y ácido acético (AcOH) 15 % como segunda dimensión (Mabry y col., 1970). Los cromatogramas se observaron a la luz UV antes y después de ser expuestos a vapores de amoníaco. También se realizó una aspersión con tricloruro de aluminio en metanol (solución al 5%) y con AEDBE (Naturstoffreagenz A), para obtener el patrón de distribución de los compuestos en el material estudiado.

El aislamiento y la purificación se llevaron a cabo por cromatografía descendente en papel Whatman 3MM, y se empleó AcOH 15% como solvente. Cada banda fue eluida con metanol y se realizó otra cromatografía descendente en BAA (n butanol-ácido acético-agua, 6:1:2) (Mabry y col., 1970; Waterman y Mole, 1994). Los compuestos obtenidos fueron eluidos en metanol. A cada compuesto aislado se lo sometió a una hidrólisis ácida con una solución acuosa de ácido clorhídrico 2 N durante 1 h a 100 °C, para estudiar los aglicones y los azúcares (Markham, 1982). La identificación de los glicósidos y de los aglicones se realizó por procedimientos estándares (Mabry y col., 1970; Markham, 1982; Waterman y Mole, 1994). Para la caracterización se utilizaron testigos de quercetina, quercetina-3-O-glucósido y rutina provistos por Sigma-Aldrich.

La identificación de los azúcares de cada compuesto se realizó mediante cromatografía en capa delgada (TLC) con azúcares de referencia y con isopropanol-agua (4:1) como solventes de corrida, y se detectaron con anilina-difenilamina-acetona-ácido fosfórico al 80% (4 ml: 4 g: 200 ml: 30 ml) (Hansen, 1975).

Estudio de las proantocianidinas

Se analizó cada extracto mediante cromatografía bidimensional en capa fina de celulosa (TLC); se utilizó como solventes sec butanol-ácido acético-agua (sBAA, 14:1:5) para la primera dimensión, y AcOH 6 % para la segunda dimensión (Haslam, 1975). Se desarrollaron dos cromatogramas: a uno se lo reveló con solución de HCl al 1% en metanol y luego fue colocado en estufa a 100 °C durante 15 min. El flavan-3,4-diol y las proantocianidinas se convirtieron en antocianidinas (Gurni y Wagner, 1982); al segundo

cromatograma se le realizó una aspersión con el reactivo de vainillina-HCl (solución etanólica de vainillina al 5%-HCl cc; 4:1). Las manchas coloreadas corresponden a leuco y a proantocianidinas (Haslam, 1975). La caracterización de los compuestos fue realizada mediante procedimientos estándares (Haslam, 1975; Porter, 1994; Sun y col., 1998, 1999; Vovk y col., 2005). Se utilizaron testigos de (+) catequina, (-) epicatequina y procianidina B1 y B2, provistos por Sigma-Aldrich, y de procianidinas B6 y B8 que fueron extraídas de la corteza y de las hojas del roble europeo (*Quercus robur* (Ehrh.) DC.-Fabaceae-) (Vivas y col., 2006).

Resultados

Los resultados obtenidos de la caracterización fitoquímica de flavonoides realizada sobre muestras de hojas y de tallos de *T. acutifolius* como *T. flagellaris* indican que: ambas especies producen quercetina libre, quercetina-3-O-glucósido y quercetina-3-O-rutinósido. Sin embargo, *T. flagellaris* presenta, además, el triglicósido 3-O- β -glucosil-(1 \rightarrow 2)-O- $[\alpha$ -L-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-D-glucosa], y *T. acutifolius*, por su parte, presenta el 3-O-arabofuranósido.

Las dos especies acumulan (+) catequina y (-) epicatequina. *T. flagellaris* se diferencia de *T. acutifolius* porque produce procianidinas diméricas (B6 y B8); en cambio, *T. acutifolius* acumula flavan-3,4-diol (leucocianidina) (Figura 3) (Tabla 1).

Figura 3.- Estructura de los compuestos aislados

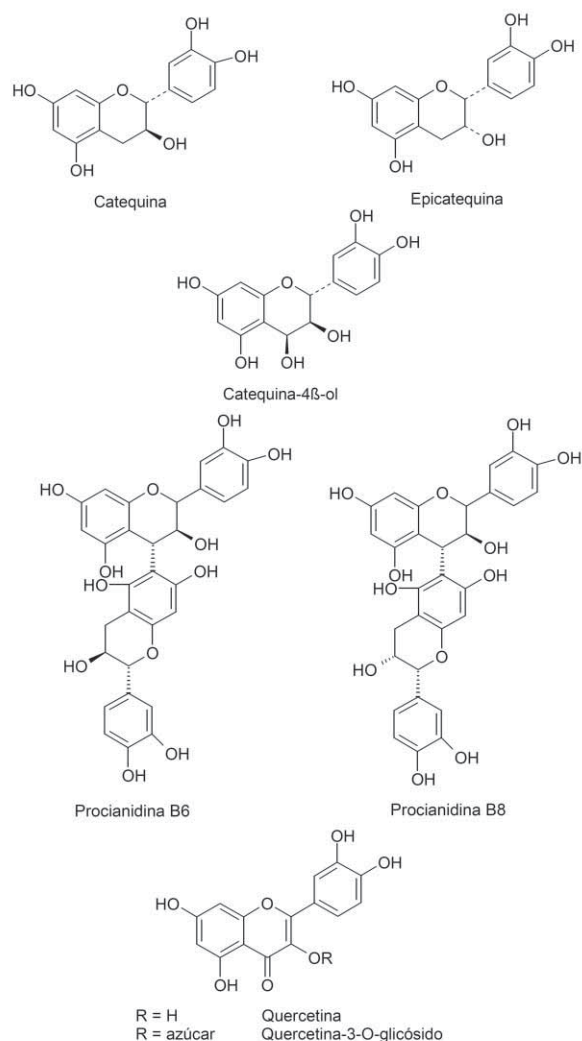


Tabla 1.- Polifenoles de *T. acutifolius* y *T. flagellaris*

Compuesto	<i>T. acutifolius</i>	<i>T. flagellaris</i>
Flavonoles	Quercetina	Quercetina
	Quercetin-3-O-glucósido	Quercetin-3-O-glucósido
	Quercetin-3-O-ramnosilglucósido (Rutina)	Quercetin-3-O-ramnosilglucósido (Rutina)
	Quercetin-3-O-arabofuranósido	Quercetin-3-O-glucoramnosilglucósido
Flavan-3-ol	(+) Catequina	(+) Catequina
	(-) Epicatequina	(-) Epicatequina
Flavan-3,4-diol	Catequin-4 β -ol (leucocianidina)	ND
Proantocianidinas	ND	B6: [catequina (4 α \rightarrow 6)-catequina]
		B8: [catequina (4 α \rightarrow 6)-epicatequina]

ND: No detectado.

Tabla 2.- Distribución de los flavonoides en los diferentes órganos de las especies de *Tripodanthus*

Especies	Órgano	Compuestos									
		Q	QG	QA	QGR	QGRG	C	E	C4βol	B6	B8
<i>T. acutifolius</i>	tallo	+	+	+	ND	ND	+	+	+	ND	ND
	hojas	+	+	+	+	ND	+	(+)	+	ND	ND
<i>T. flagellaris</i>	tallo	+	+	ND	++	++	+	(+)	ND	ND	ND
	hojas	+	+	ND	++	++	+	+	ND	+	+

Q: quercetina; QG: quercetin-3-O-glucósido; QA: quercetin-3-O- α -L-arabofuranósido; QGR: rutina; QGRG: quercetin-3-O-glucoranosilglucósido; C: catequina; E: epicatequina; C4 β ol: catequina-4 β -ol; B6 y B8: dímeros de proantocianidinas. Presencia. ++ : alta; + : intermedia; (+) : baja; ND: no detectado.

Los datos fisicoquímicos de los compuestos aislados se detallan a continuación:

Quercetina. Rf en Forestal 0,42; en BAA 0,73; en CAA 0,15; en TBA 0,57; en HOAc 60% 0,30. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 256, 370; + NaOMe 248, 322 (desc.); + AlCl₃ 270, 334, 456 y + HCl 265, 360, 426; + NaOAc 274, 390 (desc.) y + H₃BO₃ 262, 388.

Quercetina-3-O-glucósido. Rf en BAA 0,58, en H₂O 0,08, en HOAc 15% 0,33. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 256, 357; + NaOMe 272, 320, 404; + AlCl₃ 274, 428 y + HCl 270, 364, 400; + NaOAc 270, 300, 382 y + H₃BO₃ 262, 378. Hidrólisis: quercetina y glucosa.

Quercetina-3-O- α -L-arabofuranósido (Avicularina). Rf en BAA 0,85; en H₂O 0,17; en HOAc 15% 0,30. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 257, 357; + NaOMe 271, 324, 403; + AlCl₃ 272, 404 y + HCl 269, 354, 395; + NaOAc 270, 320, 376 y + H₃BO₃ 260, 299, 367. Hidrólisis, quercetina y arabinosa.

Quercetina-3-O-rutinósido. Rf en BAA 0,46; en H₂O 0,22; en HOAc 15% 0,44. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 257, 356; + NaOMe 270, 324, 410; + AlCl₃ 274, 300, 430 y + HCl 268, 300, 364, 395; + NaOAc 270, 320, 414 y + H₃BO₃ 266, 304, 402. Hidrólisis, quercetina, ramnosa y glucosa.

Quercetina-3-O-glucoranosilglucósido. Rf en BAA 0,39; en H₂O 0,77; en HOAc 15% 0,82. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 255, 353; + NaOMe 270, 322, 402; + AlCl₃ 272, 300, 432 y + HCl 270, 384, 420; + NaOAc 264, 378 y + H₃BO₃ 259, 370. Hidrólisis parcial (5 min), **quercetina-3-O-glucoranosilglucósido** y glucosa; hidrólisis total, quercetina, glucosa y ramnosa.

Quercetina-3-O-glucoranosilglucósido. Rf en BAA 0,45; en H₂O 0,23; en HOAc 15% 0,51. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 256, 356; + NaOMe 270, 324, 410; + AlCl₃ 274, 300, 430 y + HCl 268, 300, 364, 396; + NaOAc 270, 320, 414 y + H₃BO₃ 266, 304, 402. Hidrólisis: quercetina, glucosa y ramnosa.

Cianidina. Rf en BAA 0,65; en Fórmico 0,28; en Forestal 0,47; en HOAc 15% 0,60. Propiedades espectrales, $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH-HCl 536; + AlCl₃ 552. $E_{440}/E_{\text{máx}}\%$ = 19.

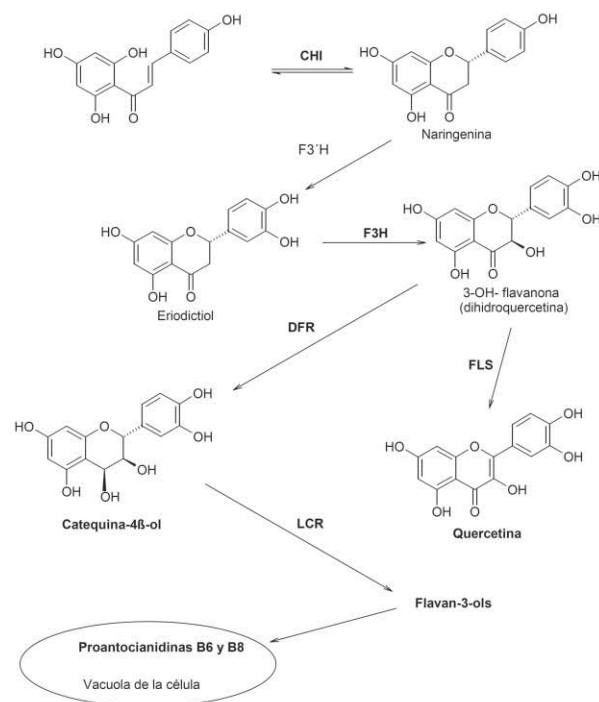
Sistemas de solventes: BBA (nbutanol-AcOH-H₂O; 6:1:2); CAA (cloroformo-AcOH; 2:1 saturado con H₂O); Fórmico (ácido fórmico-AcOH-H₂O; 9:2:3); Forestal (HCl_{cc}-AcOH-H₂O; 3:30:10).

La tabla 2 indica la distribución de los flavonoides en las hojas y en los tallos de las dos especies analizadas.

Discusión

Desde el punto de vista fitoquímico, las especies estudiadas de *Tripodanthus* pueden transformar la dihidroquercetina por dos vías. Una de ellas es la oxidación de la dihidroquercetina por la enzima flavonol sintasa y la generación de quercetina (Heller y Forkmann, 1994; Winkel-Shirley, 2002); parte de este compuesto sufre glicosidaciones en el OH del carbono 3 por la enzima 3-O-glicosiltransferasa. La otra vía es la reducción del carbonilo de la dihidroquercetina por la enzima 3-hidroxi-flavona-4-reductasa NADPH dependiente que origina leucocianidina (catequina-4 β -ol) (Heller y Forkmann, 1994; Winkel-Shirley, 2002), y que puede acumularse en *T. acutifolius*, o puede ser

Figura 4.- Rutas metabólicas probables para las especies estudiadas de *Tripodanthus*



CHI: chalcona isomerasa; F3H: flavonoide-3-hidroxilasa; F3'H: flavonoide-3'-hidroxilasa; FLS: flavonol sintasa; DFR: dihidroflavonol-4-reductasa; LCR: leucoantocianidina reductasa.

transformada por la 3,4-cis-dioles-reductasa (o leucocianidina reductasa) NADPH dependiente en (+) catequina y (-) epicatequina (Winkel-Shirley, 2002; Marles y col., 2003) como ocurre en ambas especies. *T. flagellaris* produce la condensación de las leucoantocianidinas y, en consecuencia, se acumula proantocianidinas (B6 y B8), pero hasta el presente no ha podido ser dilucidado el mecanismo de la condensación (Marles y col., 2003; Dixon y col., 2005; Xie y col., 2005) (Figura 4).

Del estudio comparativo de ambas especies se infiere que *T. flagellaris* se caracteriza por presentar una mayor complejidad en la glicosidación, probada por la presencia de quercetina-3-O-glucoramnoglucósido, compuesto poco común en la naturaleza. Además, acumula las proantocianidinas diméricas B6 y B8 que caracterizan a la especie. En cambio, *T. acutifolius* no produce triglicósidos ni

proantocianidinas, pero produce quercetina-3-O-arabofuranósido y catequina-4β-ol (Tabla 1).

Al comparar los tallos de ambas especies, se observó que *T. acutifolius* presentaba mayor complejidad en las rutas que llevan a la síntesis de proantocianidinas, pero menor diversidad de los 3-O-glicósidos de quercetina que *T. flagellaris* (Tabla 2).

En las hojas, en cambio, *T. acutifolius* presentó un metabolismo de los flavonoides menos complejo que *T. flagellaris*, probado por la presencia de las proantocianidinas B6 y B8 (Tabla 2).

Cuando se compararon los órganos estudiados en ambas especies, se observó que las hojas presentaban mayor diversidad de compuestos que los tallos. En *T. acutifolius*, la acumulación de rutina en las hojas, las diferenciaron de los tallos. En *T. flagellaris* la diferencia está dada por la presencia de proantocianidinas en las hojas (Tabla 2).

Como conclusión, existen diferencias interespecíficas entre ambas especies en la producción de los flavonoides. *T. flagellaris* se diferencia por presentar el triglicósido 3-O-β-glucosil-(1→2)-O-[α-L-ramnosil-(1→6)-D-glucosa] y, *T. acutifolius*, por su parte, presenta el 3-O-arabofuranósido. Además, *T. flagellaris* se diferencia de *T. acutifolius* porque produce procianidinas diméricas (B6 y B8); en cambio, *T. acutifolius* acumula flavan-3,4-diol (leucocianidina).

Estos resultados aportan parámetros fitoquímicos diagnósticos que pueden ser empleados en la autenticación y en el control de calidad de las dos especies estudiadas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires el otorgamiento del subsidio al proyecto UBA120, en el marco del cual se realizó este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Abbiatti, D. (1946). "Las Lorantáceas Argentinas". *Revista del Museo de la Plata VII* (sección Botánica) 18: 1-110.
- Cabrera, A.L. (1994). "Regiones fitogeográficas argentinas". *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, II, Fasc. 1, ACME, Buenos Aires: 75.

- Castellón, A. (1998). "Loranthaceae" en Flora del Valle de Lerma. *Aportes Botánicos de Salta, Serie Flora* 5(2): 1-15.
- Dixon, R.A., Xie, D-Y. and Sharma, S.B. (2005). "Proanthocyanidins: a final frontier in flavonoid research?". *New Phytologist* 165: 9-28.
- Domínguez, J. A. (1928). *Contribuciones a la Materia Médica Argentina*, Peuser, Buenos Aires: 260-264.
- Gurni, A.A. and Wagner, M.L. (1982). "Apigeninidin as a Leucoderivative in *Ephedra frustillata*". *Phytochemistry* 21: 2428-2429.
- Hansen, S.A. (1975). "Thin-layer chromatographic method from identification of mono-, di- and trisaccharides". *Journal of Chromatography* 107: 224-6.
- Haslam, E. (1975). "Natural Proanthocyanidins", in: Harbone, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry, H. (Eds.), *The Flavonoids*, Academic Press, New York-London, Vol. 1: 505-559.
- Heller, W. and Forkmann, G. (1994). "Biosynthesis of flavonoids", in: Harbone, J.B. (Eds.), *The Flavonoids: Advances in research since 1986*, Boca Raton: 499-535.
- Lombardo, A. (1970). "Contribución al mejor conocimiento de las plantas indígenas" [en línea] <<http://www.uruguay.com/jardinbotanico/lombardo/con68/index>> [Consulta: 28/10/03].
- Mabry, T.J.; Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1976). *The Systematic Identification of the Flavonoids*, Springer-Verlag, Berlin and New York: 1-175.
- Markham, K.R. (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London: 1-113.
- Marles, M.A.S.; Ray H. and Gruber, M.Y. (2003). "New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation". *Phytochemistry* 64: 367-383.
- Porter, L.J. (1994). "Flavans and Proanthocyanidins", en: Harbone, J.B. (Ed.), *The Flavonoids. Advances in Research since 1986*, Chapman and Hall/CRC, London, New York: 23-56.
- Sun, B.; Belchior, P.; Ricardo da Silva, J.M. and Spranger, M. I. (1999). "Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds". *Journal of Chromatography A* 841: 115-121.
- Sun, B.; Leandro, C., Ricardo da Silva, J.M. and Spranger, M.I. (1998). "Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins according to their degree of polymerization". *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 1390-1396.
- Ulibarri, E. (1987). "Loranthaceae" en *Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina)*, Col. Cient. I.N.T.A., Buenos Aires, 6 (III):106-121.
- Vivas, N.; Nonier, M.F.; Pianet, I.; Vivas de Gaulejac, N. and Fouquet, E. (2006). "Proanthocyanidins from *Quercus petraea* and *Q. robur* heartwood: quantification and structures". *Comptes Rendus Chimie* 9(1): 120-126.
- Vovk, I.; Simonosvska, B. and Vuorela, H. (2005). "Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates". *Journal of Chromatography A* 1077: 188-194.
- Waterman, P.G. and Mole, S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, Blackwell Scientific Publication, Oxford: 1-238.
- Winkel-Shirley, B. (2002). "Biosynthesis of flavonoids and effects of stress". *Current Opinion in Plant Biology* 5(3): 218-223.
- Xie, D-Y. and Dixon, R. A. (2005). "Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?". *Phytochemistry* 66: 2127-2144.

Dominguezia

Índice acumulado

Dominguezia 23(1) 2007

Anatomía foliar y caulinar de *Lippia turbinata* f. *magnifolia* Moldenke –Verbenaceae– (Loc. Vipos, Dpto. Trancas, Tucumán, República Argentina) (MARÍA VICTORIA COLL ARÁOZ y GRACIELA I. PONESSA).

Inventario preliminar de la flora medicinal de la sierra La Barrosa (Balcarce, Buenos Aires, República Argentina) (MARÍA CELIA NUCIARI e IRMA ROSANA GUMA).

Contribuição Etnofarmacobotânica ao estudo de *Petiveria alliacea* L. –Phytolacaceae– (“amansa-senhor”) e a atividade hipoglicemiante relacionada a transtornos mentais (MARIA THEREZA LEMOS DE ARRUDA CAMARGO).

Actividad insecticida de 1,8-cineol sobre mosca de los frutos, *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae) (SANDRA V. CLEMENTE, GRACIELA MAREGGIANI, ADRIANA BROUSSALIS y GRACIELA FERRARO).

Prácticas de innovación en la enseñanza universitaria (MARILINA LIPSMAN).

Dominguezia 24(1) 2008

El Archivo Bonpland en el Museo de Farmacobotánica “Juan Aníbal Domínguez” (GUSTAVO C. GIBERTI).

Taxonomía y biología de los primeros registros de acrásidos en la República Argentina (EDUARDO M. VADELL).

Farmacopea natural y tratamiento de afecciones de la piel en la medicina tradicional de los campesinos de las sierras de Córdoba (República Argentina) (GUSTAVO J. MARTÍNEZ).

Especies medicinales argentinas con potencial actividad analgésica (RUBÉN V. D. RONDINA, ARNALDO L. BANDONI y JORGE D. COUSSIO).

Dominguezia 24(2) 2008

Etnofarmacobotânica. Metodologia de pesquisa (MARIA THEREZA LEMOS DE ARRUDA CAMARGO)

Anatomía floral comparada de once especies sudamericanas de *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*) relacionadas con la yerba mate (GUSTAVO C. GIBERTI y ALBERTO A. GURNI)

Acción insecticida de extractos de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. (Simaroubaceae) en el gorgojo del arroz, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Curculionidae) (SILVIA M. RODRÍGUEZ, MARCELA I. MOREIRA, ROSANA A. GIMÉNEZ, SERAFINA RUSSO, ADOLFO M. MÁRQUEZ, RAFAEL A. RICCO, ALBERTO A. GURNI y MARCELO L. WAGNER)

El libro impreso frente a la encrucijada electrónica (SUSANA ROMANOS)